

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie
Laborgruppe Immunchemie

Aufbau und Kopplung einer
Kapillarelektrophorese an ein
hochauflösendes Massenspektrometer
zur Analyse amphiphiler
Zellmembrankomponenten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Dipl.-Phys. Göran Hübner
im Mai 2008

Referent:

Co-Referent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Genehmigt:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Zielsetzung	5
2.2	Die Zelhülle Gram-negativer Bakterien	7
2.2.1	Lipopolysaccharide	9
2.2.2	Glycerophospholipide und Glykosphingolipide	11
2.3	Strukturanalytik von Biomolekülen	14
2.3.1	Massenspektrometrie	15
2.3.2	Die Kopplung von Massenspektrometrie und Kapillar- elektrophorese	17
3	Methoden	21
3.1	Massenspektrometrie	21
3.1.1	Ionenbewegung, Anregung und Detektion im FT-ICR Massenspektrometer	22
3.1.2	Die Elektrospray-Ionisation	31
3.1.3	Das Apex Qe FT-ICR Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik	34
3.2	Kapillarelektrophorese	36
3.2.1	Die Kopplung an das Massenspektrometer	42
3.3	Versuchsdurchführung	45
3.3.1	Massenspektrometrie	45
3.3.2	Kapillarelektrophorese	46
3.3.3	Kopplung	48
3.3.4	Datenauswertung	50
4	Material	55
4.1	Gerätebau Kapillarelektrophorese	56
4.2	Kopplung an das Massenspektrometer	59
4.3	Proben und Verbrauchsmaterial	59

5	Ergebnisse	63
5.1	Eigenbau einer Kapillarelektrophorese	64
5.1.1	Aufbau	64
5.1.2	Kopplung	66
5.2	Trennung amphiphiler Membranmoleküle	74
5.2.1	Lipopolysaccharide	75
5.2.2	Glycerophospholipide und Glykosphingolipide	87
5.3	Software-gestützte Spektrenauswertung	90
5.3.1	Zwei Anwendungsbeispiele der Software	96
6	Diskussion	103
6.1	Aufbau der CE-Anlage und koaxiale Kopplung	103
6.2	CE-MS von Lipopolysacchariden	106
6.3	CE-MS von Glycerophospho- und Glykosphingolipiden	109
6.4	Die Software-gestützte Auswertung	109
7	Ausblick	113
	Anhang	115
	Literaturverzeichnis	115
	Abbildungsverzeichnis	133
	Tabellenverzeichnis	135
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Danksagung	139
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	141
	Lebenslauf	143
	Eidesstattliche Erklärung	145

Kapitel 1

Zusammenfassung

Deutsch

In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache Kapillarelektrophorese-Anlage (CE) gebaut und an ein hochauflösendes *Fourier transform ion cyclotron resonance* Massenspektrometer (FT-ICR MS) gekoppelt. Die selbst gebaute Anlage sollte dabei volle Funktionalität hinsichtlich des Probeneinlasses über Druckinjektion sowie der Trennung bei möglichst platzsparender Konstruktion bieten. Diese Konstruktion ermöglicht bei Kopplung an das Massenspektrometer dank direkter Positionierung an der Elektrospray-Ionenquelle die Nutzung deutlich kürzerer Kapillaren verglichen mit kommerziellen Anlagen. Mit der selbst gebauten Anlage sollte bei Kopplung an das Massenspektrometer (CE-MS) untersucht werden, ob sich amphiphile Zellmembrankomponenten, darunter insbesondere das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien, intakt trennen und untersuchen lassen.

Mittels einer *sheath liquid* Kopplung und unter Verwendung von Elektrolyten mit hohem Anteil organischen Lösungsmittels konnten experimentelle Bedingungen geschaffen werden, die es erstmals ermöglichten, native Lipopolysaccharide mit einer *online* CE-MS-Kopplung aufzutrennen. Die intakten Moleküle wurden dabei mit hoher Empfindlichkeit im Bereich einiger Femtomol nachgewiesen. Die Laufzeiten unter den entwickelten Bedingungen sind mit bis zu 60 Minuten allerdings erheblich länger als es für die meisten Substanzklassen mit CE beschrieben ist. In der Literatur sind bisher nur CE-MS-Experimente von LPS-Teilstrukturen, zum Beispiel de-*O*-acyliertem LPS, beschrieben, die auch nur geringe oder unvollständige Trennung zeigen. Die Bedingungen der *online* CE-MS-Kopplung wurden im Hinblick auf die Trennung optimiert. Die Grenzen der entwickelten Methodik wurden mit Experimenten an verschiedenen nativen R-Form Lipopolysacchariden und an Lipid A aufgezeigt. Zur Klärung einiger Fragestellungen wurden dabei auch

vergleichende Messungen mit *offline* CE-Experimenten an einer kommerziellen Anlage der Firma Beckman Coulter mit Peptiden, Nukleosiden und Nukleotiden durchgeführt, da diese im Gegensatz zu LPS im Photodiodenarray-Detektor nachweisbar sind.

In weiteren Versuchen wurde die gefundene Methode zur LPS-Analyse an weiteren Zellmembranbestandteilen wie Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden getestet. Glykosphingolipide lassen sich dabei nach ihrer Kopfgruppe auftrennen. Für Glycerophospholipide konnte eine teilweise Auftrennung nach Kopfgruppen erreicht werden.

Zur schnelleren Auswertung der bei CE-MS-Experimenten in hoher Zahl generierten Massenspektren wurde eine Software entwickelt, die es unter Ausnutzung der hohen Massengenauigkeit des FT-ICR MS gestattet, Glycerophospholipide und Glykosphingolipide automatisch in den Spektren zu identifizieren. Die Auslegung der Software lässt grundsätzlich eine schnelle und einfache Erweiterung auch zu Identifikation von LPS zu. Für diese Substanzen ist allerdings abzusehen, dass es eine hohe Anzahl möglicher Interpretationen geben würde, sodass für diese Substanzen eine datenabhängige Fragmentierung während des *online* CE-MS-Experiments etabliert werden muss.

English

This thesis presents the development of a simple capillary electrophoresis (CE) instrument and its coupling to a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR MS). The self-made instrument provides entire functionality with respect to sample injection via pressure and regarding separation efficiency in a space-saving design. This design enables the coupling of the instrument to the mass spectrometer with the use of considerably shorter capillaries compared to those being used when coupling a commercial instrument. By this, it should be examined whether amphiphilic components of cell membranes, in particular lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria, could be separated by online CE-MS.

Using a sheath liquid interface and electrolytes containing a high fraction of organic solvents it was possible to separate native LPS by online CE-MS for the first time. Intact molecular ions were detected at low femtomole level. The separation time was significantly higher compared to those known for CE-separation of most classes of molecules. Up to now only partial CE-MS-separation of partial structures of LPS, e.g. de-*O*-acylated LPS, has been described in literature.

Experimental conditions of the CE-MS-coupling were optimized. The limitations of the developed method were evaluated using several R-form LPS and lipid A. Some questions were addressed using a commercially available in-

strument from Beckman Coulter and peptides, nucleosides and nucleotides as those molecules can be detected by a photodiode array detector, which is not possible with LPS.

The developed method was further tested with glycerophospholipids and glycosphingolipids. Glycosphingolipids could be separated by headgroup, whereas only partial separation could be observed for glycerophospholipids.

CE-MS-experiments lead to large numbers of mass spectra. In order to enable faster data processing, a software tool was developed that identifies glycerophospholipids and glycosphingolipids automatically in mass spectra. It is prepared for an upgrade to LPS identification, however, large numbers of possible assignments are expected there, which leads to the need of data dependend fragmentation of ions during CE-MS-experiments.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Zielsetzung

Die Aufklärung der chemischen Struktur von Biomolekülen ist für viele Bereiche der modernen Lebenswissenschaften essenziell. Die Fragen beispielsweise nach Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen oder nach Wirkmechanismen von Medikamenten lassen sich ohne Kenntnis der Struktur und der damit verbundenen physiko-chemischen Eigenschaften auf molekularer Ebene nicht beantworten. Die Strukturanalytik bietet hierzu eine Reihe instrumenteller Möglichkeiten, wobei jedoch kaum eine für sich alleine die Struktur eines Biomoleküls vollständig aufklären kann. Die Aufreinigung einer Molekül-Spezies aus biologischen Isolaten und Probenmenge sind häufig Faktoren, welche die Nutzung bestimmter instrumenteller Möglichkeiten einschränken. Die Massenspektrometrie ist als einziges strukturanalytisches Instrument in der Lage, aus sehr heterogenen Substanzgemischen und auch bei äußerst geringen Probenmengen noch weitreichende Aussagen zur Struktur zu machen. Die Aussagekraft und die Nachweismöglichkeiten lassen sich durch die direkte Kopplung von Vortrennungsmethoden wie zum Beispiel der Hochleistungs-Flüssigchromatographie oder der Kapillarelektrophorese vielfach noch weiter steigern. Letztere ist für viele Substanzklassen hinsichtlich ihrer Trennleistung und des geringen Probenbedarfs die bei Weitem leistungsfähigste Methode. Unter den Massenspektrometern bieten die *Fourier transform ion cyclotron resonance* Geräte höchste Massengenauigkeit und Auflösung.

Ein Forschungsschwerpunkt am Forschungszentrum Borstel ist die Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Lipopolysacchariden auf molekularer Ebene. Lipopolysaccharid ist der Hauptbestandteil der Außenseite der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und wird bei Abtötung dieser im menschlichen Körper durch das Immunsystem oder durch Antibiotika frei-

gesetzt. Es ist biologisch hoch aktiv und induziert eine starke Immunantwort, die zur Sepsis und zum septischen Schock führen kann. Viele Bakterien zeigen zunehmend Resistenzen gegen gängige Antibiotika. Mit Hilfe antimikrobieller Peptide scheint ein Ausweg aus dieser Problematik möglich. Einige davon wirken durch direkte Interaktion mit der äußeren Membran. Zur genauen Klärung dieser Interaktion ist neben der strukturellen Kenntnis der Peptide auch die genaue Kenntnis ihres Interaktionspartners, der Lipopolysaccharide, nötig. Bereits kleine Veränderungen in der Struktur von Lipopolysacchariden können zu erheblichen Änderungen in der Wirkung der antimikrobiellen Peptide oder bei der Induktion von Zytokinfreisetzung menschlicher Immunzellen führen. Einer Charakterisierung von Lipopolysacchariden in nativem Zustand kommt daher eine wesentliche Bedeutung zu.

Die Analyse dieser Substanzen ist aufgrund ihres amphiphilen Charakters und ihrer biologischen Heterogenität schwierig und erfolgt daher im Allgemeinen anhand von Teilstrukturen, die mittels chemischer Vorbehandlung aus der nativen Probe erzeugt werden. Damit einher kann der Verlust labiler, biologisch aber bedeutsamer Substituenten gehen. Eine strukturanalytische Methode, die es ermöglichen würde weitgehende Strukturinformationen zu diesen Molekülen ohne chemische Vorbehandlung zu erlangen, ist demnach von großem Interesse.

Die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie ist eine vielversprechende Möglichkeit, diese modifikationsfreie Analytik zu schaffen. Sie würde die Analyse weitgehend unveränderter, heterogener Isolate von Zellmembrankomponenten ermöglichen und auch Strukturinformationen von Bestandteilen der Probe liefern können, die nur in geringen Mengen vorkommen. Bisher wurde mit dieser instrumentellen Möglichkeit fast ausschließlich chemisch modifiziertes Lipopolysaccharid untersucht, hierbei entweder das abgespaltene Oligosaccharid oder de-*O*-acyliertes Lipopolysaccharid. Nur sehr wenige Arbeiten mit unmodifizierten Molekülen wurden bisher veröffentlicht, von denen keine eine Auftrennung von Lipopolysaccharid-Molekülen zeigt.

Das Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Anlage und deren Kopplung an das hochauflösende FT-ICR Massenspektrometer. Mit der selbst gebauten Anlage sollte eine Methode etabliert werden, die bei Kopplung an das Massenspektrometer eine Trennung und Analyse amphiphiler Zellmembrankomponenten, insbesondere des Lipopolysaccharids, ermöglicht. Zusätzlich sollte eine Software-gestützte Möglichkeit entwickelt werden, um die aus der Analyse von Zellmembran-Isolaten hervorgehenden Massenspektren unter geringem Zeitaufwand auszuwerten.

2.2 Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien

Der Begriff der Gram-negativen Bakterien geht auf einen Färbetest des dänischen Bakteriologen Hans-Christian Gram zurück. Bei seinen Versuchen, einen Test zum schnellen Anfärben von Bakterien in Gewebe zu entwickeln, stellte er fest, dass es bestimmte Bakterien gab, die sich durch seinen Test nicht anfärben ließen¹. Der Grund dafür ist der unterschiedliche Aufbau der Zellhülle dieser Bakterien. Sie besitzen im Gegensatz zu den Gram-positiven Bakterien eine zweite Membran um ihre Mureinschicht. Vertreter der Gruppe der Gram-negativen Bakterien sind zum Beispiel *Escherichia coli*, *Salmonella* und *Chlamydia*.

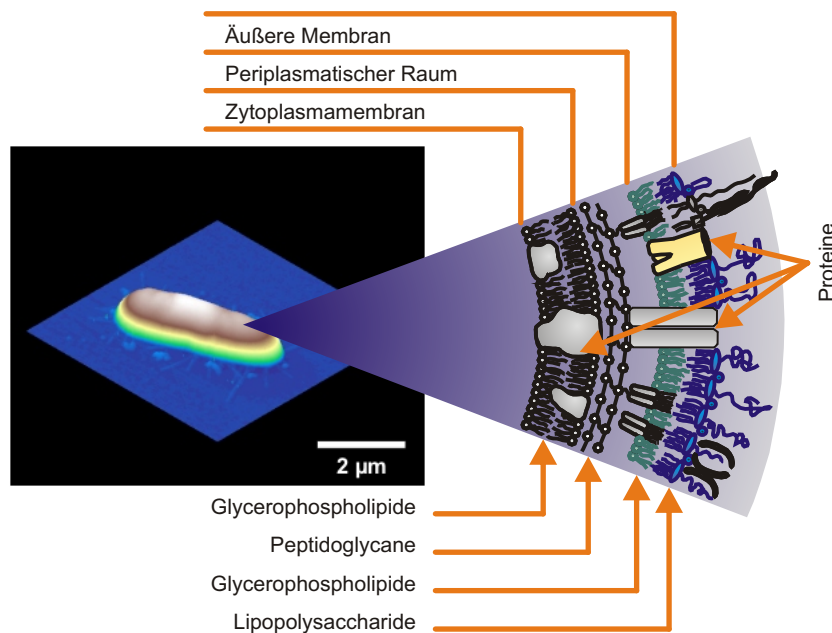


Abbildung 2.1: Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien. Die Zellhülle kann in innere Membran oder auch Zytoplasmamembran, periplasmatischer Raum und äußere Membran eingeteilt werden. Während die innere Membran aus einer Doppelschicht aus Glycerophospholipiden besteht, befinden sich auf der Außenseite der äußeren Membran Lipopolysaccharide. Links ist ein mit einem Rasterkraftmikroskop aufgenommenes Bild eines *Escherichia coli* zu sehen. Die Aufnahme wurde von Herrn Dr. Arne Böhling zur Verfügung gestellt.

¹Genau genommen beziehen sich diese Aussagen auf das Verhalten beim Entfärbeschritt. Beim Gram-Test werden alle Bakterien angefärbt, nur lässt sich diese Färbung bei Gram-negativen Bakterien im zweiten Schritt des Tests, der Behandlung mit Ethanol, auswaschen, bei Gram-positiven nicht.

Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien (siehe dazu Abbildung 2.1) besteht aus zwei Lipiddoppelschichten, der inneren und der äußeren Membran. Zwischen diesen Schichten befindet sich eine dünne Mureinschicht, der periplasmatische Raum. Die innere Membran ist ähnlich wie bei den Gram-positiven Bakterien aus Glycerophospholipiden aufgebaut. Die äußere Membran hingegen ist asymmetrisch aufgebaut, sie besteht auf der Innenseite aus Glycerophospholipiden, auf der Außenseite hingegen aus Lipopolysacchariden (kurz LPS). In diese beiden Membranen eingelagert befinden sich Proteine als funktionelle Einheiten. Sie dienen zum Beispiel zum Molekültransport durch die Membran, denn diese ist aufgrund ihres hydrophoben Charakters für hydrophile Stoffe nicht permeabel.

Die Zellhülle ist wie bei allen Organismen auch für das Überleben Gram-negativer Bakterien von essentieller Bedeutung. Sie trennt den Organismus von seiner Umwelt ab und regelt über aktive und passive Prozesse jeglichen transmembranen Transport von Molekülen. Sie ist auch bei der Bekämpfung von Bakterien erste Barriere antibakterieller Substanzen, die es zu überwinden gilt. Für einige Antibiotika ist das Durchdringen dieser Schicht unproblematisch, sie werden über Poren in der Membran, die an sich beispielsweise der Aufnahme von Nährstoffen dienen, aufgenommen und können so zum eigentlichen Wirkort gelangen. Aufgrund der zunehmenden Resistenz vieler Bakterien gegen gängige Antibiotika wird versucht, antimikrobielle Peptide einzusetzen. Dies sind im gesamten Tierreich (auch beim Menschen) vorkommende Bestandteile des angeborenen Immunsystems, die eine erste Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen darstellen [176]. Sie sind in der Regel zu groß um die Membran über die Porene zu überwinden [122] und lassen sich nach ihrem Wirkmechanismus in drei Gruppen einteilen. Einige wirken über die Komplexbildung von Ionen, die für das bakterielle Wachstum wichtig sind. Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise das in der menschlichen Haut vorkommende Psoriasin [60]. Lysozym ist ein Beispiel der zweiten Gruppe, die enzymatische Aktivität gegen Bestandteile der bakteriellen Zellhülle entfaltet. Zur dritten Gruppe gehören die membranaktiven antimikrobiellen Peptide. Sie lagern sich an der Membran an und stören physikalisch deren Integrität. Über diese Anlagerung und im weiteren Verlauf über eine Porenbildung durch diese Substanzen wird eine weitere Aufnahme ermöglicht. Dieser Vorgang wird *self-promoted uptake* genannt [65, 66]. Die Anlagerung und das weitere Eindringen dieser Peptide haben fatale Folgen für das Bakterium. Durch die zunehmende Zerstörung erst der äußeren Membran und im weiteren Verlauf auch der inneren Membran ist das Bakterium nicht mehr überlebensfähig. Der Wirkmechanismus [112] zum Abtöten der Organismen ist also ein völlig anderer der klassischer Antibiotika. Zudem zeigen Bakterien gegen diese Substanzen auch nur unter äußerst artifiziellen Bedingun-

gen Resistenzentwicklung [130]. Um diesen Mechanismus zu verstehen, auch im Hinblick auf eine mögliche Optimierung antimikrobieller Peptide, ist es wichtig alle Interaktionspartner so genau wie möglich zu kennen. Seitens der Peptide ist dies recht einfach, sie sind in ihrer Struktur aufgeklärt beziehungsweise im Falle neuer Peptide verhältnismäßig leicht aufklärbar. Die andere Seite bildet die Außenschicht der äußeren Membran, also die Lipopolysaccharide. Sie sind eine extrem heterogene Substanzklasse, unterscheiden sich von Bakterienstamm zu Bakterienstamm und auch bei variierenden Umgebungsbedingungen. Sie sind als Substanzklasse an sich aus Bakterien extrahierbar, eine weitere Auftrennung des hierbei erhaltenen komplexen LPS-Gemisches ist jedoch aufgrund ihres amphiphilen Charakters kaum möglich und macht die Strukturanalytik dieser Moleküle so schwierig. Genauer wird hierauf im Abschnitt 2.2.1 eingegangen.

Eine genaue Kenntnis der Struktur der Lipopolysaccharide ist auch bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen ihrer immunstimulatorischen Wirkung wichtig. Bei der Bekämpfung und Abtötung von Gram-negativen Bakterien, sei es nun durch den Organismus des Wirts oder durch antibakterielle Substanzen, wird LPS freigesetzt. In bestimmter Form ist Lipopolysaccharid jedoch hoch inflammatorisch und löst bereits in geringster Konzentration eine starke Immunantwort aus [84]. Es wird aufgrund dieser Eigenschaft auch als Endotoxin bezeichnet. In aller Regel ist diese Immunantwort, die dann zu lokalen Entzündungsreaktionen führt, nicht schädlich für den Wirt. Es kann jedoch passieren, dass sich die Entzündungserreger unkontrolliert im Körper ausbreiten. Als Folge dessen kann es zu einer Überreaktion des Immunsystems kommen. Die Entzündung breitet sich über den ganzen Körper aus, es kommt zur Sepsis. Trotz intensiver Behandlung endet ein hoher prozentualer Anteil solcher systemischer Infektionen tödlich [57, 59].

2.2.1 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide bestehen aus einem Lipidteil, der sie in der Membran verankert, und einem Polysaccharid, das nach außen zeigt. Eine beispielhafte schematische Darstellung des allgemeinen Aufbaus von LPS ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Der Lipidanker, Lipid A genannt, besteht aus einem $\beta(1 \rightarrow 6)$ verknüpften Glukosamin-Disaccharid, das über Ester- und Amidbindungen vierfach acyliert ist. Diese Fettsäuren können an der 3-Hydroxyl-Gruppe mit weiteren Fettsäuren verestert sein, so dass das Lipid A insgesamt bis zu sieben Fettsäuren verschiedener Länge und verschiedenen Sättigungsgrades tragen kann. An der 1- beziehungsweise der 6'-Position tragen die Glukosamine in der Regel eine Phosphatgruppe, die wiederum in nicht-stöchiometrischen Verhältnissen durch weitere Phosphatgruppen, Ethanolamine oder Monosaccha-

ride modifiziert sein kann [180]. An das Lipid A schließt sich die sogenannte Kernregion an, ein unterschiedlich langes, teilweise ebenfalls mit Ethanolaminen und Phosphatgruppen modifiziertes Oligosaccharid. Dann kann die sogenannte *O*-spezifische Kette folgen, ein Polysaccharid, das aus bis zu vierzig sich wiederholenden Einheiten von vier oder fünf Monosacchariden Länge besteht. Diese auch als *O*-Antigen bezeichnete Kette [90] ist Stamm-spezifisch. Bakterien, die diese Kette ausbilden, haben eine glatte Oberfläche, in Anlehnung an diese Eigenschaft werden die langkettigen Lipopolysaccharide als S-Form LPS bezeichnet, vom englischen Wort für glatt (*smooth*). Haben die Bakterien nicht diese lange Kette aus sich wiederholenden Einheiten, so wird das LPS R-Form LPS genannt, da die Bakterien eine rauhe (englisch *rough*) Oberfläche haben. Das LPS der Kernregion, also das R-Form LPS, kann je nach Länge weiter unterteilt werden. In der kürzesten Form, bei der nur zwei 3-Desoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonsäuren (Kdo) an das Lipid A gebunden sind, wird es Re-LPS genannt. Bakterien, die dieses LPS ausbilden, werden auch Tiefraumutanten bezeichnet. Ist die Kette in der Kernregion länger, so wird das LPS bei zunehmender Länge als Rd-LPS und so fort bezeichnet, bis hin zum LPS mit vollständiger Kernregion, dem Ra-LPS. Alle Bakterien mit Rd-LPS bis Ra-LPS heißen Raumutanten. Das Re-LPS ist das kürzeste in der Natur vorkommende [138].

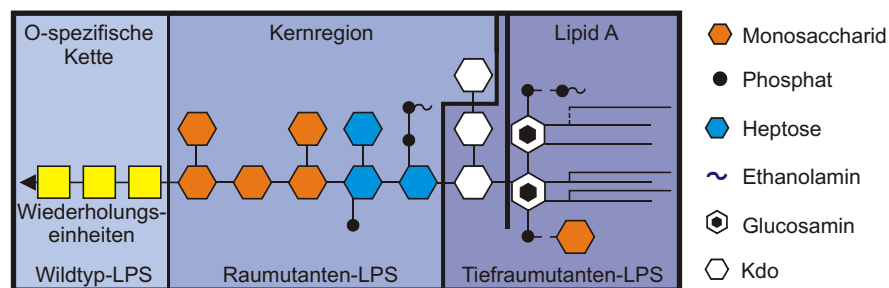


Abbildung 2.2: Lipopolysaccharide lassen sich ihrem Aufbau nach in mehrere Typen einteilen. Membranverankerndes Element ist immer das Lipid A, das bis zu sieben Fettsäuren enthalten kann und in wechselnden Anteilen, je nach Bakterienart, mit Phosphaten, Ethanolaminen und Heptosen substituiert sein kann. Dem Lipid A schließt sich ein unterschiedlich langes Oligosaccharid an, das neben den verschiedenen Kohlenhydraten ebenso Phosphate und Ethanolamine enthalten kann. Es lässt sich in eine Kernregion und eine sogenannte *O*-spezifische Kette unterteilen, wobei die *O*-spezifische Kette aus sich wiederholenden Einheiten ein und desselben Oligosaccharidmotivs besteht.

Das Lipopolysaccharid lässt sich mit der Phenol/Chloroform/Petrolether-Methode aus Bakterien extrahieren [51]. Eine weitere Auftrennung dieses heterogenen Gemisches ist äußerst schwierig. In Ansätzen ist dies mit der Dünnschichtchromatographie (kurz TLC von *thin layer chromatography*) und mit einer Variante der Gelelektrophorese möglich, der SDS-PAGE (von *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Hierbei kann eine Trennung nach der Länge des Polysaccharids des LPS erreicht werden, TLC ermöglicht in Ansätzen eine Trennung kurzkettiger LPS nach der Anzahl der Fettsäureketten. Strukturaufklärung dieser Moleküle ist ein kompliziertes Verfahren, welches den Einsatz verschiedener Techniken erfordert. In der Komponentenanalyse werden nach chemischer Aufbereitung mit photometrischen Messungen und Gaschromatographie die Bestandteile der Probe wie zum Beispiel Art der Fettsäuren und Monosaccharid-Residuen bestimmt. Die weitere strukturelle Aufklärung erfolgt dann immer an Teilstrukturen des LPS, die über chemische Modifikationen gewonnen werden. Das Oligosaccharid wird mittels milder Hydrolyse vom Lipid A getrennt und mit NMR untersucht, das Lipid A wird dann in der Regel massenspektrometrisch charakterisiert. Die de-*O*-Acylierung ist ein weiteres wichtiges Hilfsmittel. Dabei werden die Ester-gebundenen Fettsäuren abgespalten. Das daraus erhaltene LPS oder auch Lipid A ist weit weniger hydrophob und damit besser zur Untersuchung geeignet. Aus dem massenspektrometrischen Vergleich dieser Proben mit nicht modifiziertem LPS kann die Struktur des Lipid A ermittelt werden, insbesondere in Bezug auf die Verteilung der Fettsäureketten. All diese Modifikationen, insbesondere die de-*O*-Acylierung, entfernen jedoch auch labil gebundene Gruppen von biologischer Bedeutung vom LPS. Eine Möglichkeit zur genaueren Analyse von LPS ohne diese Modifikationen ist also äußerst erstrebenswert.

In dieser Arbeit wurde stellvertretend für verschiedene Formen des LPS mit Lipid A und LPS R345 von *Salmonella enterica* serovar Minnesota und mit dem LPS F515 von *Escherichia coli* gearbeitet.

2.2.2 Glycerophospholipide und Glykosphingolipide

Die innere Membran sowie auch die Innenseite der äußeren Membran bestehen aus Glycerophospholipiden. Neben diesen Membranen beziehungsweise Teilen von Membranen sind auch alle anderen in der Natur vorkommenden Biomembranen zum weitaus größten Teil aus diesen Lipiden und aus Glykosphingolipiden aufgebaut. Eine Gram-negative Spezies, *Sphingomonas*, hat anstelle der Lipopolysaccharide eine aus Glykosphingolipiden aufgebaute Außenseite der äußeren Membran.

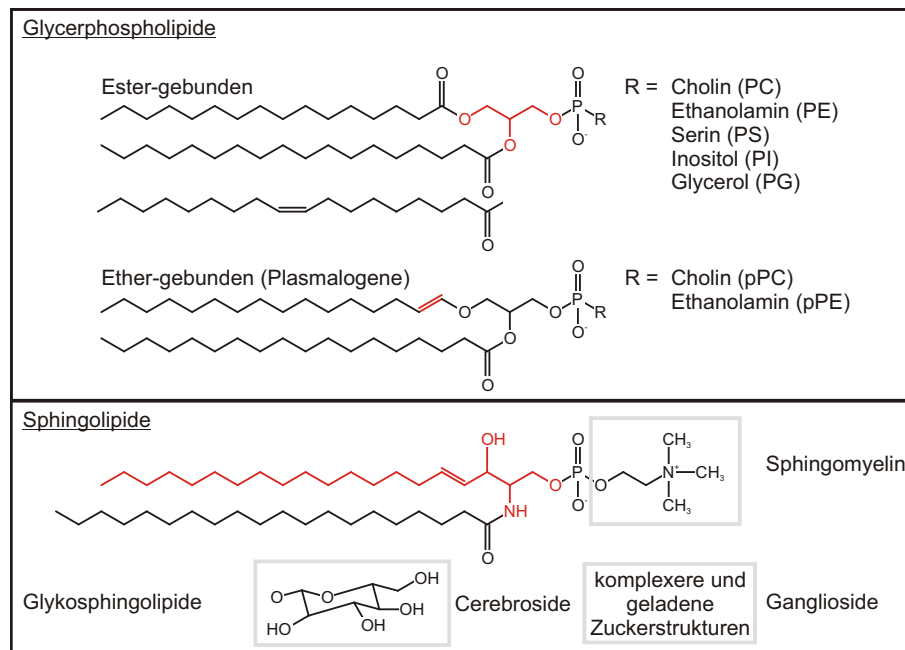


Abbildung 2.3: Eine Übersicht über Glycerophospholipide und Glykosphingolipide: Glycerophospholipide bestehen aus einem Glycerolphosphat, an das zwei Fettsäuren über Ester-Bindungen geknüpft sind, im Falle der Plasmalogene eine davon über eine Ether-Bindung. Weiterhin können sie verschiedene Kopfgruppen tragen, über die sich die Phospholipide in verschiedene Klassen einteilen lassen. Im Falle der Glykosphingolipide besteht das Grundgerüst aus einem Sphingosin, an das eine Fettsäure gebunden ist. Die Kopfgruppen sind entweder Cholinphosphat, was dann das Sphingomyelin ist, oder vielfältige Oligosaccharide, was dann die Cerebroside und Ganglioside ergibt, die zusammenfassend Glykosphingolipide genannt werden.

Auch Glycerophospholipide und Glykosphingolipide sind amphiphile Moleküle, sie lassen sich aber im Gegensatz zu Lipopolysacchariden mit der *high performance liquid chromatography* (HPLC) auftrennen. An dieser Stelle wird kurz auf den Aufbau und die Nomenklatur dieser beiden Lipid-Spezies eingegangen. Die Abbildung 2.3 zeigt den Aufbau von Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden. Erstere bestehen aus einem Glycerolphosphat-Rückgrat, das an der C-1- und der C-2-Position über Esterbindungen mit zwei Fettsäuren verknüpft ist. Über das an der C-3-Position gebundene Phosphat schließt sich eine polare Kopfgruppe an. Ist die Fettsäure in der C-1-Position statt über eine Esterbindung mit einer Etherbindung an das Glycerol gebunden, so wird diese Spezies Plasmenyl- oder Plasmanyl-Spezies genannt². Glykos-

²Plasmanyl-Spezies im Falle der einfachen Etherbindung, Plasmenyl-Spezies im Falle

phingolipide bestehen aus einem Ceramid, welches an der primären Hydroxygruppe *O*-glykosidisch ein Mono- oder Oligosaccharid als Kopfgruppe trägt. Ceramide selbst bestehen aus einem Aminoalkohol, der an der Amidgruppe eine Fettsäure trägt. Ist die Kopfgruppe des Ceramids ein Cholinphosphat, so ist dies das Sphingomyelin.

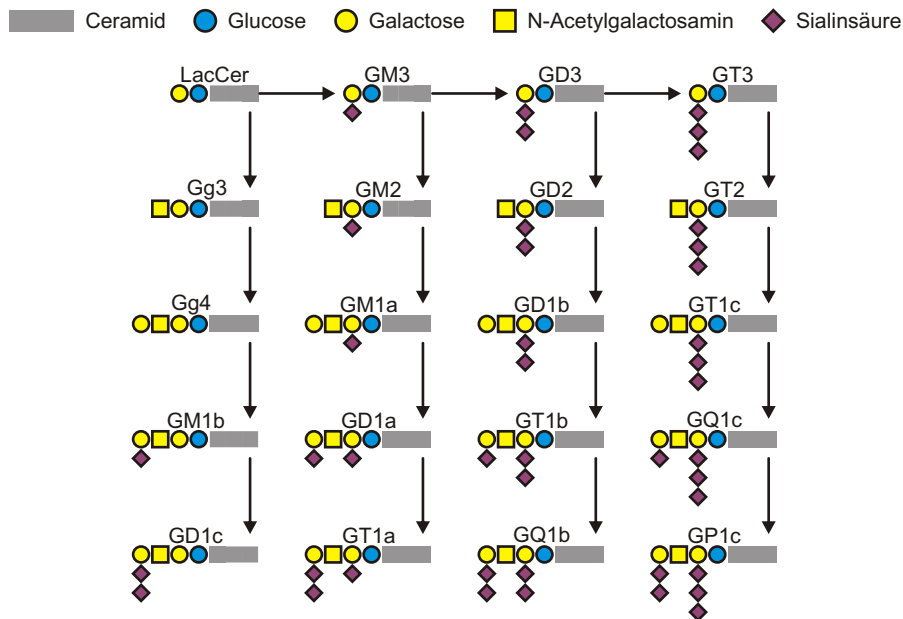


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der häufigsten Ganglioside. Die zweite, dritte und vierte Spalte entspricht jeweils der a-, b- und c-Serie. Für eine ausführliche Übersicht siehe <http://sphingolab.biology.gatech.edu>.

Neben der offiziellen Nomenklatur der IUPAC³ existieren weitere Vorschläge zur Bezeichnung und Klassifikation von Lipiden [46], da die offizielle, chemisch korrekte Bezeichnung zur sehr langen und ungünstig zu handhabenden Namen führt. Die Benennung in der Arbeit erfolgt anhand gebräuchlicher Abkürzungen, so wird zum Beispiel 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin als DOPC bezeichnet. In der entwickelten Software (siehe dazu Kapitel 5.3) werden Lipide anhand einer sich nach ihrer Kopfgruppe ergebenden Abkürzung und einer Zahlenkombination für die Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen aller Fettsäuren bezeichnet. DOPC wird somit zu PC 36:2. Diese Abkürzung der Kopfgruppe ist für die Glycerophospholipide in Abbildung 2.3 gezeigt. Glykosphingolipide mit mehr als zwei Sacchariden

einer Enoletherbindung

³International Union of Pure and Applied Chemistry

werden als Ganglioside bezeichnet, in der Nomenklatur ist die Abkürzung der Kopfgruppe jeweils an die gängige Bezeichnung des Gangliosids angelehnt. Eine Übersicht der häufigsten Ganglioside gibt Abbildung 2.4. Die korrekten chemischen Bezeichnungen sind zugeordnet zu den verwendeten Abkürzungen für die in der Arbeit verwendeten Substanzen auch im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

2.3 Strukturanalytik von Biomolekülen

Strukturanalytik ist die Aufklärung der chemischen Struktur von Molekülen, angefangen bei ihrer chemischen Zusammensetzung bis hin zur räumlichen Lage aller Atome eines Moleküls. Seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts hat diese Disziplin auch für einen Teil der Lebenswissenschaften an Bedeutung gewonnen. Mit den zunehmend besseren technischen Möglichkeiten zur Strukturaufklärung bildeten sich Forschungszweige aus, deren Forschungsinhalt eine Zuordnung von Struktur zu Funktion auf verschiedensten Ebenen ist. Es entstanden neue Teilgebiete klassischer Forschungszweige der Biologie oder Chemie, interdisziplinär und mit teilweise fließendem Übergang von einem zum anderen Gebiet. Nur beispielhaft seien hier die Biochemie, die Molekularbiologie, die Genetik oder aber auch die Biophysik genannt. Mit zunehmender Breite der Fachgebiete werden häufig auch die Begriffe Strukturanalytik und Struktur, obwohl seitens der Chemie klar definiert, unschärfer verwendet. Biomoleküle, also chemische Substanzen aus Organismen, können sehr groß sein, mit Molekulargewichten von mehreren hunderttausend atomaren Masseneinheiten⁴. Sie sind häufig Polymere, die durch Verknüpfung einer größeren Zahl von Elementen aus einer verhältnismäßig kleinen Grundmenge entstehen. Ein bekanntes Beispiel dafür sind die Proteine, die aus bis zu einigen tausend Aminosäuren zusammengesetzt sind, wobei die Grundmenge nur zwanzig verschiedene Aminosäuren umfasst⁵. Weitere Beispiele für solche Biopolymere sind Polysaccharide oder Nukleinsäuren. Für die Beschreibung solcher Strukturen sind die Begriffe Primärstruktur, Sekundärstruktur oder auch Tertiärstruktur entstanden. Die Bezeichnung Primärstruktur meint dabei die Abfolge der einzelnen Grundbausteine im Molekül, mit dem Begriff Sekundärstruktur ist die Beschreibung ihrer räumliche Anordnung zueinander gemeint. Die Tertiärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung grö-

⁴In der Biochemie und auch in der Massenspektrometrie ist die Einheit Dalton gebräuchlich, wobei ein Dalton gleich einer atomaren Masseneinheit ist. In der Arbeit wird die offizielle Einheit verwendet.

⁵Die hier genannte Anzahl bezieht sich auf die kanonischen Aminosäuren, es sind insgesamt 23 proteinogene Aminosäuren bekannt.

ßerer ähnlicher oder gleicher Strukturelemente in einem Biomolekül. Schon mit dieser Aufspaltung des Begriffs der Struktur geht auch eine ungenauere Verwendung des Begriffs Strukturanalytik einher. Je nach Fragestellung ist nicht mehr unbedingt die Kenntnis der exakten räumlichen Anordnung aller Atome im Molekül gemeint.

Für die Aufklärung der Struktur von Biomolekülen stehen eine ganze Reihe von Techniken zur Verfügung. Diese werden in der Regel kombiniert zur Strukturanalytik eingesetzt, da eine einzelne Methode meist nicht ausreichend ist, um eine Struktur genau zu klären. Neben rein chemischen Methoden haben vor allem instrumentelle Methoden wie Infrarot- und Ramanspektroskopie, Kristallstrukturanalyse, Magnetische Kernspinresonanz-Spektroskopie und die Massenspektrometrie eine große Bedeutung. Besonders die Kernspinresonanzspektroskopie, kurz NMR-Spektroskopie, vom englischen *nuclear magnetic resonance*, und die Kristallstrukturanalyse können Information über die exakte räumliche Anordnung von Atomen in großen Molekülen liefern. Ein großer Nachteil der NMR-Spektroskopie ist aber ihr recht hoher Probenbedarf aufgrund der geringen Empfindlichkeit der Messmethode. Ebenso muss die Substanz in sehr reiner Form vorliegen, dies ist für Biomoleküle oft schwierig zu erreichen. Größte Nachteile der Kristallstrukturanalyse sind, dass auch hier hochreine Proben nötig sind und es für einige Substanzklassen nahezu unmöglich ist, diese zu kristallisieren.

Die Massenspektrometrie (MS) ist dagegen in der Lage, von sehr geringen Probenmengen, je nach Substanzklasse bis in den Attomolbereich oder sogar darunter [160], und auch von Substanzgemischen weitgehende Aussagen über die Struktur zu machen. Diese Aussagen reichen zwar nicht bis zur genauen räumlichen Lage von Atomen, jedoch können Aussagen über Grundbausteine gemacht werden, aus denen der Analyt zusammengesetzt ist. Diese Aussagen reichen, in Verbindung mit weiter gehender Information von anderen Methoden, häufig aus, um eine sehr genaue Angabe zur Struktur eines Moleküls zu machen. Weiterhin sind Massenspektrometer direkt an eine ganze Reihe von chromatographischen Vortrennungsmethoden wie zu Beispiel HPLC oder der Kapillarelektrophorese, kurz CE von *capillary electrophoresis*, koppelbar. Diese Trennverfahren werden vielfach ohnehin vor einer Strukturaufklärung zur Isolation von Molekülen aus biologischen Isolaten verwendet.

2.3.1 Massenspektrometrie

Die Entwicklung der Massenspektrometrie startete in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts in der Physik mit der Messung der Isotopenzusammensetzung von Atomen [157]. Die Entwicklung moderner Massenspektrometer begann ebenfalls um diese Zeit [39]. Lange blieb die Massenspek-

trometrie jedoch eine Methode zur Isotopenforschung und auch zur Auftrennung und Anreicherung von Isotopen⁶. Die Weiterentwicklung der Massenspektrometrie fand in erster Linie im Bereich der Massenanalysatoren statt, später auch im Bereich der Ionenquellen. Mitte des letzten Jahrhunderts wurde das Flugzeit-Massenspektrometer entwickelt [152], wenige Jahre später die Paul-Falle [127]. Mitte der siebziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurde erstmals mit dem *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*, kurz FT-ICR MS, die Penning-Falle in der Massenspektrometrie eingesetzt [34]. Neueste Entwicklung in diesem Bereich ist die Orbitrap [111]. Sie erreicht eine mit FT-ICR Geräten vergleichbare Auflösung und Massengenauigkeit. Neben dieser Entwicklung der Massenanalysatoren, die den Messbereich erweiterten und vor allem immer höhere Auflösung und Massengenauigkeit ermöglichten, war die Entwicklung neuer Ionenquellen [13, 110, 120] von großer Bedeutung. Die Untersuchung größerer Biomoleküle wurde erstmals mit der *fast atom bombardment* Ionenquelle, kurz FAB [6, 7], möglich und gelangte mit Entwicklung der *electrospray ionization*, ESI [168, 169], und der *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI [83], zu ihrem Durchbruch. MALDI- und ESI-Ionenquellen ermöglichen die Ionisation von Molekülen nahezu jeder Größe und sind heutzutage die Standard-Ionenquellen im Bereich der Massenspektrometrie von Biomolekülen. Eine Modifikation der ESI-Quelle, die *desorption electrospray ionization*, DESI [154] und MALDI werden inzwischen auch zur Abrasterung von Proben oder Oberflächen genutzt. Dieses sogenannte *imaging*, also die bei solcher Abrasterung gewonnene Information in Bilder umzusetzen, ist ein stark wachsender Trend [115]. So werden zum Beispiel Gewebeproben analysiert und nach Molekülen mit spezifischer biologischer Bedeutung abgesucht, etwa zur Tumordiagnostik. Zunehmend steht hierbei auch eine Lipidanalytik im Fokus [24, 30, 76, 104, 145, 158, 167].

Für die Strukturanalytik von Biomolekülen mittels Massenspektrometrie äußerst wichtig ist die Fähigkeit vieler Massenspektrometer, aus einer komplexen Mischung von Molekülonen einzelne zu isolieren und zu fragmentieren. Diese MS/MS oder auch Tandem-MS genannte Technik ermöglicht es, über die entstehenden Fragmentionen weitgehende Information über die chemische Zusammensetzung von Proben zu erhalten. Wichtige Fragmentierungsmethoden sind dabei neben der Stoßgasfragmentierung [33, 79], abgekürzt CID oder auch CAD von den englischen Begriffen *collision induced dissociation* und *collision activated dissociation*, die Fragmentierung mittels Infrarotlaser [106, 166], IRMPD, von *infrared multiphoton dissociation*, und mittels

⁶So zum Beispiel auch zur Urananreicherung mit Zyklotrons im Rahmen des Manhattan-Projektes.

Elektronen [181], die *electron capture dissociation*, ECD. Zusammengekommen führten diese technischen Entwicklungen dazu, dass die Massenspektrometrie sehr erfolgreich im Bereich der Strukturalaytik von Biomolekülen eingesetzt wird. Sie findet für nahezu alle Substanzklassen von Biomolekülen Anwendung, sei es im Bereich der Strukturanalytik selbst oder als diagnostisches Hilfsmittel [4, 5, 35, 43, 67, 73, 91, 172, 179]. Am wohl bekanntesten ist dabei ihre Bedeutung für die Protein- und Peptidanalytik [1, 8, 15, 19, 155, 170].

2.3.2 Die Kopplung von Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese

Ein Massenspektrometer lässt sich über die ESI-Quelle mit Flüssigkeitsbasierten chromatographischen Trennverfahren koppeln. Voraussetzung hierfür ist die Anpassung der Flussrate des chromatographischen Verfahrens an die notwendigen Bedingungen der ESI-Quelle. Als zweite Voraussetzung muss sichergestellt sein, dass die Flüssigkeit als Spraylösung für die Ionenquelle dienen kann. Eine weit verbreitete Kopplung ist die Anbindung einer HPLC an ein Massenspektrometer. In der Arbeit wurde dagegen die Kapillarelektrophorese eingesetzt, da die eine HPLC nicht in der Lage ist, LPS aufzutrennen. Auch lassen sich vielfach in den LPS-Isolaten vorhandene Kontaminationen von Glycerophospholipiden nicht mittels HPLC abtrennen. Die hohe Trennleistung und das auf anderen Grundlagen basierende Trennverfahren der CE (siehe hierzu auch Kapitel 3.2) waren Gründe, diese Methode für eine LPS-Auftrennung in Erwägung zu ziehen. Auch benötigt die Kapillarelektrophorese nur sehr geringe Probenmengen, was im Falle biologischer Proben, die sich häufig nur in geringsten Mengen isolieren lassen, ein großer Vorteil im Vergleich zu anderen Methoden ist. Eine Kopplung, bei der zwischen Trennverfahren und Massenspektrometer eine direkte Verbindung besteht, wird *online* Kopplung genannt. Bei der Kapillarelektrophorese ist diese Kopplung allerdings mit größeren Schwierigkeiten als bei der HPLC verbunden. Die Flussrate einer CE-Anlage ist zu niedrig für eine ESI-Quelle. Sie muss also durch geeignete Methoden angepasst werden oder es muss eine ESI-Quelle mit geringerer Flussrate verwendet werden, die Nano-ESI-Quelle. Größeres Problem ist der Potentialausgleich zwischen der Auslass-Seite der CE-Kapillare und der ESI-Quelle. Ebenso sind die in der Regel für die Kapillarelektrophorese genutzten Elektrolyte nicht geeignet für den Elektrospray-Prozess, da sie zu hohe Ionenstärken haben oder zur Verbesserung der Trennleistung mit Detergenzien versetzt sind.

Offline, also ohne Nutzung eines Massenspektrometers als Detektor, wird die Kapillarelektrophorese in großem Maße in der pharmazeutischen und der

chemischen Industrie eingesetzt. Auch in der Molekularbiologie findet sie vielfach Verwendung zur Analyse von DNA und RNA [2, 92] oder auch zur Peptid- und Proteinanalytik [36, 40, 41, 85]. Weitere Anwendungsgebiete sind zum Beispiel die Enantiomeranalytik [28, 47] oder die Kohlenhydratanalytik [29, 44, 45, 80, 113, 128]. Wenig verbreitet ist dagegen die Anwendung zur Trennung von Glycerophospho- und Glykosphingolipiden [52, 63, 105, 171] und Lipopolysacchariden [50, 88, 89, 162]. Glycerophospholipide werden zum Teil zur Belegung von Kapillaren verwendet [17, 18, 38, 64, 70]. Die Auftrennung von Glycerophospholipiden, Glykosphingolipiden und Lipopolysacchariden muss aufgrund ihrer schlechten bis nicht vorhandenen Löslichkeit in wässrigen Elektrolyten, die in der CE Standard sind, in nicht-wässrigen Elektrolyten stattfinden. Die Technik, *nonaqueous capillary electrophoresis* (NACE) genannt, findet zunehmend für verschiedene Substanzklassen und analytische Fragestellungen in der CE Verwendung [28, 129, 137, 151]. Viele Arbeiten befassen sich mit der Untersuchung genereller Fragestellungen zur Anwendbarkeit und Funktionsweise der nicht-wässrigen CE [14, 16, 61, 125, 126, 131–136, 140, 151, 159].

Die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie wurde bereits Ende der achtziger Jahre das erste Mal beschrieben [123], genutzt wurde eine ESI-Quelle. Seitdem wurde die Kopplung mit einer Vielzahl von Ionenquellen gezeigt, so auch mit FAB [118], APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) [153], LDI (*laser desorption/ionization*) [25] und MALDI [87, 103]. Die realisierten Kopplungen schließen ebenso mehrere verschiedene Massenanalytoren ein. So wurde CE mit Flugzeitmassenspektrometern [119], Sektorfeldinstrumenten [118], Quadrupol Ionenfallen [48] und FT-ICR MS [72] gekoppelt. Die gängigste, weil unkomplizierteste Kopplung ist jedoch über die ESI-Quelle. Für die Kopplung von CE an Elektrospray sind seit ihrer Einführung eine große Anzahl an verschiedenen Designs entwickelt worden [56, 58, 75, 175], die sich grob in zwei Klassen unterteilen lassen. Die *sheath liquid* Kopplungen arbeiten mit einer zusätzlichen Flüssigkeit, um den Potentialausgleich am Kapillarende sicherzustellen und die Flussrate den Bedürfnissen der ESI-Quelle anzupassen. Die zweite Variante ist die direkte Kopplung, also die Anbindung ohne Zusatzflüssigkeit. Sie impliziert das Sprühen direkt aus der Kapillare und somit den Aufbau einer Nano-ESI-Quelle.

Die *sheath liquid* oder auch koaxiale Kopplung wurde Ende der achtziger Jahre das erste Mal gezeigt [148] und ist die am häufigsten verwendete [116]. Sie gilt als reproduzierbarer und stabiler als direkte Kopplungen [107, 108, 121, 124, 146, 149, 156], hat jedoch den Nachteil der Verdünnung der Probe durch das *sheath liquid* [149]. Eine ganze Reihe von Arbeiten befassen sich mit den technischen Details der Kopplung. So wurde der Einfluss

des *sheath liquid* auf die Spraystabilität, Nachweisempfindlichkeit und dessen eventuelles Eindringen in die CE-Kapillare untersucht. Ebenso wurde die Flussrate thematisiert. Weitere Arbeiten erörterten den Einfluss des Zerstäubergases und die genaue Position der Kapillare relativ zur Zuleitung des *sheath liquid* [69, 93, 94].

Die direkte Kopplung lässt sich in drei Gruppen von Konstruktionen unterteilen, wobei jedoch in jeder Gruppe eine Reihe von verschiedenen Detaillösungen gezeigt wurde [3, 9, 11, 20, 26, 27, 31, 32, 74, 77, 82, 86, 114]. Bei der direkten Kopplung entfällt die Möglichkeit des Potentialausgleichs über die zusätzliche Flüssigkeit. Dies wird entweder durch Beschichtung des Kapillarendes mit leitendem Material, über Teilen der Kapillare und Kontakt dieser Bruchstelle mit einem Flüssigkeitsbad oder einer Elektrode oder über Kontakt einer Flüssigkeit oder Elektrode über kleinste Löcher in der Kapillarwand erreicht. Jedoch erreicht die direkte Kopplung bisher nicht die Langzeitstabilität und Haltbarkeit des coaxialen Aufbaus. Schließlich ist noch der Durchmesser der Sprayspitze und dessen Zusammenhang zur verwendeten CE-Kapillare und zur Flussrate ein entscheidender Punkt, der bei Konstruktion einer Nano-ESI-Kopplung zu berücksichtigen ist.

Eine ganz andere Möglichkeit der direkten Kopplung wird über Chip-basierte Systeme versucht, bei denen die Kapillarelektrophorese nicht in dünnen Glaskapillaren, sondern in kleinen, in Quarz oder Glas geätzten Kanälen durchgeführt wird. Diese Chips können auch direkt einen Emitter für eine Nano-ESI-Kopplung implementiert haben [147, 163, 164, 177, 178]. Etwas Abseits stehen Entwicklungen, die nicht mit der Kopplung in Zusammenhang stehen. Aufkonzentrierung der Probe in der Kapillare [71, 78] oder auch MS-kompatible Belegung der Kapillare [54] sind jedoch auch Gegenstand aktueller Arbeiten. Die Anwendungen der CE-MS-Kopplung sind vielfältig, der größte Teil beschränkt sich jedoch auf die Analyse von Peptiden [68, 117] und Oligosacchariden [141, 142, 144, 150, 173]. Zur CE-MS-Kopplung mit Phospholipiden, Gangliosiden oder Lipopolysacchariden sind bis dato nur sehr wenige Arbeiten erschienen [42, 53, 81, 95–102, 139, 174]. Hierbei konnte bisher keine Auftrennung unmodifizierter Lipopolysaccharide erreicht werden. Zum Teil wird das chemisch abgespaltene Oligosaccharid eines Lipopolysaccharides mittels CE-MS aufgetrennt und untersucht [10, 49].

Kapitel 3

Methoden

Die Kopplung eines Flüssigkeits-basierten Trennverfahrens wie der Kapillarelektrophorese an ein Massenspektrometer über die Elektrospray-Ionenquelle erscheint zwar nahe liegend, ist jedoch nicht unproblematisch. Um auf die mit der Kopplung entstehenden Probleme und Einschränkungen eingehen zu können und um damit das weitere Vorgehen in der Arbeit nachvollziehen zu können, sollen an dieser Stelle sämtliche verwendeten Methoden erläutert werden, insbesondere die ihnen zugrunde liegende Theorie. In einem weiteren Abschnitt dieses Kapitels soll dann allgemein das experimentelle Vorgehen erläutert werden, das häufig in den Problematiken der verwendeten Methoden begründet liegt. Hier werden auch allgemeine Anmerkungen zur Auswertung der Daten gemacht.

3.1 Massenspektrometrie

Der Aufbau eines Massenspektrometers lässt sich in drei Bestandteile gliedern, die Ionenquelle, den Massenanalysator und den Detektor. Dieses grundlegende Bauprinzip eines Massenspektrometers ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. In einer Ionenquelle werden die zu untersuchenden Substanzen aus fester oder flüssiger Phase intakt in die ionisierte Gasphase überführt. Im Massenanalysator werden die Ionen dann nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis getrennt. Daher ist in Massenspektren immer das Masse- zu Ladungsverhältnis und nicht die Masse eines Moleküls angegeben. Massenanalysatoren können nach verschiedenen physikalischen Prinzipien funktionieren. Die Unterschiede im Funktionsprinzip definieren die Art des Massenspektrometers. Nach der Auftrennung der Ionen im Analysator werden diese von einem Detektor nachgewiesen. Auch hierfür stehen eine ganze Reihe an verschiedenen Technologien zur Verfügung. Bei einigen Massenspektrometern sind

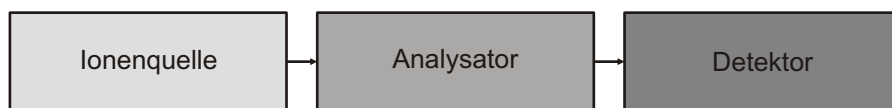


Abbildung 3.1: Allgemein gesehen besteht ein Massenspektrometer aus drei Komponenten, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Analysator und Detektor sind nicht unbedingt baulich getrennte Geräte.

Detektor und Analysator keine räumlich getrennten Instrumente, sondern der Analysator kann gleichermaßen auch als Detektor eingesetzt werden. Im Folgenden soll nun auf das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer eingegangen werden. Zusätzlich wird ausführlicher auf die verwendete Ionenquelle eingegangen, da sie bei der Kopplung die Schnittstelle von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer ist.

3.1.1 Ionenbewegung, Anregung und Detektion im FT-ICR Massenspektrometer

Im Laufe der Entwicklung der Massenspektrometrie wurden eine ganze Reihe von unterschiedlichen Massenanalysatoren entwickelt. Eine Klasse davon stellen die Ionenfallen dar, für deren Entwicklung der Physik-Nobelpreis 1989 (zum Teil) vergeben wurde¹. Neben der Möglichkeit, Ionen nur durch elektrische Felder einzufangen wie dies bei der Paul-Falle [127] oder auch in der Orbitrap [111] gemacht wird, gibt es auch die Möglichkeit, Ionen mithilfe eines Magnetfeldes und eines elektrischen Feldes einzufangen. Diese Bauform ist die Penning-Falle und wird im FT-ICR MS verwendet. Ihre Anwendung in der Massenspektrometrie fand die Penning-Falle erstmals Mitte der Siebziger Jahre des Zwanzigsten Jahrhunderts [34] mit der Detektion von positiv geladenen Methanionen. Seitdem wurde die Technik auf vielfältige Weise weiter entwickelt und ist heute die massenspektrometrische Methode mit der höchsten möglichen Auflösung und Massengenauigkeit.

Die Penning-Falle gibt es in verschiedenen Bauformen, die in dem verwendeten Massenspektrometer realisierte Variante [21] ist in Abbildung 3.2 skizziert, ebenso dazu die Ionenbewegung. Zur Berechnung der Ionenbewegung in einer Penning-Falle können die aufgrund der anliegenden elektrischen und magnetischen Felder auf ein Ion wirkenden Kräfte betrachtet werden. Zum einen wirkt auf das Ion die aus dem homogenen Magnetfeld, welches in axialer

¹Der Physik-Nobelpreis wurde in jenem Jahr an Wolfgang Paul, Hans Georg Dehmelt und Norman Forster Ramsey vergeben. Paul erhielt ihn hierbei für die Entwicklung der Paul-Falle, Dehmelt für die Entwicklung der Penning-Falle.

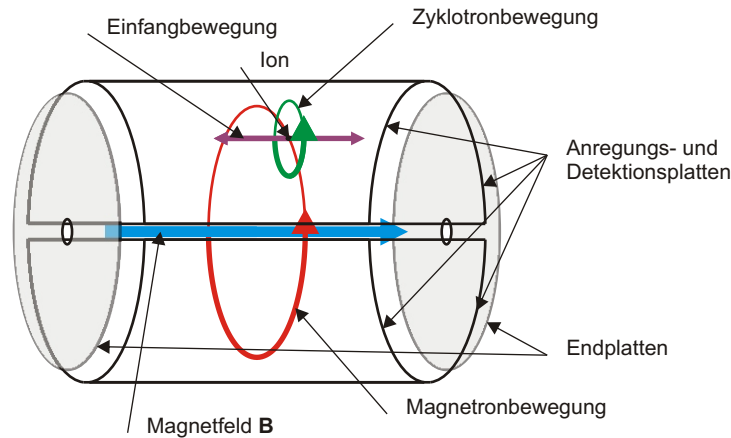


Abbildung 3.2: Im FT-ICR MS vollziehen die Ionen in der Messzelle eine komplizierte Bewegung. Durch das anliegende Magnetfeld \vec{B} werden die Ionen auf eine Kreisbahn gezwungen, die Zyklotronbewegung. Um ein Ausbrechen der Ionen in axialer Zellrichtung zu verhindern, wird ein statisches elektrisches Feld an den Endplatten angelegt. Durch die restliche kinetische Energie in axialer Richtung und durch dieses elektrische Feld oszillieren die Ionen auch parallel zur Längsachse der Zelle (Einfangbewegung). Die Magnetronbewegung wiederum wird ebenfalls durch das angelegte elektrische Feld an den Endplatten verursacht. Die beiden letzten Frequenzen sind jedoch um einige Größenordnungen kleiner als die Zyklotronfrequenz, über die die Masse- zu Ladungsbestimmung erfolgt.

Zellrichtung anliegt, resultierende Lorentz-Kraft. Für ein Ion mit der Ladung q und der Geschwindigkeit \vec{v} gilt daher unter Einfluss eines Magnetfeldes \vec{B} :

$$\vec{F} = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (3.1)$$

Die Zentrifugalkraft wird dem entgegen, so dass mit Newtons Bewegungsgleichung und m als Masse des Ions folgt:

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (3.2)$$

Die Lorentz-Kraft hat, wie aus dem Kreuzprodukt ersichtlich ist, keinen Einfluss auf die Bewegung der Ionen in Richtung längs der Zellachse. Wird der Schnitt orthogonal zur Längsachse betrachtet, so bewegen sich die Ionen auf Kreisbahnen in dieser Ebene. Stellt die Zellachse die z -Richtung in einem kartesischen Koordinatensystem dar, so liegen in der Ebene orthogonal dazu die x -Achse sowie die y -Achse. Werden nun die Beträge der Geschwindigkeit

der Ionen auf ihrer Kreisbahn in dieser Ebene, v_x in x-Richtung und v_y in y-Richtung, zu $v_{xy} = \sqrt{v_x^2 + v_y^2}$ zusammen gefasst, so folgt mit Gleichung 3.2:

$$\frac{mv_{xy}^2}{r} = qv_{xy}B_0 \quad (3.3)$$

Hier ist r der Radius der Kreisbewegung in der xy-Ebene, B_0 ist der Betrag der Magnetfeldes. Mit der Winkelgeschwindigkeit $\omega = \frac{v_{xy}}{r}$ folgt:

$$m\omega^2r = qB_0\omega r \quad (3.4)$$

Aus einer einfachen Umformung folgt die Zyklotrongleichung, welche die Ionenbewegung in einem FT-ICR MS vereinfacht beschreibt. Aus ihr geht die Messgröße, das Masse- zu Ladungsverhältnis, hervor:

$$\omega = \frac{qB_0}{m} = \omega_z \quad (3.5)$$

und somit:

$$\frac{m}{q} = \frac{B_0}{\omega_z} \quad (3.6)$$

Die Frequenz der Zyklotronbewegung ergibt sich somit zu $\nu_z = \frac{\omega_z}{2\pi}$. Das Masse- zu Ladungsverhältnis wird in einem Massenspektrum auf der Abszisse angegeben. Im Massenspektrum wird jedoch z statt q als ein Vielfaches des Elementarladung e angegeben, die Masse wird in u angegeben. Ebenso ist auch Gleichung 3.5 ersichtlich, dass die Frequenz, also der eigentliche Messwert in einem FT-ICR MS, nicht von der Geschwindigkeit und somit dem Bahnradius der Ionen abhängig ist.

Neben dem Einfangen der Ionen in der xy-Ebene durch das Magnetfeld ist auch ein Einfangen in z-Richtung nötig. Wie bereits zu Gleichung 3.2 angemerkt, hat das Magnetfeld keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitskomponente der Ionen in z-Richtung. Diese ist aber durch den Einlass der Ionen in die Zelle aus dieser Richtung ungleich Null. Um die Ionen auch in dieser Richtung in der Messzelle zu halten, sind an deren Enden zwei Endplatten, an denen ein statisches elektrisches Potential anliegt, welches von gleicher Polarität wie die Ionen ist (Abbildung 3.2). Dieses Potential ruft ein elektrisches Feld in der Zelle hervor, durch das auf die Ionen weitere Kräfte als nur Lorentz-Kraft und Zentrifugalkraft wirken. Wird das Feld in z-Richtung betrachtet, so nimmt die Feldstärke zur Mitte der Zelle hin ab, ist jedoch auch dort nicht gleich Null. Die seitlichen Elektroden der Messzelle, die zur Anregung und Detektion der Ionen dienen, haben Erdpotential. Somit ergibt sich in x-Richtung und auch in y-Richtung betrachtet ein Feld, das in der

Mitte am stärksten ist und nach außen hin abnimmt. Dies hat zur Folge, dass die Ionen zwar in z-Richtung immer eine Kraft erfahren, die sie in Richtung der Zellmitte (in z-Richtung betrachtet) zieht, jedoch in der xy-Ebene eine Kraft, die immer der Lorentz-Kraft entgegen wirkt und die Ionen nach außen zieht. Dies hat Folgen für die Ionenbewegung in der Zelle, die nun betrachtet werden sollen. Zur Berücksichtigung des Einflusses des zusätzlichen elektrischen Feldes muss Gleichung 3.1 um einen Term für das elektrische Feld \vec{E} erweitert werden:

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad (3.7)$$

Ein elektrisches Feld berechnet sich nach $\vec{E} = -\nabla\Phi$ aus einem elektrischen Potential Φ . Dieses von der Ladungsverteilung im Raum abhängige Potential berechnet sich aus der Laplace-Gleichung:

$$\nabla^2\Phi(x, y, z) = 0 \quad (3.8)$$

Eine allgemeine Lösung dieser Differentialgleichung unter Berücksichtigung von Zellgeometrie und dem elektrischen und magnetischen Feld, und mit $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ als radialer Position der Ionen in der xy-Ebene lautet [127]:

$$\Phi(r, z) = V_t(\gamma + \frac{\alpha}{2a^2}(2z^2 - r^2)) \quad (3.9)$$

Hierbei ist a der Abstand der Endplatten voneinander, V_t ist die an ihnen anliegende Spannung. α und γ sind Formfaktoren, die von der Bauform der Ionenfalle abhängen. Wird nun die Kraft auf die Ionen aufgrund des elektrischen Feldes $F_{el} = -q\nabla\Phi(r, z)$ betrachtet, so kann die Bewegung der Ionen in z-Richtung bestimmt werden:

$$m \frac{d^2z}{dt^2} = -q\nabla_z(V_t(\gamma + \frac{\alpha}{2a^2}(2z^2 - r^2))) \quad (3.10)$$

Hieraus folgt:

$$\frac{d^2z}{dt^2} + \frac{2qV_t\alpha}{ma^2}z = 0 \quad (3.11)$$

Als Lösung dieser Differentialgleichung ergibt sich mit t als Zeit und z_0 als Ausgangsposition:

$$z(t) = z_0 \cos(\omega_t t) \quad (3.12)$$

mit:

$$\omega_t = \sqrt{\frac{2qV_t\alpha}{ma^2}} \quad (3.13)$$

Dies kann wieder über die Beziehung $\nu = \frac{\omega}{2\pi}$ in die zugehörige Frequenz umgerechnet werden:

$$\nu_t = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2qV_t\alpha}{ma^2}} \quad (3.14)$$

Diese Frequenz beschreibt die Oszillation der Ionen in z-Richtung zwischen den Endplatten, sie wird auch *trapping*-Frequenz genannt. Aus $F_{el} = -q\nabla\Phi(r, z)$ folgt jedoch wie bereits erwähnt nicht nur eine Kraftkomponente, welche die Ionen in z-Richtung immer zur Zellmitte treibt, sondern ebenso eine Komponente, welche die Ionen in der xy-Ebene, also in r-Richtung, von der Zellachse weg zieht. Diese ist also der Lorentz-Kraft entgegen gerichtet:

$$F_{el,r} = -q\nabla_r(V_t(\gamma + \frac{\alpha}{2a^2}(2z^2 - r^2))) = \frac{qV_t\alpha}{a^2}r \quad (3.15)$$

Wird Gleichung 3.4 um diesen Term für das elektrische Feld erweitert, so wird eine in ω quadratische Funktion erhalten:

$$\omega^2 - \frac{qB_0\omega}{m} + \frac{qV_t\alpha}{ma^2} = 0 \quad (3.16)$$

Auch hier ist wieder zu erkennen, dass die auftretende Frequenz unabhängig von der Position und der Geschwindigkeit der Ionen in der Zelle ist. Das Lösen dieser Gleichung und Einsetzen von $\nu = \frac{\omega}{2\pi}$ führt jedoch im Gegensatz zu Gleichung 3.4 zu zwei Lösungen und somit auch zu zwei Frequenzen:

$$\nu_+ = \frac{\nu_z}{2} + \sqrt{\left(\frac{\nu_z}{2}\right)^2 - \frac{\nu_t^2}{2}} \quad (3.17)$$

und:

$$\nu_- = \frac{\nu_z}{2} - \sqrt{\left(\frac{\nu_z}{2}\right)^2 - \frac{\nu_t^2}{2}} \quad (3.18)$$

mit der Oszillation in z-Richtung ν_t und der ungestörten Zyklotronfrequenz ν_z . Die Gleichung 3.17 beschreibt die reduzierte Zyklotronfrequenz, Gleichung 3.18 die sogenannte Magnetronfrequenz. Für den Fall einer idealen Penning-Falle, also unendlich weit voneinander entfernten Endplatten und somit quasi ohne das zugehörige elektrische Feld wäre $\nu_t = 0$. Dann ginge die reduzierte Zyklotronfrequenz in die ungestörte Zyklotronfrequenz über und die Magnetronfrequenz würde verschwinden. Diese Beschreibung enthält also die Lösung für den Fall, dass nur ein Magnetfeld anliegt, als Spezialfall. Die Magnetronfrequenz wird jedoch in der Regel in einem FT-ICR MS nicht detektiert, sie liegt zwischen einem und einhundert Hertz und ist

damit um einige Größenordnungen kleiner als die Zyklotronfrequenz, die sich im Kilohertz- bis Megahertzbereich bewegt. Die Bewegung von Ionen in der ICR-Zelle ist demnach die Superposition dreier Einzelbewegungen. Dies ist zum einen die Bewegung zwischen den Endplatten mit der Frequenz ν_t , dann die Zyklotronbewegung mit der Frequenz ν_z beziehungsweise der reduzierten Zyklotronfrequenz ν_+ . Schließlich gibt es noch die Magnetronbewegung um die Zellachse herum mit der Frequenz ν_- . Werden die Bahnradien der Zyklotronbewegung über ihre mittlere Energie, die sie aufgrund der Brownschen Molekularbewegung haben, abgeschätzt, so ergibt sich für ein einfach geladenes Ion mit einer Masse von 100 u in einem Magnetfeld von 7 T ein Bahnradius von etwa 0,03 mm. Es hat dabei eine kinetische Energie von etwa 0,02 eV und kreist mit einer Zyklotron-Frequenz von etwa 1,07 MHz.

Nachdem die Bewegung der Ionen in der Messzelle betrachtet wurde, soll nun auf Manipulationsmöglichkeiten dieser Bewegung und auf die Detektion der Ionen eingegangen werden. In Abbildung 3.2 sind neben den Endplatten auch vier Elektroden an den Seiten der ICR-Zelle zu erkennen. Über elektrische Wechselfelder, die an diese Elektroden angelegt werden, können die Bewegungen der Ionen beeinflusst werden. Die Zyklotronfrequenz wird über Spiegelströme gemessen, welche die Ionen beim Oszillieren in der Zelle in der xy-Ebene in die seitlichen Elektroden induzieren. Werden nur ein kreisendes Ion und zwei sich gegenüber liegende Detektorplatten betrachtet, so erzeugt dieses abwechselnd in den beiden Platten eine Spiegelladung. Werden diese beiden Platten verbunden, so wird kommt es durch die Spiegelladung jeweils zu einer Ladungsverschiebung, es fließt ein Strom. Da das Ion die Spiegelladung abwechselnd in der einen und der anderen Platte erzeugt, wird ein Wechselstrom erzeugt, der genau dieselbe Frequenz hat wie die Zyklotronfrequenz des Ions. Somit kann durch Messung der Wechselstromfrequenz über Gleichung 3.5 das Masse- zu Ladungsverhältnis des Ions bestimmt werden. Die Amplitude des erzeugten Stroms ist abhängig von der Anzahl der Ionen, die ihn erzeugen, sowie von ihrem Abstand zur Detektorplatte. Der Vorgang der Anregung und Detektion ist in Abbildung 3.3 skizziert.

Ein einzelnes Ion mit der Ladung q erzeugt in zwei Platten mit dem Abstand b an einer Stelle x eine Ladungsdifferenz $\Delta Q(t)$:

$$\Delta Q(t) = -\frac{2qx(t)}{b} \quad (3.19)$$

Der messbare Strom I ergibt sich nun aus der Zeitableitung dieser Gleichung:

$$I(t) = \frac{d\Delta Q(t)}{dt} = -\frac{2qv_x}{b} \quad (3.20)$$

mit v_x als Geschwindigkeit des Ions in x-Richtung, also orthogonal zu den Platten. Das Signal wird also mit steigendem v_x , also größerem Bahnradius, und mit höherem Ladungszustand stärker.

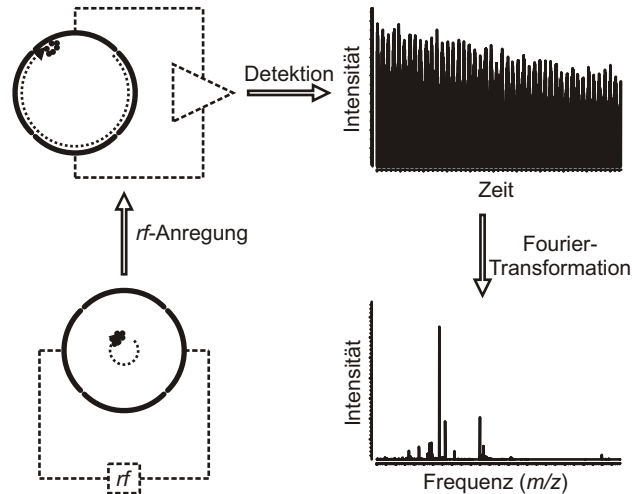


Abbildung 3.3: Die in der FT-ICR Zelle kreisenden Ionen werden zur Detektion mittels eines rf -Signals auf den äußeren Platten der Zelle angeregt. Als Folge dessen vergrößert sich ihr Bahnradius und sie induzieren einen größeren Spiegelstrom in den Wandplatten. Dieser wird gemessen, verstärkt und Fourier-transformiert, um die Signale aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne zu überführen, welche proportional zum Masse- zu Ladungsverhältnis ist.

Werden nun Ionen in die Messzelle gebracht, so ist die Phase ihrer Zyklotronfrequenz statistisch verteilt und die durch sie erzeugten Ströme mitteln sich zu Null. Sollen die Zyklotronfrequenzen dieser Ionen gemessen werden, so müssen sie erst in Phase gebracht werden. Außerdem sollten sie nach Gleichung 3.20 so nahe wie möglich an die Detektorplatten herangeführt werden, damit der erzeugte Strom so groß wie möglich ist und damit die Nachweisempfindlichkeit maximiert wird. Um die Ionen auf große Bahnradien zu bringen und um ihre Bewegung in Phase zu bringen, werden sie über ein zweites Paar Elektroden angeregt, den Anregungsplatten. Wird an diese Platten ein sinusförmig oszillierendes elektrisches Feld mit der Zyklotronfrequenz angelegt, so gilt mit \vec{j} als Einheitsvektor in y-Richtung:

$$\vec{E}(t) = E_0 \cos(\omega_z t \vec{j}) \quad (3.21)$$

Unter der Annahme, dass das Feld von zwei unendlich ausgedehnten, ebenen Platten im Abstand d zueinander erzeugt wird, an denen eine Wech-

selspannung mit der Amplitude V_p anliegt, ergibt sich $E_0 = \frac{V_p}{d}$. Ein linear polarisiertes elektrisches Feld kann in zwei gegenläufige zirkular polarisierte Felder $\vec{E}_L(t)$ und $\vec{E}_R(t)$ zerlegt werden. Es kann also geschrieben werden als $\vec{E}(t) = \vec{E}_L(t) + \vec{E}_R(t)$. Mit \vec{i} als Einheitsvektor in x-Richtung sind diese Feldkomponenten beschreibbar als:

$$\vec{E}_L(t) = \frac{E_0}{2} \cos(\omega_z t \vec{j}) - \frac{E_0}{2} \sin(\omega_z t \vec{i}) \quad (3.22)$$

und als:

$$\vec{E}_R(t) = \frac{E_0}{2} \cos(\omega_z t \vec{j}) + \frac{E_0}{2} \sin(\omega_z t \vec{i}) \quad (3.23)$$

Die Komponente $\vec{E}_R(t)$ fügt also den Ionen Energie zu, wenn sie in dieselbe Richtung wie das Ion dreht und auch dessen Zyklotronfrequenz hat. Dahingegen dreht sich die Komponente $\vec{E}_L(t)$ entgegengesetzt zum Ion in um $2\omega_z$ in der Phase versetzt. Während also $\vec{E}_R(t)$ die kinetische Energie des Ions und damit seinen Bahnradius vergrößert, hat die Komponente $\vec{E}_L(t)$ bereits nach wenigen Umläufen keinen Einfluss mehr. Als zweiten Effekt des elektrischen Wechselfeldes werden die Ionen in Phase gebracht, sind also nun detektierbar. Die Erhöhung der kinetischen Energie durch dieses Feld ist erheblich, sodass das vorhin betrachtete Ion mit der Masse von 100 u, wenn es auf einen Bahnradius von 1 cm gebracht wird, nun eine kinetische Energie von etwa 2350 eV hat. Der Radius des Ions wird über die Amplitude der Anregung V_p und über die Anregungszeit t_a bestimmt:

$$r = \frac{E_0 t_a}{2B_0} = \frac{V_p t_a}{2dB_0} \quad (3.24)$$

Im Falle einer nicht idealen Zelle, also einer nicht unendlich ausgedehnten Zelle mit ebenso eventuell nicht ebenen Anregungsplatten muss noch ein Korrekturterm β als ein Formfaktor eingeführt werden:

$$r = \frac{\beta V_p t_a}{2dB_0} \quad (3.25)$$

Zusammen mit den bereits in Gleichung 3.9 eingeführten Formfaktoren α und γ sind nun alle von der Geometrie der Zelle abhängigen Variationen in den Feld- und Bewegungsgleichungen eingeführt. Die Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht für die Werte dieser Formfaktoren bei einigen möglichen Zellgeometrien.

Tabelle 3.1: Werte für die Formfaktoren α , β und γ in Abhängigkeit der Zellgeometrie einer Penning-Falle

Bauform	Abstand der Endplatten	Abstand der Anregungsplatten	α	β	γ
ideal	∞	∞	4	1	$\frac{8}{3}$
kubisch	a	$d = a$	2,7737	0,7217	$\frac{1}{3}$
zylindrisch	a	d	2,8404	0,8082	0,2787
<i>infinity</i>	a	d	2,8408	$\approx 0,9$	0,2787

Bei der Messung werden nun die Zyklotronfrequenzen aller Ionen gleichzeitig aufgezeichnet. Dazu werden zuerst die Ionen in der Zelle über das Anlegen einer Frequenzpulses [34, 62] an den Anregungsplatten auf möglichst große Bahnradien gebracht, um dann den von ihnen erzeugten Spiegelstrom zu messen. Resultat ist eine Überlagerung aller Ionensignale mit ihren Intensitäten als Funktion der Zeit, der Transient. Über die Fourier-Transformation wird das Signal von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt. Allgemein lauten die Fourierintegrale:

$$f(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) e^{-i\omega t} d\omega \quad (3.26)$$

und:

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (3.27)$$

Die Fourier-Transformation liefert umso bessere Ergebnisse bei der Umwandlung von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne, je größer t wird, also je länger gemessen werden kann. Es gibt allerdings experimentell bedingte Umstände, die eine beliebige Ausdehnung der Messzeit verhindern. In der Messzelle herrscht kein perfektes Vakuum, sodass es zu Stößen der Ionen mit den Restgasmolekülen kommt. Ein bestimmter Restdruck in der Messzelle hat eine bestimmte Frequenz dieser Stöße zur Folge, durch die sich die kinetische Energie der Ionen verringert. Ihr Bahnradius wird also kleiner, das von ihnen erzeugte Signal mit der Zeit schwächer. Dieses Phänomen führt zu einer exponentiellen Abnahme der Signalintensität des Transienten [12, 165]. Die Ionen in der Zelle haben alle das gleiche Ladungsvorzeichen. Da sich gleichnamige Ladungen jedoch abstoßen, geht die Kohärenz der Ionenwolke nach erfolgter Anregung zwangsläufig mit der Zeit verloren. Neben diesen unvermeidbaren experimentellen Randbedingungen ist es bei Experimenten, bei denen das Massenspektrometer als Detektor eines chromatographischen

Trennverfahrens benutzt wird, häufig von Interesse, dabei eine hohe Zeitauf-
 lösung zu erzielen, also möglichst viele Massenspektren pro Zeiteinheit zu er-
 stellen. Auch hier wird, wenn auch aus ganz anderen Gründen, dem Erreichen
 einer hohen Auflösung über möglichst lange Messzeiten entgegen gewirkt.

Eine einfache Betrachtung liefert eine Abschätzung über die Massenauf-
 lösung eines FT-ICR MS. Die Massenauf-
 lösung ist allgemein als das Verhältnis $\frac{m}{\Delta m}$
 definiert. Hierbei ist Δm die Breite des zu m gehörenden Signals bei 50% der
 maximalen Signalintensität. Differenzieren der Gleichung 3.5 nach m und
 ersetzen des differentiellen d durch das Δ , ergibt:

$$\frac{m}{\Delta m} = -\frac{qB_0}{m} \frac{1}{\Delta\omega_z} = -\frac{\omega_z}{\Delta\omega_z} \quad (3.28)$$

Hieran ist zum Einen zu erkennen, dass sich die Massenauf-
 lösung durch Erhöhung der magnetischen Flussdichte B_0 erhöhen lässt. Zum Anderen ist
 eine Eigenart des FT-ICR MS ablesbar, nämlich dass die Auflösung vom
 Masse- zu Ladungsverhältnisses abhängt. Dies ist grundsätzlich anders als
 zum Beispiel bei Flugzeitmassenspektrometern.

3.1.2 Die Elektrospray-Ionisation

ESI ist neben MALDI eine der beiden Ionisierungstechniken, die es ermög-
 licht haben große Biomoleküle intakt massenspektrometrisch zu untersuchen.
 Die Bedeutung der Entwicklung dieser beiden Ionisierungstechniken unter-
 streicht unter anderem die Vergabe des Chemie-Nobelpreises (in Teilen) dafür
 im Jahre 2002². Ein offensichtlicher Vorteil der ESI-Quelle ist, dass sie sich als
 Flüssigkeits-basierte Ionenquelle direkt mit Flüssigkeits-basierten chromato-
 graphischen Trennverfahren wie zum Beispiel der HPLC oder auch der Kapil-
 larelektrophorese koppeln lässt. Trotzdem gibt es dabei einige Einschrän-
 kungen, die sich aus den Eigenschaften des Elektrospray-Prozesses ergeben.
 Darum soll an dieser Stelle die Funktionsweise einer ESI-Quelle und deren
 Aufbau kurz erläutert werden, zusammen mit der Darstellung einiger Grund-
 bedingungen, die bei der Elektrospray-Ionisation zu beachten sind.

Die Abbildung 3.4 zeigt schematisch den Aufbau einer ESI-Ionenquelle und
 das Prinzip des Elektrospray-Prozesses. Durch eine geerdete, dünne Kapil-
 lare wird die Spraylösung mit dem darin gelösten Analyten gepumpt und
 mit Hilfe eines Zerstäubergases versprüht. In einem Abstand von wenigen
 Zentimetern befindet sich gegenüber der Spitze des Sprayers der Eingang
 des Massenspektrometers. Dieser besteht aus einer planaren Elektrode, die

²Der Chemie-Nobelpreis wurde 2002 an John B. Fenn, Koichi Tanaka und Kurt Wü-
 thrich vergeben. Fenn und Tanake erhielten den Preis hierbei für die Entwicklung sanfter
 Ionisationsmethoden zur massenspektrometrischen Analyse von Biomolekülen.

auf einem Potential von einigen Kilovolt liegt und mittig eine Öffnung hat. Dahinter, auf einem nochmals einige Hundert Volt höheren Potential befand sich das Ende einer Glaskapillare, die von einem geheizten Trockengas umströmt wird, welches aus der Öffnung der planaren Elektrode tritt. Unter dem Einfluß des elektrischen Feldes zwischen der planaren Elektrode und der Spitze des Sprayers bildet sich ein Flüssigkeitskonus an dessen Spitze aus, der Taylor-Konus. Gegennamige Ladungen werden zur planaren Elektrode gezogen, gleichnamige verbleiben in der Kapillare und werden aufgrund der Erdung neutralisiert. In diesem Flüssigkeitskonus herrscht somit ein Überschuss an Ionen eines Ladungsvorzeichens. Durch die Kraft, die durch das elektrische Feld auf die Ionen in der Spraylösung wirkt, reißen kontinuierlich kleine, geladene Tröpfchen von der Spitze des Taylor-Konus ab und werden zur planaren Elektrode hin beschleunigt. Durch das geheizte Trockengas beginnt die Flüssigkeit der Tropfen zu verdampfen. Dies hat zur Folge, dass bei ständigem Verlust von Flüssigkeit aus dem Tropfen irgendwann die abstoßenden Kräfte unter den gleichnamigen Ladungen, die sich auf der Oberfläche des Tropfens verteilt haben, größer werden als die Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Das Rayleigh-Limit ist erreicht, der Tropfen zerplatzt in der sogenannten Coulomb-Explosion. Die Stabilitätsgrenze kann beschrieben werden mit:

$$Q = 8\pi(\epsilon_0\gamma r^3)^{1/2} \quad (3.29)$$

wobei Q die Nettoladung des Tropfens mit dem Radius r ist, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und γ die Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Zur Entstehung von Ionen in der Gasphase aus diesen Tropfen gibt es zwei in der Literatur beschriebene und diskutierte Modelle. Das *ion evaporation model* erklärt die Entstehung von Ionen in der Gasphase, indem sich der Prozess von Verdampfung und Coulomb-Explosion solange fortsetzt bis die Tropfen etwa 20 nm groß sind. Ab hier desorbieren die Ionen dann direkt aus der Oberfläche der Tropfen. Das *charged residue model* geht davon aus, dass der Prozess aus Verdampfung und Zerplatzen sich solange fortsetzt, bis von den Tropfen alle Flüssigkeit verdampft ist. Beide Modelle werden in der Literatur nach wie vor diskutiert, und für beide Modelle gibt es experimentelle Ergebnisse, die ihre Richtigkeit unterstützen. Es scheint sich abzuzeichnen, dass je nach experimentellen Bedingungen in der Ionenquelle und je nach Spraylösung und Analyt mal der eine, mal der andere Prozess überwiegt. Der von der ESI-Quelle erzeugte Ionenstrom I läßt sich näherungsweise mittels der Hendricks-Gleichung berechnen:

$$I = H\nu\sigma E \quad (3.30)$$

Hier ist E die elektrische Feldstärke in der Ionenquelle zwischen Sprayer-Spitze und planarer Gegenelektrode, v die Flussrate und σ die Leitfähigkeit der Spraylösung, sowie H eine konstante Funktion der Dielektrizitätskonstante und der Oberflächenspannung der Spraylösung.

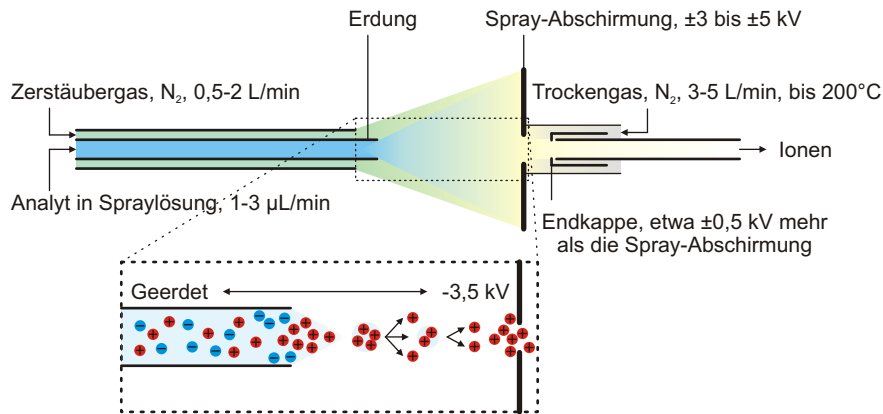


Abbildung 3.4: Der in der Spraylösung gelöste Analyt wird bei der Elektrospray-Ionisation mit geringer Flussrate durch eine geerdete Kapillare geleitet und mit Hilfe eines Zerstäubergases versprüht. Gleichzeitig wird gegenüber der Kapillare am Eingang des Massenspektrometers eine Spannung von einigen Kilovolt angelegt, dazu ein Gegenstrom aus geheiztem Trockengas. In dem Ausschnitt ist dann der eigentliche Elektrosprayvorgang dargestellt. Aufgrund des anliegenden elektrischen Feldes bildet sich ein sogenannter Taylor-Konus aus. Je nach Vorzeichen der angelegten Spannung an der Spray-Abschirmung enthält die Flüssigkeitskonus einen Überschuss an Anionen oder Kationen, hier bei angelegter negativer Spannung Kationen. Es reißen kleine Tropfen vom Konus ab, die eine Nettoladung tragen. Durch den anliegenden Gegenstrom von geheiztem Gas verdampft die Flüssigkeit. Wenn die Abstoßung der Ionen untereinander auf der Oberfläche des Tropfens stärker wird als die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, zerfallen die Tropfen in immer kleinere. Ebenso desorbieren Ionen aus dem Tropfen. Dieser Prozess setzt sich fort, bis alle Flüssigkeit verdampft ist und die Ionen in der Gasphase vorliegen.

Im Gegensatz zur normalen ESI-Quelle, die mit Flussraten von 1 µL/min bis 10 µL/min arbeitet, arbeitet eine Nano-ESI-Quelle bei Flussraten, die im Bereich von einigen zehn bis hundert Nanolitern pro Minute liegen, also etwa mindestens eine Größenordnung unter der normalen ESI-Quelle. Weiterhin wird kein Zerstäubergas verwendet, der Sprühprozess setzt allein aufgrund des hohen elektrischen Feldes an der Spitze der Nanospray-Nadel ein

und wird auch von diesem aufrecht erhalten. Obgleich die Nachweisempfindlichkeit der Elektrospray-Ionisation primär konzentrationsabhängig ist, ist Nano-Elektrospray deutlich sensitiver als Elektrospray, was auch theoretisch erklärt werden kann [55].

Eine letzte Bemerkung in diesem Abschnitt soll zur Ionisationseffizienz erfolgen. Befinden sich verschiedene Analytionen in der Spraylösung, so werden sie aufgrund ihrer meist unterschiedlichen Ladungsaffinität unterschiedlich effizient ionisiert. Eine äquimolaren Lösung verschiedener Substanzen führt nicht zu gleich intensiven Signalen im Massenspektrum, wenn die Analytionen deutliche Unterschiede in ihrer Ladungsaffinität aufweisen. Hier zeigt sich einer der Vorteile einer gekoppelten Vortrennungsmethode. Die Analytionen gelangen nicht mehr zeitgleich in die Ionenquelle, Ionensuppression durch gleichzeitige Anwesenheit deutlich besser ionisierbarer Substanzen in der Ionenquelle wird also verhindert.

3.1.3 Das Apex Qe FT-ICR Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik

Alle Experimente wurden an einem Bruker Apex Qe Massenspektrometer durchgeführt. Dieses seit dem Sommer 2007 im Labor vorhandene Gerät ist ein FT-ICR Massenspektrometer mit einem 7 T Magneten. Es enthält zusätzlich noch einen Quadrupol-Massenfilter zwischen Ionenquelle und ICR-Zelle. Ein Schema zum verwendeten Instrument ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Das Gerät verfügt über zwei Ionenquellentypen, eine MALDI-Ionenquelle und eine ESI-Quelle, die zu einer *offline*- oder einer *online*-Nano-ESI-Quelle umgebaut werden kann. Die hier erzeugten Ionen werden durch einen sogenannten *ion funnel* in einen der Speicherung der Ionen dienenden Hexapol überführt. Im Anschluss an die Ionenquellen, zwischen denen elektronisch im Mikrosekunden-Zeitbereich gewechselt werden kann, was interne Kalibrierung auch in LC-MS-Experimenten ermöglicht, folgt die Quadrupol-Einheit. Diese besteht aus einem Quadrupol-Massenfilter und einem nachfolgenden Hexapol, der als Kollisionszelle bei MS/MS-Experimenten mit Stoßgas und als Ionenspeicher dient. Ein Quadrupol-Massenfilter besteht aus vier parallel in gleichem Abstand voneinander angeordneten Metallstäben, wobei an zwei sich gegenüberliegenden Stäben jeweils ein statisches elektrisches Potential mit entgegengesetztem Vorzeichen angelegt wird. Es sind also zwei elektrische Dipole. Diesem statischen elektrischen Feld wird ein elektrisches Wechselfeld derart überlagert, dass sich gegenüberliegende Stäbe gleichphasig sind, nebeneinander liegende Stäbe immer um 180° phasenversetzt. Das durch diese Anordnung und angelegten Spannungen erzeugte elektrische Wechsel-

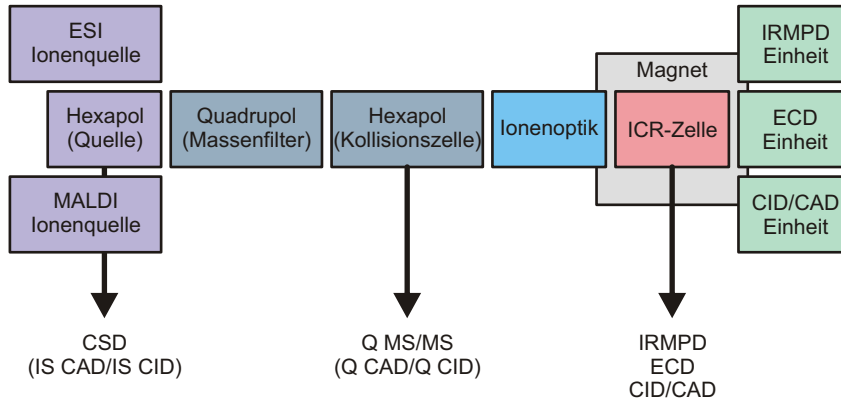


Abbildung 3.5: Das in der Arbeit verwendete Massenspektrometer Bruker Apex Qe ist ein so genanntes Hybridmassenspektrometer. Es besteht nicht nur aus der ICR-Zelle als Analysator und Detektor sondern hat ein zweiten Massenanalysator, die Quadrupol-Einheit. Darüber hinaus verfügt es sowohl über eine ESI-Ionenquelle als auch über eine MALDI-Quelle. In der ICR-Zelle steht der komplette Satz an Fragmentierungsmöglichkeiten für MS/MS-Experimente zur Verfügung, nämlich IRMPD, ECD und CID, welches zum Teil auch als CAD bezeichnet wird. Weiterhin können MS/MS-Experimente mittels CID in der Kollisionszelle der Quadrupol-Einheit durchgeführt werden, wobei dann der Quadrupol als schneller Massenfilter, auch für Datenabhängiges MS/MS, dient und die ICR-Zelle als Detektor. Im Hexapole der Ionenquelle kann lediglich unspezifisch fragmentiert werden, also ohne vorherige Isolation eines *parent ion*. Dies wird dann als IS CID oder häufiger als CSD bezeichnet.

feld kann so variiert werden, dass nur Ionen eines bestimmten Masse- zu Ladungsverhältnisses den Quadrupol passieren können. Die Bewegung der Ionen in dem elektrischen Feld des Quadrupols wird durch Lösungen der Mathieu'schen Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{d^2u}{d\epsilon^2} + (a_u - 2q_u \cos(2\epsilon))u = 0 \quad (3.31)$$

Hierbei sind a_u und q_u Parameter des Quadrupols, ϵ ergibt sich aus der Frequenz f der angelegten Wechselspannung aus $\epsilon = \frac{ft}{2}$. Die Variable u steht hierbei jeweils für die x-, y- oder z-Richtung. Die in der Gleichung auftretenden Parameter q_u und a_u sind die sogenannten Mathieu-Parameter:

$$q_u = \frac{4eV}{mr_0^2 f^2} \quad (3.32)$$

$$a_u = \frac{8eU}{mr_0^2 f^2} \quad (3.33)$$

Hierbei ist e die Elementarladung, V die angelegte Wechselspannung, U die angelegte Gleichspannung, m die Masse des Ions und r_0 der Radius des Quadrupols. Über die Variablen in den Mathieu-Parametern kann nun gesteuert werden, welchen Ionen den Quadrupol passieren können und welche nicht. Hierbei führt das Abschalten der Gleichspannung zu einem großen Stabilitätsbereich, also einem breiten Bereich an Masse- zu Ladungsverhältnissen, die den Quadrupol passieren können. Durch Variation der Frequenz und der Amplitude der angelegten Wechselspannung können Ionen eines bestimmten Bereichs des Masse- zu Ladungsverhältnisses durch den Quadrupol gelassen werden.

Die Ionen werden dann durch eine Ionenoptik in die ICR-Zelle geleitet, die sich im Magneten befindet. Hier sind MS/MS-Experimente mittels Stoßgas, also CID, Infrarotlaser, IRMPD oder Elektronenbeschuss, ECD möglich. In der ICR-Zelle und der Quadrupol-Einheit sind sowohl MS/MS-Experimente mit vorheriger Selektion eines *parent ion* möglich, als auch ohne eine solche Selektion, die unspezifische Fragmentierung. In der Ionenquelle ist im Hexapol lediglich die unspezifische Fragmentierung mittels Gasstößen möglich, da es vorher keine Möglichkeit zur Selektion bestimmter Ionen gibt.

3.2 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ist ein schnelles chromatographisches Verfahren mit sehr hoher Trennleistung. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gibt es eine ganze Reihe von verschiedenen CE-Techniken, die bei unterschiedlichen analytischen Fragestellungen erfolgreich angewendet werden. Bei der Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie beschränkt sich dies weitestgehend auf die Kapillarzonen-Elektrophorese. Im folgenden Kapitel wird die Theorie zur Kapillarelektrophorese dargelegt, sie bildet die Grundlage für das Verständnis einiger in Kapitel 3.2.1 folgenden Anmerkungen zur technischen Umsetzung und zu speziellen Anforderungen der CE-MS-Kopplung.

Eine Kapillarelektrophorese-Anlage kann einen sehr einfachen Aufbau haben, wie er schematisch in Abbildung 3.6 gezeigt ist. Sie besteht aus zwei mit einem Elektrolyten gefüllten Behältern, die über eine ebenfalls mit diesem Elektrolyten gefüllte Glaskapillare miteinander verbunden sind. In jedem Behälter befindet sich eine Elektrode, so dass zwischen den Gefäßen ein elektrisches Feld längs der Kapillare angelegt werden kann. Die Flüssigkeit in

der Kapillare und sämtliche in ihr gelösten, ladungstragenden Bestandteile beginnen unter Einfluss dieses Feldes zu wandern. Die Beladung der Kapillare mit einer Probe erfolgt über einen Austausch des Behälters am Einlass und Injektion eines geringen Volumens der Probe über Anlegen eines Drucks oder einer Spannung. Vor der Messung wird dann der Probenbehälter wieder mit dem Elektrolytgefäß getauscht. Die Detektion der im elektrischen Feld unterschiedlich schnell wandernden Probenmoleküle erfolgt in der Regel über die Messung ihrer Lichtabsorption. Es gibt jedoch auch eine ganze Reihe anderer Detektionsmöglichkeiten, wie zum Beispiel über Fluoreszenz, Leitfähigkeit oder Brechungsindex.

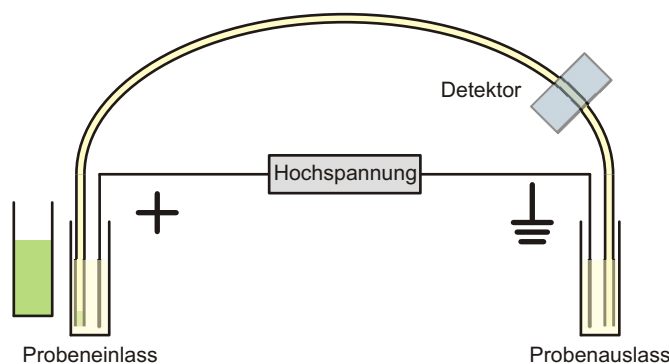


Abbildung 3.6: Ein Kapillarelektrophorese-Anlage ist prinzipiell sehr einfach aufgebaut. Es gibt zwei mit einem Elektrolyten gefüllte Behälter, die über eine dünne, ebenfalls mit diesem Elektrolyten gefüllte Glaskapillare miteinander verbunden sind. In beiden Behältern befindet sich ebenso jeweils eine Elektrode, so dass zwischen den Behältern mittels einer Hochspannungsversorgung ein elektrisches Potential angelegt werden kann. Die zu analysierende Probe wird injiziert, indem der Elektrolytbehälter am Einlass durch den Probenbehälter ersetzt wird, und zum Beispiel durch Anlegen eines Drucks eine kurze Bande der Analytlösung in die Kapillare gepumpt wird. Vor Anlegen der Hochspannung wird dann wieder der Behälter mit dem Elektrolyten an den Einlass gebracht. Am Ende der Kapillare, kurz vor dem Probenauslass, befindet sich ein Detektor, meist ein Lichtstreuendetektor.

Bei der Kapillarelektrophorese treten zwei Phänomene in Erscheinung, die Elektrophorese, die namensgebend ist, sowie die Elektroosmose, die allerdings für die Funktion der Kapillarelektrophorese entscheidender ist. Die Ionenbewegung von Analytionen resultiert aus der Überlagerung beider Phänomene, deren Ursache im Folgenden erläutert wird.

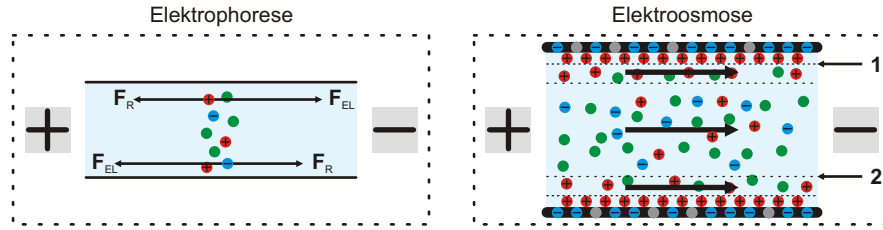


Abbildung 3.7: Bei der Kapillarelektrophorese sind zwei Phänomene essenziell. Zum einen ist es die Elektrophorese. Sobald eine Spannung zwischen den Enden der Kapillare angelegt wird, bewegen sich alle sich in dem Elektrolyten befindlichen ladungstragenden Moleküle (rot, blau) gemäß des Vorzeichens ihrer Ladung entweder zur Kathode oder zur Anode. Der Kraft des elektrischen Feldes \vec{F}_{EL} wirkt die Reibungskraft \vec{F}_R entgegen, die bei der Bewegung der Ionen durch die Flüssigkeit auftritt. Rechts in der Abbildung ist schematisch der zweite wichtige Prozess bei der Kapillarelektrophorese gezeigt, die Elektroosmose. Je nach pH-Wert des Elektrolyten in der Kapillare ist die Innenwand unterschiedlich stark dissoziiert. An diese Schicht negativ geladener Silanolgruppen lagert sich zum einen eine feste Schicht von Gegenionen (bis **1**) an, daran anschließend eine bewegliche (bis **2**). Liegt ein elektrisches Feld an, so beginnen die Ionen der diffusen Schicht zur Kathode zu wandern und reißen die sie umgebenden Flüssigkeitsmoleküle mit. Resultat ist der vom pH-Wert der Flüssigkeit abhängige elektroosmotische Fluss. Dieser ist ungefähr ab pH-Werten größer als Zwei immer zur Kathode hin gerichtet, und kann so stark sein, dass dadurch alle Moleküle und Ionen, auch die Anionen, zur Kathode wandern.

Werden Moleküle in dem Elektrolyten in der Kapillare betrachtet, so sind diese entweder gegenüber ihrer Umgebung elektrisch neutral, positiv oder negativ geladen. Wird jetzt über der Kapillare ein statisches elektrisches Feld angelegt, so beginnen die geladenen Moleküle gemäß dem Vorzeichen ihrer Ladung zur Kathode oder zur Anode zu wandern. Dieser in Abbildung 3.7 links dargestellte Vorgang ist die Elektrophorese. Werden die auf die geladenen Moleküle wirkenden Kräfte, \vec{F}_{el} für das elektrische Feld und \vec{F}_R , die Stoke'sche Reibung, welche die Ionen bei ihrer Bewegung durch die Flüssigkeit erfahren, betrachtet, so kann über:

$$\vec{F}_{el} = \vec{F}_R \quad (3.34)$$

$$qE = f_R \eta v \quad (3.35)$$

die elektrophoretische Geschwindigkeit v_{ep} und die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} bestimmt werden:

$$v_{ep} = \frac{q}{f_R \eta} E = \mu_{ep} E \quad (3.36)$$

Hierbei ist E die Stärke des angelegten elektrischen Feldes, q die Ladung des Ions, η die Viskosität der Flüssigkeit sowie f_R der Stoke'sche Reibungskoeffizient des Ions.

Aus der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Elektrolyten und der Kapillarwand resultiert der auftretende Effekt der Elektroosmose und des elektroosmotische Flusses (siehe Abbildung 3.7 rechts). Je nach pH-Wert des Elektrolyten werden die Silanolgruppen der Glaskapillare an der Oberfläche verschieden stark deprotoniert, die Oberfläche ist negativ aufgeladen. Es bildet sich direkt an der Oberfläche eine starr gebundene Schicht von Gegenionen aus, etwas entfernt davon eine bewegliche. Diese erste Schicht aus starr gebundenen Kationen wird Stern-Schicht genannt. Bis zur Grenze dieser Schicht zur nächsten, nicht starr gebundenen, die sich durch einen Überschuss an Kationen auszeichnet, nimmt das elektrische Feld linear ab. An der Grenzschicht selber liegt das Stern-Potential. In der sich anschließenden, diffusen Schicht fällt das Potential exponentiell weiter ab. In einer bestimmten Entfernung von der Oberfläche der Kapillare ist die Wirkung des elektrostatischen Feldes auf die Ionen so gering, dass diese allein aufgrund der kinetischen Energie der Brown'schen Molekularbewegung beweglich bleiben. Das Potential an dieser Kante wird als Zeta-Potential ζ bezeichnet. Die Strecke in dieser Schicht bis zu dem Punkt, an dem das Potential auf den $\frac{1}{e}$ -ten Teil angefallen ist, heißt Debye-Länge. Sie ist ein Maß für die Reichweite von elektromagnetischen Feldern in gemischten Leitern wie zum Beispiel Elektrolyten oder Plasmen. Für eine flache Oberfläche ergibt sich für das Potential Ψ in einer Entfernung x von der Oberfläche nach der Debye-Hückel-Theorie:

$$\Psi(x) = \Psi_0 e^{-\kappa x} \quad (3.37)$$

mit:

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi n z^2 e^2}{\epsilon k T}} \quad (3.38)$$

Hierbei ist n die Anzahl der Ionen, z ihre Wertigkeit, ϵ die Dielektrizitätskonstante, e die Elementarladung, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Anlegen eines Potentials an den Enden der Kapillare erzeugt ein Feld längs der Kapillarachse, und die Ionen beginnen sich in der diffusen Schicht in Richtung der Kathode zu bewegen. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung kann mit:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta}E = \mu_{eo}E \quad (3.39)$$

angegeben werden. Dabei ist ϵ wieder die Dielektrizitätskonstante, ζ das Zeta-Potential und η die Viskosität des Elektrolyten. Die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses ist also über das Zeta-Potential und somit über Gleichung 3.37 und 3.38 von einigen chemischen Eigenschaften des Elektrolyten abhängig. Der Fluss nimmt mit steigendem pH-Wert zu, jedoch mit steigender Ionenstärke J ab, denn κ ist über:

$$J = \frac{1}{2} \sum z_i^2 m_i \quad (3.40)$$

mit dieser verknüpft. Hierbei ist wieder z_i die Wertigkeit des i -ten Ions im Elektrolyten, m_i seine Molarität. Die Dicke der Sternschicht beträgt je nach Konzentration zwischen 0,1 nm und 1 μm . Da der elektroosmotische Fluss von der gesamten Kapillaroberfläche erzeugt wird und da die sich bewegenden Kationen auch das sich an ihnen anlagernde Wasser mitziehen, ist das Strömungsprofil in der Kapillare im Gegensatz zur laminaren Strömung extrem flach. Es trägt quasi nicht zur Signalverbreiterung bei und ist ein wesentlicher Grund, weshalb die Kapillarelektrophorese anderen Flüssigkeitsbasierten Trennverfahren überlegen ist. Die Stärke des elektroosmotischen Flusses liegt bei Kapillaren von 20 μm bis 50 μm Innendurchmesser zwischen einigen zehn und einigen hundert Nanolitern pro Minute. Dieser Fluss wird weiterhin deutlich herabgesetzt, wird dem Elektrolyten, der in der Regel ein wässriges System ist, ein Anteil organischen Lösungsmittels beigelegt [61, 135]. Dieser Umstand ist bei den Substanzklassen, die in dieser Arbeit untersucht werden, von großer Bedeutung, da diese sich meistens nur in Flüssigkeiten mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel lösen lassen.

Trotz des günstigen Strömungsprofils gibt es auch bei der Kapillarelektrophorese einige Parameter, die zu einer Signalverbreiterung und damit zu einer Verschlechterung der Trennleistung führen können. Dies ist zum Einen die Erwärmung der Kapillare durch Joule'sche Wärme, zum Anderen die Verbreiterung des Signals durch Diffusion aufgrund des Konzentrationsunterschiedes der Probenmoleküle zwischen der Probenbande und dem umgebenden Elektrolyten.

Eine Erwärmung der Kapillare geschieht durch die anliegende Spannung und den fließenden Strom und kann zu lokalen Unterschieden in der Viskosität des Elektrolyten sowie auch zu Verwirbelungen in der Flüssigkeit durch Konvektion führen. Aus dem Joule'schen Gesetz folgt, dass die Wärmeproduktion in einem Leiter proportional zur elektrischen Leistung ist. Somit folgt für

die Wärmeproduktion $\frac{dH}{dt}$, unter der Berücksichtigung, dass für den Widerstand R mit l als Länge des Leiters, A seiner Querschnittsfläche und σ , seiner elektrischen Leitfähigkeit, $R = \frac{l}{\sigma A}$ gilt:

$$\frac{dH}{dt} = UI = \frac{U^2}{R} = \frac{\sigma AU^2}{L} \quad (3.41)$$

Hierbei ist I der fließende Strom, U die angelegte Spannung. Mit dem spezifischen Widerstand $\rho = \frac{1}{\sigma}$ folgt:

$$\frac{dH}{dt} = \frac{AU^2}{\rho L} \quad (3.42)$$

Als empirische Regel zur Vermeidung von Signalverbreiterung durch Wärmeproduktion gilt, dass die Leistung im System bei unter einem Watt bleiben sollte.

Der zweite Grund für Signalverbreiterung, die Diffusion D der Analytionen, kann über die Stokes-Einstein-Gleichung und die Gleichung 3.36 der elektrophoretischen Mobilität hergeleitet werden zu:

$$D = \frac{\mu_{ep}kT}{q} \quad (3.43)$$

mit k als Boltzmann-Konstante. Sie ist also für jedes Ion über seine Ladung q und seine elektrophoretische Mobilität μ_{ep} spezifisch und von der Temperatur T abhängig.

Ebenso wie für andere chromatographische Trennverfahren kann auch in der Kapillarelektrophorese ein Maß für die Trennleistung N angegeben werden, der in diesem Fall als Trennleistungsparameter bezeichnet wird. Er hängt mit der Diffusionskonstante D zusammen und ergibt sich bei Gleichsetzung der Wegstrecke vom Einlass bis zum Detektor mit der Kapillarlänge l zu:

$$N = \frac{\mu_{ep}U}{2D} \quad (3.44)$$

Wird D durch den Term aus Gleichung 3.43 ersetzt, so ist zu sehen, dass die Trennleistung bei der Kapillarelektrophorese nicht von der Länge der Kapillare abhängt, im Gegensatz zum Beispiel zur HPLC. Wird die Auflösung R_{CE} , abgeleitet von einer allgemeinen Definition der Auflösung zweier Gaussförmiger Signal und dem Trennleistungsparameter, betrachtet, so ergibt sich mit $\mu_{eff} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$:

$$R_{CE} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\mu_{eff,2} - \mu_{eff,1}}{\frac{\mu_{eff,2} + \mu_{eff,1}}{2}} \right) \quad (3.45)$$

Hieraus ist zu ersehen, dass eine Trennung am wirksamsten durch Erhöhung der Unterschiede der effektiven Mobilitäten μ_{eff} zweier Ionen erreicht werden kann. Dies wird in der Regel über die Variation von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke oder auch durch Zusätze im Elektrolyten erreicht, wobei bei der Kopplung mit einem Massenspektrometer aufgrund der notwendigen Bedingungen für den Elektrospray-Prozess in erster Linie nur Änderungen am pH-Wert und in geringem Maße an der Ionenstärke in Frage kommen.

3.2.1 Die Kopplung an das Massenspektrometer

Bei der Kopplung einer CE-Anlage an ein Massenspektrometer müssen hauptsächlich zwei Dinge berücksichtigt werden. Es muss ein Potentialausgleich zwischen der Auslass-Seite der CE-Kapillare und der ESI Quelle hergestellt werden, da die Schließung des Stromkreises über eine Elektrode in einem Auslassgefäß nun nicht mehr gegeben ist. Außerdem müssen die Flussraten von der Kapillare an die nötigen Mindestflussraten einer ESI-Quelle angepasst werden. Um diese Probleme zu lösen gibt es zwei verschiedene Ansätze.

Es besteht die Möglichkeit, die Kopplung über eine sogenanntes *sheath liquid* herzustellen. Diese zusätzlich der ESI-Quelle zugeführte Flüssigkeit stellt einen elektrischen Kontakt am Ausgang der Kapillare her und ermöglicht so die Erdung. Weiterhin bringt sie die der ESI-Quelle seitens der CE zugeführte Flussrate in Bereiche, die kompatibel mit normalen ESI-Quellen sind. Die Umsetzung dieser Kopplungsmethode erfolgt, indem die CE-Kapillare am Ende von einer weiteren Kapillare umhüllt wird, die das *sheath liquid* trägt. Diese wiederum befindet sich in einer Röhre, die das Zerstäubergas zuführt. Schematisch ist dies im oberen Teil der Abbildung 3.8 zu sehen. Die Kopplung über einen solchen Aufbau hat jedoch einen offensichtlichen Nachteil. Die Flussraten in der CE-Kapillare und des *sheath liquid* unterscheiden sich in der Regel um ein bis zwei Größenordnungen. Entsprechend verursacht dies auch eine ebensolche Verdünnung der Probe. Somit muss mit einer deutlich höheren Probenkonzentration gearbeitet werden, verglichen mit massenspektrometrischen Messungen *offline* oder mit einer HPLC-MS-Kopplung. Die Probenkonzentration ist jedoch durch die Löslichkeit des Analyten in dem Elektrolyten begrenzt. Außerdem kann ein zu großer Unterschied zwischen der Ionenkonzentration in der Probenbande und der Ionenkonzentration im restlichen Elektrolyten zu Diffusionseffekten führen, welche die Trennung deutlich beeinflussen können.

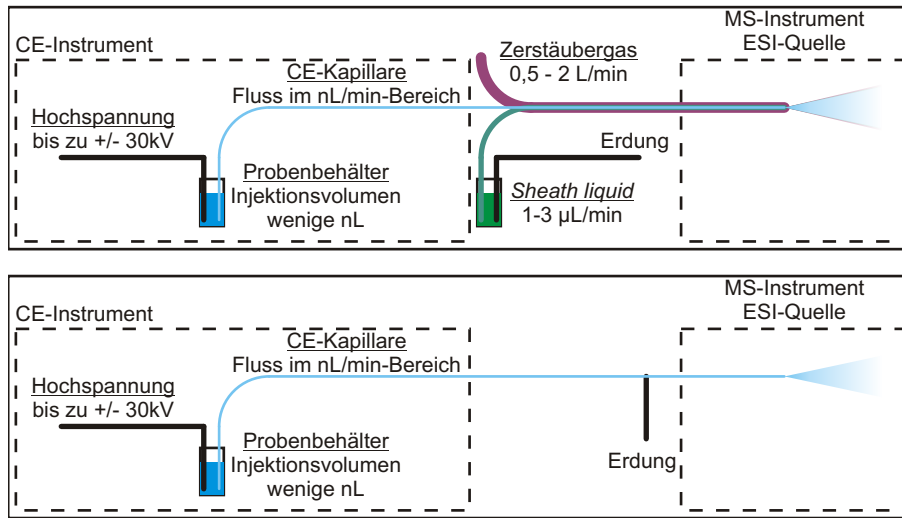


Abbildung 3.8: Für die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Zum Einen das Arbeiten mit einem sogenannten *sheath liquid*, und zum Anderen die direkte Kopplung. In beiden Fällen muss das Problem der zuverlässigen Erdung gelöst werden. Während bei der *sheath liquid* Kopplung dazu die zusätzliche Flüssigkeit dient, die auch dafür sorgt, dass Flussraten erreicht werden, die mit der ESI-Quelle kompatibel sind, werden bei direkter Kopplung diverse Varianten versucht (siehe Text).

Die zweite Möglichkeit der Kopplung ist die Nutzung der geringen Flussrate und das direkte Versprühen aus der CE-Kapillare, und somit ein Betrieb als Nano-ESI Quelle. Diese Möglichkeit umgeht somit das Problem der Probenverdünnung. Hierbei muss aber sichergestellt sein, dass der Elektrolyt auch als Spraylösung verwendbar ist. Variationsmöglichkeiten zur Optimierung der Trennung über pH-Wert, Elektrolytzusätze oder Ionenstärke, die es in geringem Umfang bei der *sheath liquid* Kopplung durch die große Verdünnung mit der Zusatzflüssigkeit noch gibt, fallen hier fast komplett weg. Das weit größere Problem der direkten Kopplung ist jedoch die zuverlässige Erdung des Kapillarendes. Da es hierfür in der Literatur eine Reihe von verschiedenen Lösungen oder Lösungsvorschlägen gibt, ist die Erdung in der Abbildung 3.8, unterer Teil, nicht in einer speziellen Bauform gezeigt, sondern lediglich allgemein angedeutet. Die veröffentlichten Bauformen zur Erdung bei direkter Kopplung lassen sich grob in drei Formen einteilen: Beschichtung der Kapillarspitze mit leitendem Material, Verdünnung der Kapillarwand bis sie für Ionen durchlässig wird und Kontakt dieses Kapillarteils mit einem geerdeten Elektrolytbad, sowie kurze Lücken in der Kapillare, durch die der

Elektrolyt Kontakt mit einem Metallkörper oder der Flüssigkeit eines äußeren, geerdeten Elektrolytbads bekommt. Daneben existieren eine Reihe von Abwandlungen dieser Bauformen und Speziallösungen. Für eine allgemeine Übersicht über Möglichkeiten zur CE-MS-Kopplung sei auf die Literatur verwiesen [58].

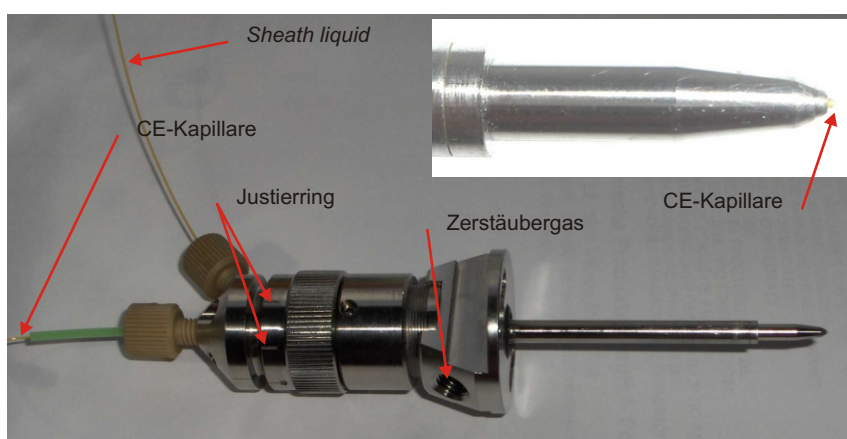


Abbildung 3.9: Der verwendete CE-Sprayer. Von links kommend ist die CE-Kapillare zu sehen, deren Spitze rechts etwas aus dem Sprayer heraus schaut. Von links oben kommend ist die Zuführung des *sheath liquid* zu sehen, mittig am Sprayer die Zuführung für das Zerstäubergas, dessen Zuleitung hier auf dem Bild nicht angeschlossen ist. Mit dem Justierring, zu dem die Skaleneinteilung auf dem Foto zu erkennen ist, wird die Position der CE-Kapillare in der Spitze eingestellt.

Aufgrund der Instabilität des Elektrosprays bei Verwendung einer direkten Kopplung, die insbesondere das Beladen der Kapillare betrafen, wurde in der Arbeit trotz ihrer Nachteile hinsichtlich der Sensitivität die weitaus stabilere koaxiale Kopplung verwendet. Für diese Kopplung an die ESI-Quelle des Bruker Massenspektrometers wurde ein CE-MS-Sprayer von Agilent verwendet (siehe Abbildung 3.9). Dieser verfügt über Anschlüsse für das Zerstäubergas, das *sheath liquid*, sowie die CE-Kapillare. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wird diese durch den Sprayer bis zur Spitze hindurch geführt und ragt dort wenige Zehntelmillimeter hervor. Die genaue Position der Spitze, also die genaue Länge, welche die CE-Kapillare aus der Spitze herausragt, kann über den Justierring eingestellt werden. Dieser hat als Skaleneinteilung acht Kerben. Diese Einstellung der Position der Kapillare hat entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität beim Betrieb der ESI-Quelle, hierauf wird noch

genauer bei der allgemeinen Beschreibung der Versuchsdurchführung (siehe Kapitel 3.3.3) eingegangen.

3.3 Versuchsdurchführung

Im folgenden Abschnitt soll kurz auf die Versuchsdurchführung bei *offline* Massenspektrometrie-Experimenten, *offline* Kapillarelektrophorese-Experimenten und insbesondere bei der Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie, den *online* CE-MS-Experimenten eingegangen werden. Weiterhin enthält dieser Abschnitt einige Anmerkungen zur Datenauswertung. Eine detaillierte Beschreibung spezieller Versuchsbedingungen wird bei Darstellung der einzelnen Experimente im Abschnitt 5 gegeben.

3.3.1 Massenspektrometrie

Bei den massenspektrometrischen Experimenten wurden die Proben in der jeweils angegebenen Menge Spraylösung aufgenommen und über eine Spritze der ESI-Quelle mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugeführt. Die Bedingungen in der Ionenquelle und in der ICR-Zelle des Instrumentes wurden auf bestmögliche Sensitivität hin optimiert. Die Einstellungen der Ionenquelle und des Quadrupols wurden weiterhin so vorgenommen, dass möglichst schonende Bedingungen vorlagen, um unspezifische Fragmentierung der Probe zu verhindern. Dies bedeutet im Falle des Quadrupols Einstellung der niedrigsten möglichen Beschleunigungsspannung am Ausgang von plus oder minus einem Volt, je nach Ionenmodus. Das Instrument wurde täglich und insbesondere nach Änderungen des Messbereichs des Masse- zu Ladungsverhältnisses anhand der Fragmentionen bekannter Standardsubstanzen kalibriert. Dies gilt sowohl für die *offline* Messungen, als auch für die *online* CE-MS-Messungen. Die Datenaquisition erfolgte mit der Software apexControl, Version 2.0.0.36, der Firma Bruker Daltonik, auch dies gilt wiederum sowohl für die *offline* Messungen als auch für die *online* CE-MS-Messungen. Für ein Massenspektrum wurden, soweit nicht anders vermerkt, 30 Messungen akkumuliert. Die Akkumulationszeit des Hexapols in der Quelle wurde dabei auf 10 ms eingestellt, die des Hexapols in der Quadrupol-Einheit auf 0,5 s. Die Probe wurde mit einer Spritzenpumpe mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ der ESI-Quelle zugeführt. Die Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 2^{20} Datenpunkten aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte, wie ebenso auch bei den CE-MS-Experimenten, mit der Auswertesoftware DataAnalysis, Version 3.4.192, der Firma Bruker Daltonik.

3.3.2 Kapillarelektrophorese

Die *offline* Kapillarelektrophorese-Experimente wurden an einem P/ACE MDQ Instrument der Firma Beckman durchgeführt. Als Detektor wurde dabei ausschließlich der Photodiodenarray-Detektor verwendet. Dieser misst die Lichtabsorption der Ionen und Moleküle in der Kapillare im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 600 nm, bei einer Bandbreite von 10 nm. Dabei wurden pro Sekunde 16 Datenpunkte aufgenommen. Gerätesteuerung und Versuchsauswertung erfolgte mit der Software 32 Karat, Version 8, des Herstellers.

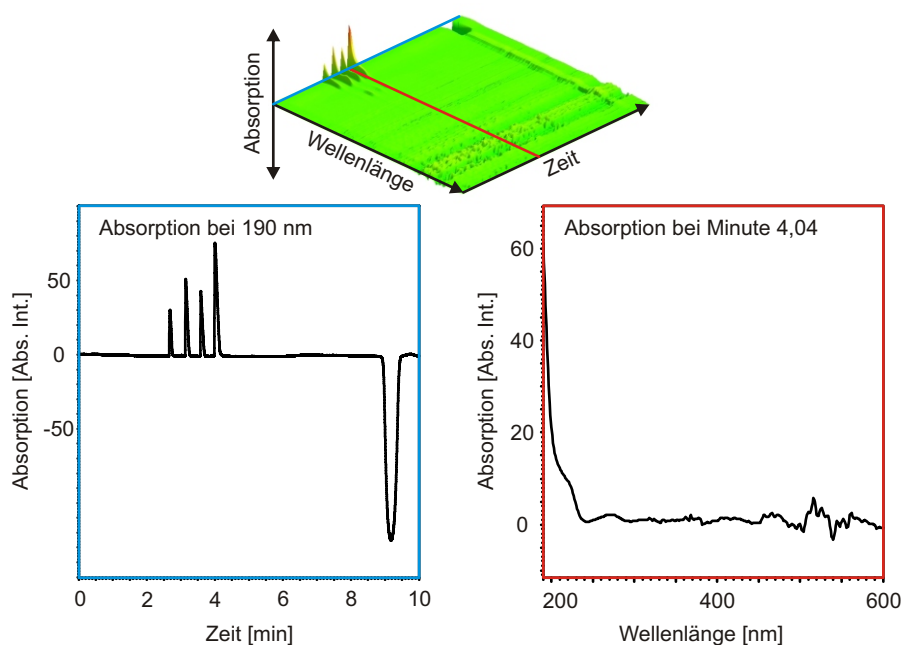


Abbildung 3.10: Wurden CE-Experimente *offline* durchgeführt, so können die Daten bei dem verwendeten PDA-Detektor sowohl als Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge (blau), als auch als Absorption zu einer bestimmten Zeit über den kompletten Wellenlängenbereich ausgewertet werden (rot). In der Mitte oben ist ein dreidimensionaler Graph des Experiments zu sehen, in dem die Absorption gegen die Wellenlänge und die Zeit aufgetragen ist. Die rote und die blaue Linie symbolisieren den gewählten Ausschnitt der beiden Einzelspektren.

Beispielhaft ist in Abbildung 3.10 ein Spektrum gezeigt, wobei anhand dieses Spektrums nur die Möglichkeiten zur Datenauswertung kurz demonstriert werden sollen. Oben mittig ist die dreidimensionale Ansicht der experimentellen Daten gezeigt. Schnitte orthogonal der Zeitachse (rote Linie)

führen zu den rechts dargestellten Absorptionsspektren über alle gemessenen Wellenlängen, Schnitte orthogonal der Wellenlängennachse (blaue Linie) zu den geläufigeren Elektropherogrammen, in denen die Laufzeit, die Signalintensität (bei einer Wellenlänge) und die Signalbreite einer Substanz ermittelt werden können.

Die verwendeten Kapillaren wurden vor erstmaliger Verwendung mindestens mit dem Zehnfachen ihres Volumens mit dem verwendeten Elektrolyten gespült, ebenso mindestens mit dem zweifachen ihres Volumens zwischen den Messungen, sofern dies nicht anders vermerkt ist. Die *offline* durchgeführten Experimente dienten vielfach als Test eines Elektrolyten für spätere *online* Versuche. Um die Bedingungen für die *online* Experimente zu simulieren wurde auch bei *offline* Experimenten nicht mit Natriumhydroxid, sondern mit dem Elektrolyten gespült. Das *offline* zur Konditionierung einer Kapillare meistens verwendete Natriumhydroxid kann die Ionenquelle des Massenspektrometers verschmutzen oder sogar beschädigen.

Das Gerät verfügt über die Möglichkeit, die Temperatur der CE-Kapillare durch ein dieses umschließendes Kühlmittelbad zu regulieren. Diese Temperatur wurde, soweit nicht anders angegeben, auf 20°C eingestellt. Sie kann jedoch zwischen 15°C und 60°C variiert werden.

Für ein Experiment wurde die Kapillare mittels eines für eine bestimmte Zeitdauer an der Einlass-Seite angelegten Überdrucks mit Probe befüllt. Soweit nicht anders angegeben wurde mit 50 mbar Überdruck für 5 s bei der Injektion gearbeitet. Die im Experiment verbrauchte Probenmenge lässt sich über die Probenkonzentration und über das injizierte Volumen berechnen. Das pro Zeiteinheit injizierte Volumen $\frac{dV}{dt}$ kann mit dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ermittelt werden:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8\eta l} \quad (3.46)$$

Hier ist r der Innenradius der Kapillare, l ihre Länge, Δp die zwischen ihren Enden angelegte Druckdifferenz und η die Viskosität des Elektrolyten. Die Viskosität $\eta_{1,2}$ wurde für die Elektrolyte im Falle von Stoffgemischen aus den einzelnen Viskositäten η_1 und η_2 sowie den Volumenanteilen V_1 und V_2 nach einer empirischen Formel wie folgt berechnet:

$$\eta_{1,2} = e^{(V_1 \ln \eta_1 + V_2 \ln \eta_2)} \quad (3.47)$$

Diese Grundlagen für die Berechnung des Probenverbrauchs wurden auch für *online* CE-MS-Messungen angewendet, unabhängig davon ob diese nun mit dem Beckman Instrument oder mit dem Eigenbau durchgeführt wurden, da immer mittels eines angelegten Drucks die Probe in die Kapillare inji-

ziert wurde. Die Proben wurde, ebenso sofern nicht anders angegeben, in der genannten Konzentration in dem verwendeten Elektrolyten gelöst. Wurden bei einem Experiment keine oder zu wenige Signale beobachtet, so wurde auch der darauf folgende Reinigungslauf mit dem Detektor aufgezeichnet, um eine möglicherweise zu kurze Dauer des Experimentes über dann noch eluierende Substanzen zu verifizieren. Auch diese Aussage gilt ebenso für alle durchgeführten *online* Experimente.

3.3.3 Kopplung

Die zur Injektion der Probe und zur Vorbehandlung der Kapillare getätigten Aussagen gelten auch für alle *online* CE-MS-Experimente. Dies ist unabhängig davon, ob sie mit der P/ACE MDQ der Firma Beckman oder mit dem Eigenbau durchgeführt wurden. Im Gegensatz zum kommerziellen Instrument verfügt der Eigenbau über keine Möglichkeit zur Temperierung der Kapillare. Auch bei der Kopplung des P/ACE MDQ kann lediglich etwa die Hälfte der Kapillare bei der Kopplung temperiert werden. Diese Einschränkung ist baulich bedingt. Aufgrund der geringen fließenden Ströme kann davon ausgegangen werden, dass die Temperatur in der Kapillare bei den CE-MS-Experimenten Raumtemperatur nicht nennenswert überschreitet.

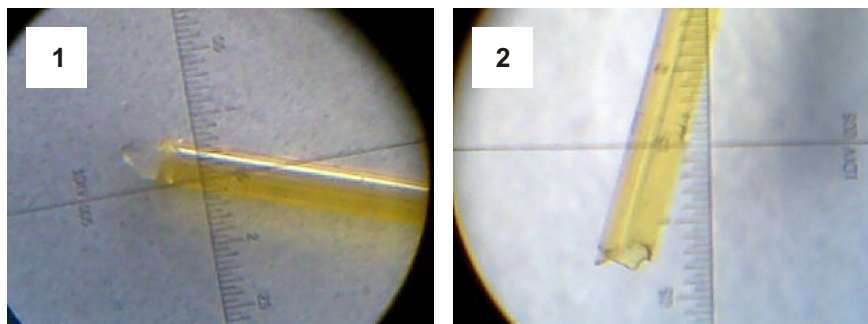


Abbildung 3.11: Vor der Benutzung wird das Ende der CE-Kapillare, welches in die ESI-Quelle geführt wird, an einem feinen Schmirgelpapier geschliffen, bis es in etwa wie in **1** aussieht. **2** zeigt dagegen eine unbehandelte, geschnittene Kapillare. Die deutlich zu erkennenden Grate beeinflussen erheblich den Sprayprozess, so dass mit solchen unbehandelten Kapillaren nur schwer und selten ein stabiler Spray zu erzielen ist, selbst wenn der Schnitt deutlich glatter gelingt. Die Abbildungen sind 25-fach vergrößert.

Bei der Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer sind jedoch einige experimentelle Gegebenheiten zu beachten, die hier kurz

ausgeführt werden sollen. Während für die Messungen *offline* eine einigermaßen gerade und glatt geschnittene Kapillare für gute Reproduzierbarkeit der Experimente ausreichend ist, sind Form und Zustand des Kapillarendes in der ESI-Quelle für CE-MS-Experimente und vor allem für eine stabile und sensitive Kopplung entscheidend. Daher wurde das Ende der CE-Kapillare, welches in dem CE-Sprayer lag, immer mit einem feinkörnigen Schmirgelpapier (Körnung K600) in eine parabolische Form geschliffen. Die Abbildung 3.11 zeigt das Kapillarende, einmal bearbeitet (links) und einmal nach einem schlechten Schnitt, unbearbeitet (rechts).

Wie in Abschnitt 3.2.1 bereits erwähnt, ist die Position der Kapillare in dem CE-MS-Sprayer entscheidend für die Nachweisempfindlichkeit bei der CE-MS-Kopplung, ebenfalls für die Art der entstehenden Ionen. So kann bei der Veränderung der Kapillarposition im Sprayer durchaus eine Verschiebung der Ladungszustände der Ionen im Massenspektrum beobachtet werden. Ein Wechsel der Kapillare oder Demontage des Sprayers machen daher eine Neueinstellung der Position der Kapillare nötig. Die Positionierung der Kapillarspitze im CE-Sprayer erfolgt anhand von Skaleneinteilungen an einem Justierring am Sprayer (siehe Abbildung 3.9). Wird die CE-Kapillare eingespannt, so wird dabei der Justierring auf seine Nullposition gebracht. Gleichzeitig wird die Kapillare bündig mit der Spitze des Sprayers abschließend positioniert. Eine ganze Umdrehung des Justierrings entspricht dem Vorschub der Kapillare um etwa 1 mm. Wenn auch ein stabiler Sprayprozess immer in ähnlichen Bereichen der Positionierung erreicht werden kann, so kann doch die Signalintensität bei Veränderungen der Position von weniger als 0,1 mm um fast eine Größenordnung schwanken. Um reproduzierbare Ergebnisse der Messungen zu gewährleisten, wurde daher der Sprayer bei jeder Veränderung an der Kopplung wieder mittels einer unter konstantem Fluss kontinuierlich zugeführten Kalibriersubstanz durch Verändern der Kapillarposition über den Justierring eingestellt. Diese Einstellung wurde bei immer gleichem Fluss durch Anlegen eines von der Kapillarlänge und dem Kapillarrinnendurchmesser abhängigen Drucks durchgeführt, außerdem, da sich die Kopplung unter anliegender Hochspannung immer etwas anders verhält als unter Druck, bei einer entsprechenden Spannung. Ebenso wurden bei der Einstellung des Sprayers immer gleiche *sheath liquid* Bedingungen gewählt. Weitere Experimente wurden nach Veränderungen an der Kopplung erst dann durchgeführt, wenn es gelang den Sprayer wieder so einzustellen, dass die Signalintensität um nicht mehr als 30% von einem in Vorversuchen ermittelten Sollwert abwich. Dieser Sollwert wurde für jeweils eine Kalibriersubstanz im positiven und im negativen Ionenmodus mit festgelegtem Elektrolyten und festgelegtem *sheath liquid* bei definierten Flussraten in der Kapillare, Flussraten des *sheath liquid*, Bedingungen der ESI-Quelle und definierten

Parametern für die Datenaquisition ermittelt (Daten nicht gezeigt). Bei diesen unter standardisierten Bedingungen ermittelten Signalintensitäten für die Ionen der Kalibriersubstanzen wurde beobachtet, dass der während der Messung und beim Justieren des Sprayers angezeigte Ionenstrom der ESI-Quelle nicht zwingend in Zusammenhang mit der erhaltenen Sensitivität steht und daher kein verlässlicher Parameter für die Qualität der Kopplung ist. Wurde ein im normalen Bereichen liegender Ionenstrom von 20 nA bis 40 nA in der ESI-Quelle gemessen, so war die Signalintensität und somit auch die Empfindlichkeit der Kopplung immer im akzeptierten Toleranzbereich. Jedoch konnte sie dort auch stabil liegen, wenn nur ein Ionenstrom von 7 nA bis 9 nA gemessen wurde, was nur äußerst knapp über dem Basiswert von etwa 6 nA bis 7 nA ist.

3.3.4 Datenauswertung

Bei der Kopplung von LC-MS und CE-MS wird anstelle eines Chromatogramms oder eines Elektropherogramms ein Totalionenstrom (TIC, von *total ion chromatogram*) ausgegeben. Die Summe aller Signalintensitäten in einem Massenspektrum ergibt einen Gesamtintensitätswert für dieses eine Spektrum. Ein CE-MS-Experiment besteht aus einer Reihe von hintereinander aufgenommenen Massenspektren. Der Totalionenstrom ist nun ein Graph der Gesamtintensitätswerte aller Massenspektren des CE-MS-Experimentes als Funktion der Zeit. Aus diesem Grund sind jedoch häufig in den Spektren deutlich sichtbare Signale kaum oder gar nicht im Totalionenstrom gegen dessen Rauschen zu erkennen. Der Einfluss einiger weniger Datenpunkte in einem Spektrum, die sich vom Rauschen abheben, geht bei der Summation verloren.

Tabelle 3.2: Ein Rechenbeispiel zu Signalintensitäten im Massenspektrum und daraus folgenden Änderungen des Totalionenstroms

Intensität im Verhältnis zum Rauschen	Resultierende Intensität im TIC, relativ zum Grundwert
1-fach (nur Hintergrund)	1,00000
50-fach	1,00049
500-fach	1,00499
5000-fach	1,04999

Tabelle 3.2 gibt hierzu einige Rechenbeispiele zur Verdeutlichung. Hierbei wurden die Werte des Totalionenstroms unter der Annahme berechnet,

dass die Spektren jeweils 2^{20} Datenpunkte enthalten und ein Signal nur 10 Datenpunkte breit ist. Die erhaltenen Werte werden relativ zum Wert des Totalionenstroms eines nur aus Rauschsignalen bestehenden Massenspektrums angegeben. Es ist offensichtlich, dass auch deutliche Signale in den einzelnen Massenspektren nur schwer im Totalionenstrom zu erkennen sind, wenn man berücksichtigt, dass auch dieser nur bei Massenspektren ohne Signal bereits nicht konstant ist. Schon bei einer durch Rauschen in den Massenspektren bedingten Schwankung von nur einem Prozent ist nur das letzte berechnete Signal mit einem Signal- zu Rauschverhältnis von 5000 gut im Totalionenstrom zu erkennen. Die Abbildung 3.12 verdeutlicht das eben Erläuterte nochmals an einer Beispielmessung. Im Totalionenstrom des Experiments (schwarze Linie) ist bei Minute 16 nicht zu sehen, dass dort eine der Komponenten der gemessenen Probe migriert. Das extrahierte Massenspektrum zeigt jedoch das deutliche Signal des Ions.

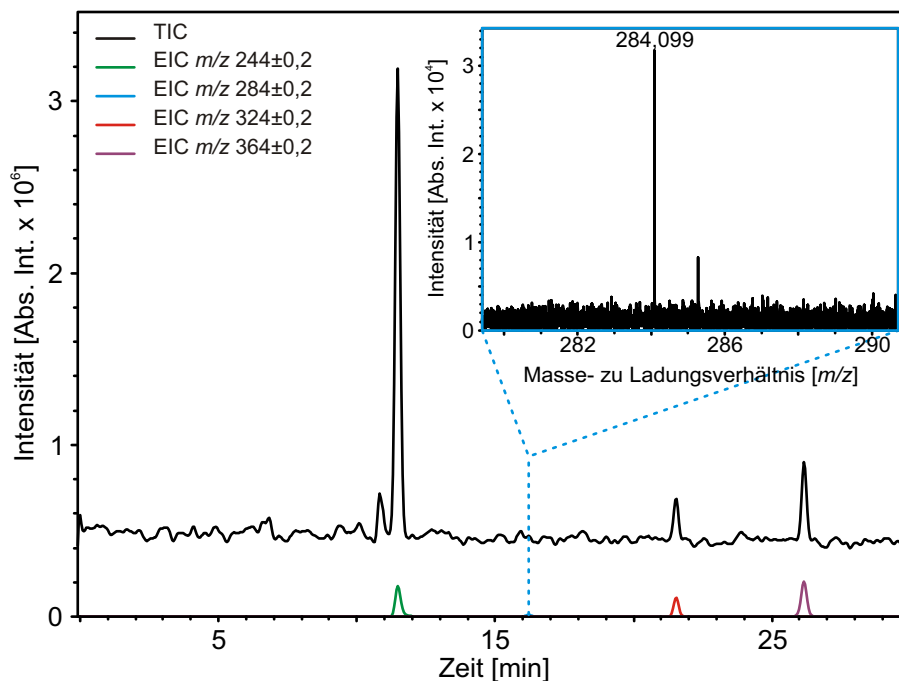


Abbildung 3.12: Das extrahierte Massenspektrum zeigt ein deutliches Signal eines Ions beim m/z 284,099. Im Totalionenstrom (schwarze Linie) dieses CE-MS-Experimentes ist nicht zu erkennen, dass etwa bei Minute 16 diese Komponente nachzuweisen ist. In Farbe sind die extrahierten Ionenströme (EIC) der vier in dieser Probe enthaltenen Substanzen.

Um diesen Nachteil dieser Darstellung der Daten zu umgehen, bietet die Auswertesoftware DataAnalysis, mit der die aufgenommenen CE-MS-

Experimente ausgewertet wurden, die Möglichkeit ein sogenanntes *extracted ion chromatogram*, kurz EIC, zu erstellen. Hierbei werden nur die Intensitäten eines schmalen Bereichs von Datenpunkten der Massenspektren aufsummiert, also eines schmalen Bereichs der Masse- zu Ladungsverhältnisse. Breite Bereiche im Massenspektrum, die nur Rauschen enthalten, oder Signale, die nicht von Interesse sind, werden somit aus der Berechnung des Ionenstromes ausgeschlossen und fallen nicht mehr ins Gewicht.

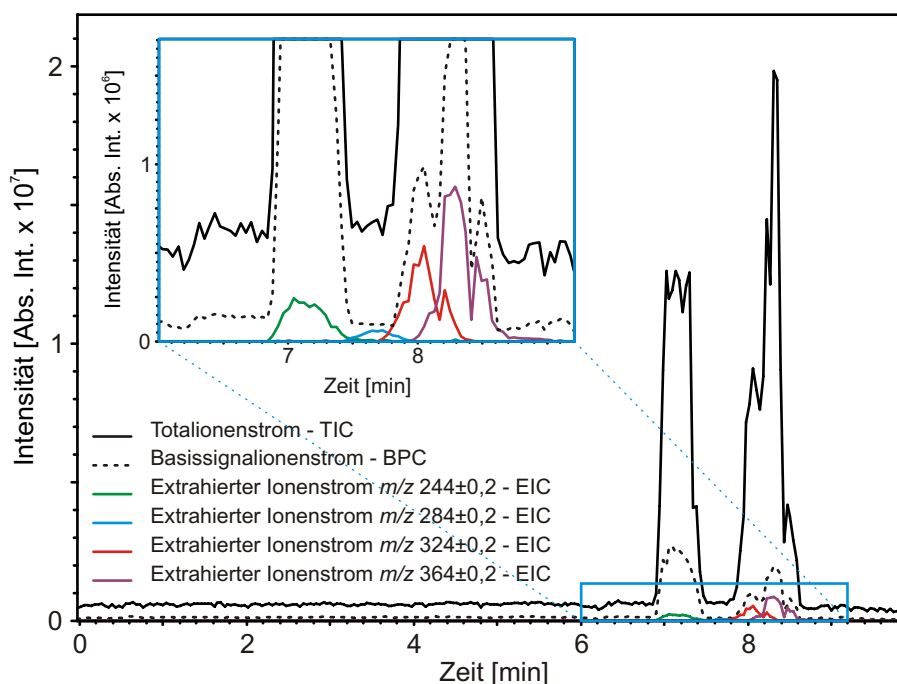


Abbildung 3.13: Vergleich zwischen den verschiedenen Typen von Chromatogrammen, die bei einem CE-MS-Experiment aus dem Totalionenstrom (*total ion chromatogram* - TIC) erstellt werden können. Der Basissignalionenstrom (*base peak chromatogram* - BPC) ist eine Addition nur derjenigen Signale aus allen MS-Spektren des CE-MS-Laufs, die über eine definierbare Anzahl von Spektren hintereinander und mit einer definierten Mindestintensität auftreten. Extrahierte Ionenströme (*extracted ion chromatogram* - EIC) sind die Summe der Intensitäten in allen MS-Spektren von nur einem kleinen, wählbaren Ausschnitt des m/z -Bereichs der Messung.

Ein weiteres Hilfsmittel um Signale in den Messdaten zu finden ohne dabei alle Spektren einzeln betrachten zu müssen, bietet die Erstellung eines sogenannten *base peak chromatogram*, kurz BPC. Dies ähnelt dem EIC, jedoch werden hier nach einstellbaren Vorgaben zu Mindestsignalintensität und Mindestsignaldauer alle aufgenommenen Massenspektren automatisch

nach Signalen abgesucht, die über dem Rauschen des Massenspektrums liegen. Auch im BPC erfolgt also eine (weitestgehende) Nichtbeachtung des Rauschens eines Massenspektrums bei der Berechnung des Ionenstroms. Beispiele für TIC, EIC und BPC sind in Abbildung 3.13 gegeben, die neben dem TIC und einem unter moderaten Vorgaben erstellten BPC auch vier EIC zu Ionen mit vier verschiedenen Masse- zu Ladungsverhältnissen zeigt.

Die erstellten Ionenströme der *online* CE-MS-Experimente wurden weiter nachbearbeitet, um die Schwankungen in der Stabilität des Ionenstroms der ESI-Quelle auszugleichen. Diese gleichen sich bei einem *offline* aufgenommenen Massenspektrum durch die Anzahl der zu einem Spektrum aufsummierten Einzelmessungen aus, sodass die Signalintensitäten von Spektrum zu Spektrum äußerst konstant sind. In CE-MS-Experimenten bestehen die Massenspektren in der Regel jedoch nicht aus mehreren aufsummierten Messungen, sondern aus Einzelmessungen, da eine möglichst hohe Zeitauflösung erwünscht ist. Schwankungen der Ionenquelle tragen daher erheblich zum Grundrauschen des Totalionenstroms bei. Dies ist dann auch in den extrahierten Ionenströmen zu sehen. Diese Schwankungen lassen sich mittels einer Glättungsfunktionen nachträglich ausgleichen, so dass die Ionenströme besser ausgewertet werden können.

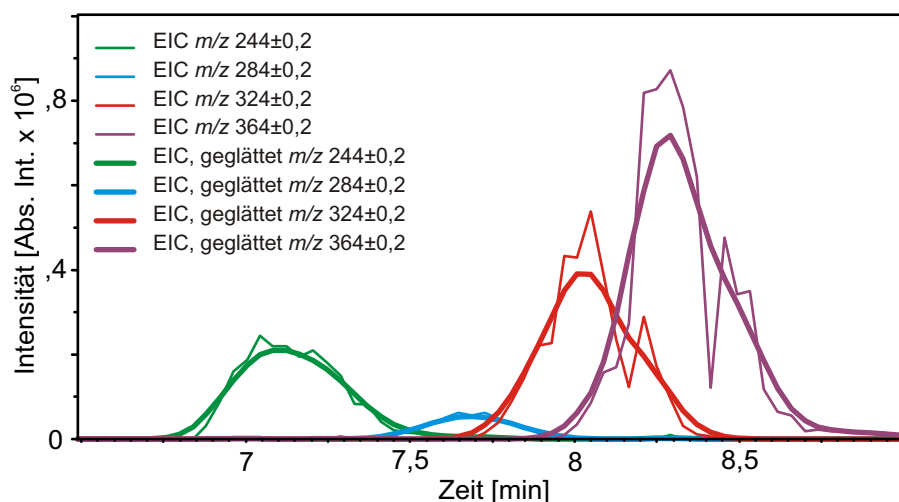


Abbildung 3.14: Vergleich von geglätteten und unbearbeiteten Chromatogrammen. In der Arbeit sind alle ab hier gezeigten Chromatogramme mittels Gauss-Algorithmus mit immer gleichen Parametern (siehe Text) geglättet. Diese Glättung gleicht instrumentell bedingte Schwankungen des Ionenstroms aus.

Bei der Glättung wird der Wert jedes Datenpunktes in Abhängigkeit seiner Umgebung neu berechnet. In der Arbeit werden nur mit Hilfe eines in

der Auswertesoftware DataAnalysis enthaltenen, Gauss'schen Glättungsalgorithmus' mit immer gleichen Parametern (ein Durchlauf, Berücksichtigung nur des direkt benachbarten Messpunktes) geglättete Ionenströme gezeigt. Abbildung 3.14 zeigt beispielhaft die Auswirkungen einer solchen Glättung.

Kapitel 4

Material

Im Folgenden werden das in der Arbeit verwendete Material aufgeführt. Dies betrifft sämtliche für den Bau der Kapillarelektrophorese-Anlage benutzten Materialien und Geräte, sowie die im Laufe der Experimente benutzten Proben, Spraylösungen und Verbrauchsmaterialien wie zum Beispiel Kapillaren und Probenbehälter. Auf den Aufbau der selbst gebauten CE-Anlage wird im Ergebnisteil eingegangen (siehe Abschnitt 5.1). Zu Beginn wird eine tabellarische Übersicht aller in dieser Arbeit genannten Hersteller und Bezugsquellen mit ausführlichen Angaben zur Anschrift gegeben. Im der gesamten Arbeit wird in der Regel nur der Kurzname der jeweiligen Bezugsquelle oder des jeweiligen Herstellers genannt.

Tabelle 4.1: Übersicht über die Hersteller beziehungsweise Lieferanten aller in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte (in alphabetischer Reihenfolge)

Kurzname	Hersteller oder Händler (Anschrift)
Agilent	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland
Avanti	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA
Chromacol	Chromacol LTD, Herts, UK
Beckman	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Bruker	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
CHM	Chromatographie-Handel Müller GmbH, Fridolfing, Deutschland
Conrad	Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
CS	CS - Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
DNU	DNU - MS GmbH, Berlin, Deutschland

Emsa	EMSA GmbH, Emsdetten, Deutschland
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Göhler	Göhler HPLC-Analysentechnik GmbH, Chemnitz, Deutschland
Hamilton	HAMILTON Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Heraeus	W. C. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Lemo	Lemo Elektronik GmbH, München, Deutschland
Max Bahr	Max Bahr Holzhandlung GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
MS Wil	MS Wil GmbH, Wil, Schweiz
Neolab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Norgren	Norgren GmbH, Alpen, Deutschland
Roth	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
RS	RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Traufkirchen, Deutschland
Spellman	Spellman High Voltage Corporation, Hauppauge, NY, USA
Topa	TOPA GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Upchurch	Upchurch Scientific, Inc., Oak Harbor, WA, USA
VWR	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

4.1 Gerätebau Kapillarelektrophorese

Im Folgenden werden die zum Bau der Kapillarelektrophorese-Anlage benötigten Teile aufgeführt. Zum Aufbau der Anlage wurde weitestgehend auf handelsübliche Baumaterialien zurückgegriffen. Handelsüblich meint hierbei, dass sowohl das verwendete Baumaterial als auch verwendete Teile bei Händlern für Laborbedarf oder auch im Baumarkt erhältlich sind. Diese Teile sind also nicht zwingend nur über den genannten Hersteller oder Händler zu beziehen. Spezialteile und zusätzlich benötigte einzelne Geräte wie zum Beispiel die Hochspannungseinheit oder der Druckregler können nur bei den angegebenen Firmen erworben werden. Die in den Tabellen angegebenen Artikelnummern beziehen sich entweder auf die Produktnummer des Herstellers

oder auf die Artikelnummer beim Händler.

Tabelle 4.2: Baumaterial, Geräte und Teile, die beim Bau der Kapillarelektrophorese-Anlage verwendet wurden

Artikel	Artikelnummer	Bezugsquelle
Präzisions-Druckregler G1/4, bis 4 bar (Norgren)	58 07 28-07	Conrad
Schnellkupplungen G1/4, Dose (Norgren)	58 23 67-07	Conrad
Schnellkupplungen G1/4, Stecker (Norgren)	58 25 37-07	Conrad
Doppelnippel G1/4-G1/4 (Norgren)	58 16 30-07	Conrad
T-Verteilerstück G1/4 (Norgren)	58 17 06-07	Conrad
Winkelstücke G1/4 (Norgren)	58 14 63-07	Conrad
Schottverschraubungen G1/4 (Norgren)	58 14 20-07	Conrad
Schottverbindung, gerade, 4 mm (Norgren)	58 20 63-07	Conrad
Schottverbindung, gerade, 6 mm (Norgren)	58 20 76-07	Conrad
Dichtringe G1/4A (Norgren)	58 15 52-07	Conrad
Polyamidrohr, 6 mm Außendurchmesser, 4 mm Innendurchmesser (Norgren)	58 17 07-07	Conrad
PVC-Schlauch, 6 mm Innendurchmesser (Norgren)	58 24 67-07	Conrad
Schlauchklemmen 6 mm (Norgren)	58 17 56-07	Conrad
Schlauchklemmen 12 mm (Norgren)	58 17 94-07	Conrad
Reduziermuffen G1/2-G1/4 (Norgren)	58 15 49-07	Conrad
Muffe G1/4-G1/4 (Norgren)	58 15 01-07	Conrad
Einschraub-Schlauchtüllen G1/4A, 6 mm (Norgren)	58 15 76-07	Conrad
Winkel-Einschraubverbindung, drehbar, G1/4, 6 mm (Norgren)	58 20 24-07	Conrad
Einschraubfilter G1/4A (Norgren)	58 12 07-07	Conrad

Dreiwege-Kugelhahn G1/4 (Nor- gren)	58 26 56-S3	Conrad
Schrumpfschläuche	60 77 54-62	Conrad
Bananenbuchse, 4 mm	73 37 33-62	Conrad
Gerätefüsse, selbstklebend	54 01 61-LN	Conrad
Acrylplatten, Stärke 6 mm, 30 cm * 50 cm	680-886	RS
Schrauben (Kunststoff), M4	525-688	RS
Muttern (Kunststoff), M4	525-717	RS
Unterlegscheiben (Kunststoff), M4	525-745	RS
Hochspannungsgerät, bis 30 kV	CZE1000R	Spellman
Differenzdruckmeßgerät, 250 mbar, G.-klasse 1,6	MMD / 100 / STM / AU / 250 mbar	Topa
Hochspannungskabel	130 660	Lemo
Hochspannungsstecker	FFA.3Y.430.CLA62	Lemo
Hochspannungsbuchsen	PSA.3Y.430.CLLC62	Lemo
Isolierband	-	Max Bahr
Montageklebeband	-	Max Bahr
Aluminiumplatten, perforiert, Stärke 1,5 mm	-	Max Bahr
Kistenecken (Metall)	-	Max Bahr
Gewindestange, M8	-	Max Bahr
Gewindestangengriff, M8	-	Max Bahr
Scharniere	-	Max Bahr
Schrauben (Metall), M4	-	Max Bahr
Muttern (Metall), M4	-	Max Bahr
Winkel (Metall)	-	Max Bahr
Schleifpapier K600	-	Max Bahr
Probenaufbewahrungsbox ¹	N195.1	Roth
Druckdichter Plastikbehälter, 250 ml Volumen	502233 EM	Emsa
PtRb-Draht, Durchmesser 0,5 mm	-	Hereaus
<i>Tubing sleeves</i> (Upchurch)	F-242X	Göhler
<i>Tubing sleeves</i> (Upchurch)	F-185	Göhler
<i>Union assy</i> (Upchurch)	P-742	Göhler
<i>Union assy microtight</i> (Up- church)	P-720	Göhler

¹Der Probenhalter wurde aus Teilen einer solchen Box gebaut

4.2 Kopplung an das Massenspektrometer

Für die Kopplung sowohl der selbstgebauten Kapillarelektrophorese-Anlage als auch des P/ACE MDQ wurde im Falle der *sheath liquid* Kopplung mit einem CE-Sprayer von Agilent gearbeitet (Modellbezeichnung: CE-ESI Sprayer, Modellnummer: G1607-60001). Die Kopplung des P/ACE MDQ benötigte ein spezielles Adapterkit seitens des Herstellers (Modellbezeichnung: EDA Capillary Adapter Assembly, Modellnummer: 144822), mit dessen Hilfe die Kapillare für die Kopplung an ein Massenspektrometer aus dem Gerät herausgeführt werden kann.

4.3 Proben und Verbrauchsmaterial

Das verwendete Verbrauchsmaterial lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Zum Einen gehören hierzu sämtliche Chemikalien, die zur Herstellung der Spraylösungen und der Elektrolytlösungen verwendet wurden. Zum Anderen sind dies sämtliche Verbrauchsgegenstände, wie zum Beispiel Kapillaren und Probenbehälter. Die in den Versuchen verwendeten Proben sind der besseren Übersichtlichkeit halber separat von den restlichen Chemikalien aufgeführt. Das zum Ansetzen verschiedener Elektrolytlösungen und Spraylösungen verwendete Reinstwasser wurde mit einer Millipore Anlage deionisiert, die Eigenleitfähigkeit lag bei unter $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ bei 20°C . Messungen von pH-Werten wurden mit einem pH-Meter von VWR durchgeführt (Modell pH 100, Artikelnummer: 662-9901).

Tabelle 4.3: Verwendete Chemikalien

Artikel	Artikelnummer	Bezugsquelle
Chloroform	102444	Merck
Methanol	106007	Merck
2-Propanol	101040	Merck
Essigsäure	100066	Merck
Acetonitril	100030	Merck
Natriumhydroxid	567530	Merck
Triethylamin	90335	Sigma
Ammoniumacetat	A7330	Sigma
6-Amminocaprinsäure	A7824	Sigma

Tabelle 4.4: Verbrauchsmaterial

Artikel	Artikelnummer	Bezugsquelle
Probenbehälter 0,3 ml (Chromacol)	03-FISV	CHM
Probenbehälterdeckel (Chromacol)	9-SC(B)-ST1	CHM
Probenbehälter PCR (Beckman)	144709	Beckman
Probenbehälteraufsätze PCR (Beckman)	144656	Beckman
Probenbehälter 2 mL (Beckman)	144980	Beckman
Probenbehälteraufsätze 2 mL (Beckman)	144648	Beckman
Quarzglaskapillare, unbelegt, 20 μm Innendurchmesser	100020375-01	CS
Quarzglaskapillare, unbelegt, 50 μm Innendurchmesser	105180-01	CS

Die in der Arbeit verwendeten Proben des Lipid A und des LPS wurden in der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel von Frau Helga Lühje hergestellt und isoliert. Das Lipid A der Probe HL58 stammt ebenso wie das LPS R345 der Probe HL119 von *Salmonella enterica* Serovar Minnesota. Das LPS F515 der Probe HL72 wurde aus *Escherichia coli* isoliert. Zu genauen Angaben über die Bakterienanzucht und die Isolation des LPS beziehungsweise des Lipid A wird an dieser Stelle auf Literatur zur LPS Isolation verwiesen [51]. Alle verwendeten Substanzen wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 4.5: Probensubstanzen

Artikel	Artikelnummer	Bezugsquelle
Peptidmix	H2016	Sigma
Angiotensin I	A9650	Sigma
Adenosin	K10025A	Sigma
Cytidin	K10025A	Sigma
Guanosin	K10025A	Sigma
Uridin	K10025A	Sigma
Adenosinmonophosphat	K10025A	Sigma
Cytidinmonophosphat	K10025A	Sigma
Guanosinmonophosphat	K10025A	Sigma
Uridinmonophosphat	K10025A	Sigma
Ganglioside (Rinderhirn)	G2375	Sigma

PI ² (Rinderleber)	840042	Avanti
DOPC ³	850375	Avanti
DOPE ⁴	850725	Avanti
DMPS ⁵	840445	Avanti
DMPG ⁶	840033	Avanti
Lipid A	HL58	LG Biophysik
LPS F515	HL72	LG Biophysik
LPS R345	HL119	LG Biophysik

²L- α -Phosphatidylinositol

³1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin

⁴1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin

⁵1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)]

⁶1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-L-Serin]

Kapitel 5

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in drei Abschnitte untergliedert dargestellt. Die Unterteilung ergibt sich zum Teil aus der Aufgabenstellung, die neben der Etablierung der Analytik von nativem LPS auch den Bau einer Kapillarelektrophorese-Anlage vorsah. Da sich die Entwicklung der Software etwas von der eigentlichen Strukturanalytik absetzt, wird auf diese in einem eigenen Abschnitt eingegangen.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit dem Bau der Anlage und demonstriert die volle Funktionsfähigkeit des Eigenbaus anhand einiger Beispiele. Des Weiteren wird in diesem Teil auf einige Besonderheiten der Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie eingegangen, deren Beachtung bei der Versuchsdurchführung essentiell für erfolgreiche Messungen ist. Diese Beobachtungen gelten nicht nur für das Arbeiten mit dem Eigenbau, sondern auch im Falle der Benutzung der P/ACE MDQ.

An die Ergebnisse zum Bau und zur Funktionsfähigkeit der selbst gebauten Anlage sowie die Ergebnisse zur Kopplung schließt sich die Entwicklung einer CE-MS-Analytik zur Untersuchung amphiphiler Biomoleküle aus bakteriellen Zellmembranen, aber auch aus Zellmembranen allgemein, an. Der Fokus liegt hierbei auf Untersuchungen zu einer möglichen Nutzung einer CE-MS-Kopplung zur Analyse von Lipopolysacchariden. Es werden Ergebnisse von Versuchen zur Bestimmung eines nutzbaren Elektrolyten gezeigt, ebenso im weiteren Verlauf Ergebnisse zur Trennleistung des favorisierten Elektrolytsystems im Falle von Lipid A, Tiefraummutanten- und Raummutanten-LPS. Spezielles Augenmerk wurde hierbei auf die Nachweisempfindlichkeit und Ionisationseffizienz unter verschiedenen Bedingungen gelegt. Abschließend folgen Ergebnisse zu Untersuchungen zur Trennleistung des etablierten CE-MS-Systems im Falle von Glycerophospholipiden, die als Kontamination in LPS-Isolaten auftreten können, und Glykosphingolipiden.

Im letzten Teil der Ergebnisse folgt die Beschreibung der Software-gestützten

Auswertung. Es wird in diesem Abschnitt auf zugrunde liegende Ideen und Konzepte der Software eingegangen, sowie auf deren Umsetzung in dem Programm. Es werde Beispiele nur Nutzung der Software bei der Auswertung von Massenspektren von Glykosphingolipiden gegeben.

5.1 Eigenbau einer Kapillarelektrophorese

Der erste Abschnitt der Ergebnisse beschreibt den Aufbau der selbst gebauten CE-Anlage. Hierbei sind insbesondere das Druckeinlass-System und die elektrische Isolation von Bedeutung. Im zweiten Abschnitt folgt eine Charakterisierung der Kopplung. Da das Massenspektrometer sowohl mit der selbst gebauten als auch mit der kommerziellen Anlage gekoppelt werden sollte, sind hier Ergebnisse mit beiden Anlagen gezeigt. Die Reproduzierbarkeit wird beim Eigenbau besonders betrachtet, da dort manuell Beladen wird. Weiterhin wird auf Experimente eingegangen, die zu Klärung einiger allgemeiner Beobachtungen beitragen, die sich im Laufe der Arbeit ergeben haben.

5.1.1 Aufbau

In dem massenspektrometrischen Labor am Forschungszentrum Borstel war keine Kapillarelektrophorese vorhanden als die Idee aufkam, die exzellente Trennleistung dieser Methode durch eine direkte Ankopplung an das hochauflösende Massenspektrometer zur Charakterisierung von Lipopolysacchariden zu nutzen. Der Eigenbau einer solchen Anlage wurde aufgrund der erheblich günstigeren Kosten favorisiert. Ebenfalls war die Möglichkeit von Bedeutung, durch einen Eigenbau eine sehr kleine, direkt an der Ionenquelle platzierbare Anlage nutzen zu können, die sehr kurze Kapillaren ermöglichen würde. Kommerzielle Anlagen lassen kaum so positionieren und koppeln, dass Kapillaren von deutlich unter einem Meter Länge genutzt werden können. Dies hat sich anhand der ab Sommer 2007 auf Leihbasis von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese von der Universität Bonn zur Verfügung gestellten Anlage der Firma Beckman bestätigt. Diese kann nicht mit Kapillaren unter 80 cm Länge gekoppelt werden. Kürzere Kapillaren bedeuten jedoch höhere mögliche Feldstärken und somit bessere und schnellere Trennungen.

Die selbst gebaute Kapillarelektrophorese-Anlage ist an das Massenspektrometer gekoppelt in Abbildung 5.1 zu sehen. Das Gehäuse hat die Dimension von 20 cm Breite und jeweils 30 cm Höhe und Tiefe. Es ist in diesen Ausmaßen, wie auch in der Abbildung zu sehen, optimal an die ESI-Ionenquelle anschließbar. Durch dieses Design sind Kopplungen mit einer kürzestmöglich-

chen Kapillarlänge von 45 cm im Falle der *sheath liquid* Kopplung und von nur 30 cm im Falle der direkten Kopplung via Nano-ESI-Anschluss möglich. In Verbindung mit der kommerziell erworbenen Hochspannungseinheit, die strombegrenzt ($300\ \mu\text{A}$) bis zu 30 kV liefert, sind so Feldstärken von bis zu einem Kilovolt pro Zentimeter möglich. Dies ist aufgrund der kurzen verwendbaren Kapillaren etwa das Dreifache dessen, was bei Nutzung der P/ACE MDQ möglich ist.

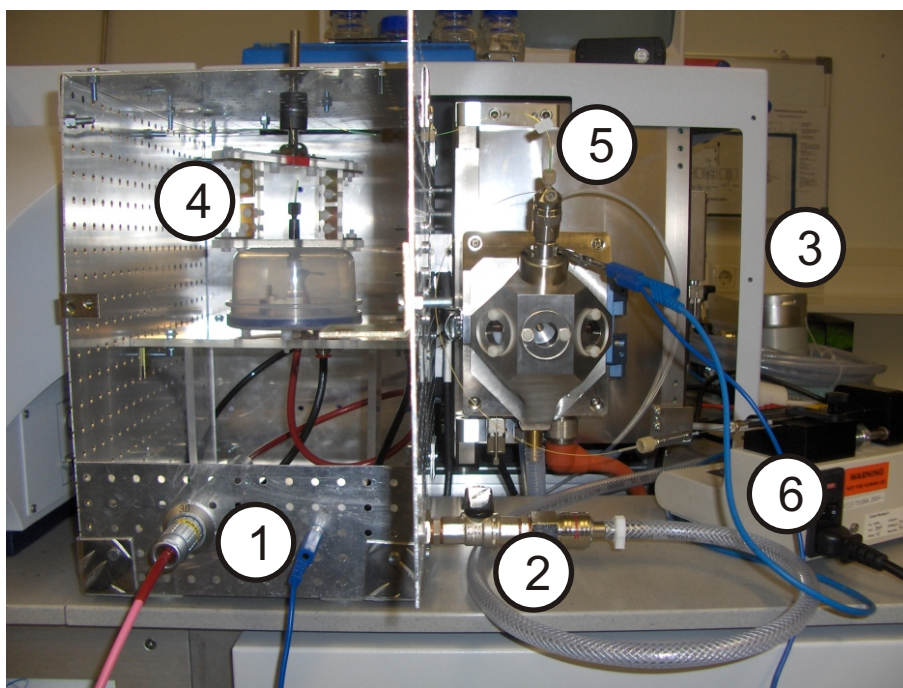


Abbildung 5.1: Die selbstgebaute Kapillarelektrophorese-Anlage gekoppelt an die ESI-Quelle des Massenspektrometers. An **1** ist links der Hochspannungsanschluss zu erkennen, rechts die Erdung des Gehäuses. Die Hochspannungsversorgung ist nicht mit abgebildet. **2** ist der Druckluftanschluss, hier noch mit einem anfänglich installierten Kugelhahn, der später durch einen Dreiwegehahn ersetzt wurde. Dazu gehören an **3** im Hintergrund der Präzisionsdruckregler und das Differenzdruckmeßgerät. Im Gehäuse (**4**) ist der druckdichte Behälter zu sehen, in dem sich die Probe befindet. Des Weiteren sind die Zuleitungen für Druck und Hochspannung zu sehen, sowie die Anpressvorrichtung, bei der auch die Kapillare aus dem Druckgehäuse geführt wird. Bei **5** ist die ESI-Quelle zu sehen, mit dem Agilent CE-Sprayer. Dieser hat Zuführungen für die Kapillare, das Zerstäubergas, sowie die Zuleitung für das *sheath liquid*. Dieses wird über die Hamilton-Spritze in dem Probengeber zugeführt (**6**).

Für die Kopplung an die vorhandene ESI-Quelle wurde ein kompatibler koaxialer Sprayer der Firma Agilent verwendet. Das Gehäuse enthält an der Front Anschlüsse für Hochspannung und zur Erdung. Zur Beladung und zum Spülen der Kapillare gibt es einen Druckluftanschluss. Die Druckluft wird mittels eines Druckbegrenzers von den 5 Bar des Laboranschlusses auf einstellbare Werte von 0 mbar bis 250 mbar über Umgebungsdruck reguliert. Zur Kontrolle ist ein Differenzdruckmanometer in der Zuleitung zum Gehäuse verbaut. Im Gehäuse der CE-Anlage ist, mit Hilfe von Acrylplatten elektrisch vom Gehäuse selbst isoliert, ein druckdichter Behälter eingebaut. Dieser ist das Einlass-System der Anlage, Hochspannung und Druckluft werden über Schottverbindungen in den Behälter geführt. Die CE-Kapillare wird mit einem an sich für die Verbindung von Schläuchen bei HPLC-Anlagen gedachten Verbinder (*union assy microtight* von Upchurch) in den Druckbehälter geführt. Der Deckel dieses Behälters ist abnehmbar, um Proben- und Elektrolytgefäße einsetzen und tauschen zu können. Beim Beladen und beim Spülen der Kapillare kann dieser Deckel entweder von Hand gehalten werden oder mittels einer Halterung arretiert werden. Der Druckbehälter ist bis zu einem angelegten Überdruck von 200 mbar druckdicht. Die Einlassseite wurde baulich auf gleiche Höhe zum Auslass der Kapillare in der ESI-Quelle gebaut, um einen Siphoneffekt bei den Versuchen durch einen Höhenunterschied zu vermeiden.

5.1.2 Kopplung

Wichtigster Faktor für Qualität und damit auch die Nutzbarkeit der Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer ist die Nachweisempfindlichkeit. Diese hängt von einer ganzen Reihe von Faktoren ab. Der verwendete Elektrolyt, vor allem aber das verwendete *sheath liquid* müssen eine gute Spraylösung für den Analyten sein. Das bedeutet, dass der Analyt in dem sich in der Spitze des Sprayers bildenden Gemisch sehr effizient in die ionisierte Gasphase überführt werden können muss. Gleichzeitig müssen der Elektrolyt eine gute Trennung und das *sheath liquid* einen sicheren elektrischen Kontakt ermöglichen. Die Nachweisempfindlichkeit ist weiterhin von Ionenquellen-Parametern wie angelegten Spannungen und Gasflüssen des Zerstäuber- und des Trockengases abhängig. Den größten Einfluss hat jedoch wie bereits in Kapitel 3.3.3 erwähnt die Position der CE-Kapillare in der Spitze des Sprayers relativ zu deren Spitze. Für alle in der Arbeit gezeigten Experimente gilt, dass all diese Parameter jeweils für jedes Experiment vor Beginn hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit optimal eingestellt wurden. Nach der Nachweisempfindlichkeit ist die Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Migrationszeiten der Analyte und im Hinblick auf die Beladung, also die in

die Kapillare injizierte Probenmenge, wichtig. Die Beladung sollte bei der kommerziellen Anlage von Beckman als reproduzierbar gelten. Dies hat sich auch in Experimenten bestätigt (Daten nicht gezeigt). Bei der selbst gebauten Anlage kann dies jedoch nicht als selbstverständlich gelten, da die Beladung der Kapillare hier nicht automatisiert, sondern von Hand erfolgt. Dies bedeutet mögliche Schwankungen beim angelegten Druck und vor allem bei der Injektionszeit. Da der angelegte Druck über das Differenzdruckmanometer gut kontrollierbar ist, kann vor allem die nur von Hand und per Blick auf eine Uhr kontrollierte Injektionsdauer zu Unterschieden in der injizierten Probenmenge führen. Weiterhin hat der verwendete Elektrolyt großen Einfluss auf die Migrationsdauer und die Trennleistung der Kapillarelektrophorese. Um den möglichen Einfluss einer Veränderung des Elektrolyten, zum Beispiel durch Abdampfen leicht flüchtiger Komponenten, zu verhindern, wird dieser in der Regel vor jedem Experiment erneuert. Ein letzter Punkt, der jedoch nur in Abhängigkeit von Probe und verwendetem Elektrolyten auftreten kann, sind Veränderungen an der Kapillaroberfläche durch Probenanlagerungen. Diese würde den elektroosmotischen Fluss und somit die Migrationszeiten beeinflussen.

Um die Reproduzierbarkeit der Experimente dieser Anlage zu demonstrieren, wurde folgendes Experiment mit der selbst gebauten Anlage durchgeführt. Eine Probe von LPS F515 wurde dreimal hintereinander gemessen, ohne jedoch zwischen den Messungen den Elektrolyten zu erneuern. Das Experiment wurde absichtlich nicht unter bestmöglichen Bedingungen durchgeführt, um auch real den Einfluss von Elektrolytveränderungen bei den für die Auftrennung von LPS verwendeten Elektrolyten zu testen. Als *sheath liquid*, als Elektrolyt und zum Aufnehmen der Probe wurde eine Mischung aus Wasser, Isopropanol, Triethylamin und Essigsäure (25/25/0,03/0,01 nach Volumen), eingestellt auf pH 8,9, benutzt. Diese wird im Folgenden als LPS 89 bezeichnet. Es wurde eine unbelegte Glaskapillare mit 50 μm Innendurchmesser und 50 cm Länge verwendet. Das *sheath liquid* wurde mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugeführt, die angelegte Spannung betrug 25 kV, was einer Feldstärke von 500 V/cm entspricht. Die Probe lag in einer Konzentration von 100 μM vor. Die Probe wurde durch Anlegen von 50 mbar Überdruck für 5 s injiziert. Mit der gegebenen Probenkonzentration und der verwendeten Kapillare ergibt das unter Annahme einer Viskosität der Flüssigkeit von 0,015 g/(cm*s) etwa 500 fmol injizierte Probensubstanz. Zwischen den Läufen wurde die Kapillare jeweils für 10 min bei 100 mbar Druck mit dem Elektrolyten gespült. Der beobachtete CE-Strom lag bei den Experimenten unter 1 μA , die elektrische Leistung somit bei unter 0,03 W.

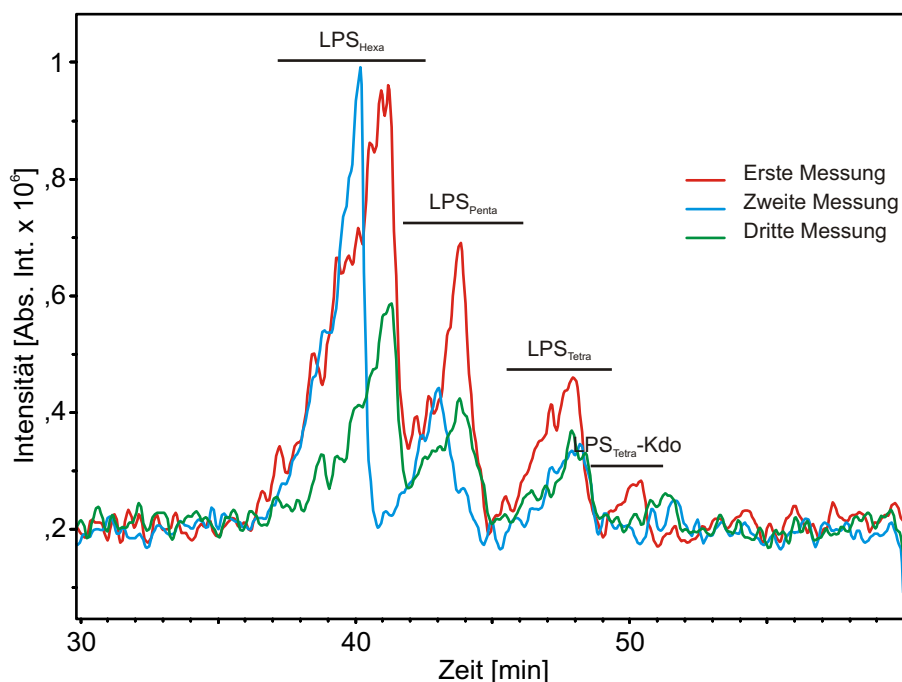


Abbildung 5.2: Um die Reproduzierbarkeit der Messungen bei Verwendung der selbstgebauten Kapillarelektrophorese-Anlage zu testen, wurde ein und dieselbe LPS F515 Probe dreimal direkt hintereinander gemessen. Der Elektrolyt zwischendurch nicht erneuert, um zu testen, wie reproduzierbar das System unter ungünstigen Bedingungen ist. Zwischen den Messungen wurde die Kapillare zwanzig Minuten bei 100 mbar Druck mit demselben Elektrolyten für 10 min gespült. Die Messungen wurden mit einer Kapillare von 50 cm Länge und 50 μm Innendurchmesser durchgeführt. Es wurden am Einlass 25 kV für 60 Minuten angelegt. Die Kapillare wurde jeweils durch Anlegen von 50 mbar Druck für 5 s mit etwa 0,5 pmol LPS F515 beladen. Es handelt sich bei den gezeigten Chromatogrammen um Totalionenströme, die Auftrennung nach den einzelnen Hauptbestandteilen der Probe ist eingezeichnet.

Abbildung 5.2 zeigt die Ergebnisse der drei Läufe, überlagert in einem Spektrum. Dargestellt sind jeweils die Totalionenströme. Es ist die die Auftrennung der Probe in hexaacyl-, pentaacy-, und tetraacyl-Re-LPS sowie einer kleinen Fraktion von tetraacyl-Re-LPS, dem ein Kdo fehlt, zu erkennen. Die folgende Tabelle zeigt die Auswertung dieser Versuche nach Migrationszeit und Intensität der Signale, sowohl absolut als auch relativ zum stärksten Signal. Die Intensität jedes Signals wurde anhand des EIC jeder Spezies aus der Fläche des Signals mit Hilfe von Data Analysis ermittelt. Ebenso

wurde die Migrationszeit mit Data Analysis ermittelt. Die EIC sind in der Abbildung nicht dargestellt. Bei der Erstellung der EIC zeigte sich, dass das tetraacyl-Re-LPS zwei Signale gibt. Neben dem Hauptsignal gibt es eine zweite kleine Fraktion, die kurz vorher eluiert. Diese beiden Spezies sind daher in der Tabelle durchnummeriert. Abbildung 5.3 zeigt beispielhaft eines der Experimente mit den extrahierten EIC.

Tabelle 5.1: Reproduzierbarkeit bei manueller Injektion

Signal	Migrationszeit [min]	Intensität [Abs. Int. x 10⁶]	Intensität [Rel. Int.]
Hexaacyl-Re-LPS	40,92 ± 0,36	13,37 ± 0,30	100 ± 0,00
Pentaacyl-Re-LPS	43,56 ± 0,25	5,58 ± 0,98	43,27 ± 5,23
Tetraacyl-Re-LPS (1)	44,01 ± 0,18	0,28 ± 0,08	2,10 ± 0,25
Tetraacyl-Re-LPS (2)	48,14 ± 0,13	7,10 ± 1,58	54,17 ± 6,12
Tetraacyl-Re-LPS - Kdo	51,13 ± 0,39	1,09 ± 0,23	8,37 ± 0,92

Die Daten zeigen, dass die manuelle Injektion gute Reproduzierbarkeit zeigt. Ebenso scheint der Elektrolyt sich nicht über die Dauer der Experimente, zusammengenommen etwa vier Stunden, entscheidend zu verändern. Die Reproduzierbarkeit der Intensitäten relativ zu einander kann als sehr gut gelten, gleiches gilt für die Migrationszeiten. Die Reproduzierbarkeit der absoluten Intensität ist dagegen weniger gut. Für viele in der Arbeit gemachte Aussagen, insbesondere wenn es um Effekte der Ionensuppression geht, ist die Reproduzierbarkeit der Intensitäten relativ zueinander wichtiger. Somit ist der Eigenbau gut nutzbar. Weiterhin zeigt das Experiment die Trennung einer Re-LPS Spezies nach Anzahl der Fettsäuren und nach Länge des Oligosaccharidteils und demonstriert somit bereits, dass die in der Arbeit gestellte Aufgabe erfüllt werden kann. Das Signal- zu Rauschverhältnis in den einzelnen Massenspektren lag jeweils für die aufgetrennten Spezies zwischen 306 für das hexaacyl-Re-LPS und 17 für die erste Fraktion des tetraacyl-Re-LPS.

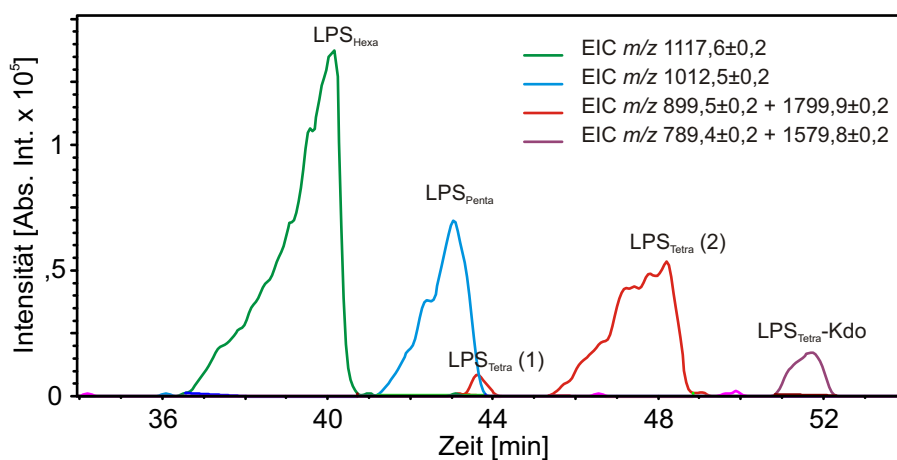


Abbildung 5.3: Die Abbildung zeigt extrahierte Ionenströme (EIC) der monoisotopischen Signale der vier in dem Experiment aufgetrennten Re-LPS-Spezies. Der EIC des tetraacyl-Re-LPS zeigt zwei Signale, dies war auch bei den anderen Wiederholungsmessungen der Fall. Es gibt also zwei Fraktionen des tetraacyl-Re-LPS.

Auffallend an den gezeigten EIC, zu sehen in Abbildung 5.3, ist, dass die Signale sehr breit und nicht symmetrisch sind. Die steile Endflanke wird in der Literatur durch eine deutlich größere Probenmobilität als Elektrolytmobilität erklärt und ist keine Folge von Probenanlagerung an der Kapillarwand. Diese Art von Asymmetrie wurde auch nur selten so deutlich bei den Experimenten beobachtet, vermutlich aufgrund der hier eingesetzten Konzentration. Die Erklärung der Signalbreite ist dagegen deutlich schwieriger. Diese wurde bei allen Experimenten mit Kopplung an das Massenspektrometer beobachtet. Hier gibt es eine ganze Reihe an möglichen Erklärungen. Die Verbreiterung kann in zu hoher Temperatur begründet liegen. Es kann ein Diffusionseffekt der Probe aus der Probenbande in den Elektrolyten sein. Es könnte Adsorption der Probe an die Kapillarwände sein, auch wenn diese nicht für die Asymmetrie verantwortlich ist. Es könnte ein Verschleppungseffekt beim Sprayprozess in der Spitze des Sprayers sein. Schließlich könnte es sich noch um einen realen Trenneffekt handeln, bei dem sich hinter den einzelnen Spezies weitere Massenisomere verbergen, deren Antrennung hier zu sehen ist.

Um diese für die weitere Arbeit wichtigen Fragen beantworten zu können wurden eine Reihe weiterer Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse hier vorgestellt werden. Da ein wichtiges Hilfsmittel zur Beantwortung der Fragen der Vergleich von *online* und *offline* Messungen ist, wurde diesen Fragen nicht mit Messungen an Lipopolysacchariden nachgegangen, sondern mit Peptiden

und Nucleosiden beziehungsweise Nucleotiden. Lipopolysaccharide sind zum einen eine der am schwierigsten mittels Kapillarelektrophorese zu trennenden Substanzklassen. Wichtigstes Argument gegen diese Stoffklasse ist jedoch ihre schlechte Detektierbarkeit mit dem *offline* verwendeten PDA-Detektor. Dieses Problem wird durch den zur Trennung notwendigen Elektrolyten noch verschärft. Peptide wie auch Nucleoside und Nucleotide sind hingegen gut *offline* wie auch *online* zu detektieren. Auch stellen Peptide eine der wenigen Substanzklassen dar, bei der die Möglichkeiten zur *online* CE-MS-Trennung gut beschrieben sind. Schließlich, als wohl wichtigstes Argument, zeigte sich die ungewöhnliche Signalbreite auch bei diesen Substanzen.

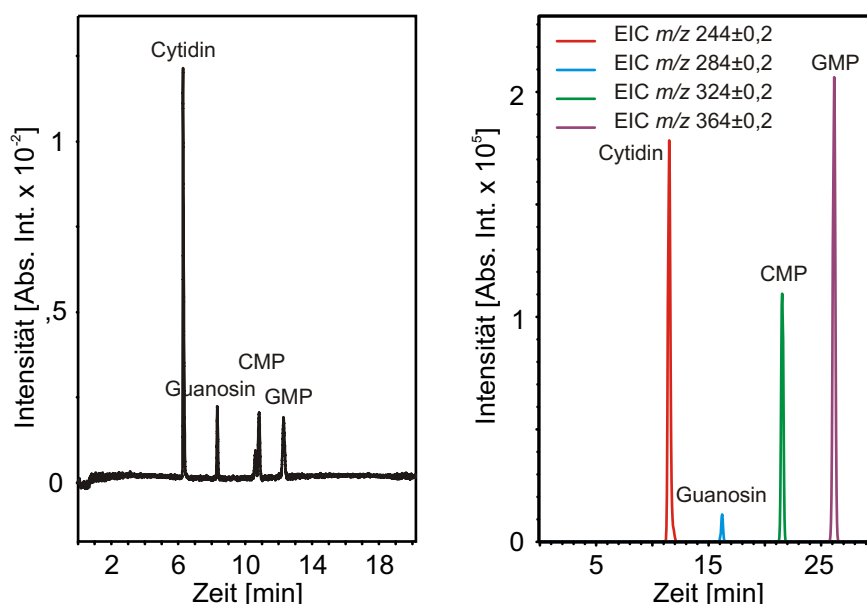


Abbildung 5.4: Die Abbildung zeigt links das Absorptionsspektrum des PDA-Detektors, rechts die Ionenströme eines CE-MS-Experimentes einer Probe mit jeweils zwei Nucleosiden und Nucleotiden. Die Signale bei Verwendung des Massenspektrometers als Detektor sind, bei Berücksichtigung der Darstellung, deutlich breiter.

Als Beispiel zeigt Abbildung 5.4 die Trennung von Cytidin (C), Guanosin (G), Cytidinmonophosphat (CMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) in einem Elektrolyten aus Essigsäure und Wasser (3/17, nach Volumen). Die Proben wurden in einer Mischung aus Wasser, Acetonitril und Essigsäure aufgenommen (30/10/0,4, nach Volumen). Bei den *offline* Messungen betragen die Probenmengen bei Beladung der Kapillare etwa 10 pmol Cytidin, 5 pmol Guanosin und jeweils 1,9 pmol CMP und GMP. Bei den *online* Messungen

wurde die Kapillare mit etwa 600 fmol Cytidin, 300 fmol Guanosin und jeweils 120 fmol CMP und GMP befüllt. Bei den *offline* Messungen wurde eine 60 cm lange, unbelegte Kapillare mit 50 μm Innendurchmesser benutzt, die angelegte Feldstärke betrug 500 V/cm. Die *online* Messung wurde mit einer unbegleiteten Kapillare von 20 μm Innendurchmesser und 75 cm Länge bei 400 V/cm Feldstärke durchgeführt. Das *sheath liquid* für die *online* Messung war identisch mit dem Elektrolyten und wurde mit einer Flussrate von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugeführt. Nicht in der Abbildung gezeigt sind *online* Experimente mit einer Kapillare von 50 μm Innendurchmesser bei ansonsten gleichen Bedingungen zur den *online* Messungen mit der 20 μm ID¹ Kapillare. Lediglich die injizierten Probenmengen waren höher, es waren etwa 8 pmol Cytidin, 4 pmol Guanosin und jeweils 1,5 pmol CMP und GMP.

Die Experimente *online* und *offline* wurden jeweils zwischen drei- und fünfmal durchgeführt. Eine Auflistung der dabei erhalten Signalbreiten, gemessen bei der Hälfte der Signalthöhe, gibt die folgende Tabelle. Bei den *offline* Messungen wurden die Signalbreiten der Signale bei der Absorption bei 280 nm Wellenlänge ausgewertet.

Tabelle 5.2: Vergleich der Signalbreiten *offline* und *online*

Signal	Signalbreite in [s], Messung		
	<i>offline</i> 50 μm	<i>online</i> 50 μm	<i>online</i> 20 μm
Cytidin	5,00 \pm 0,58	20,75 \pm 2,17	13,25 \pm 0,63
Guanosin	6,00 \pm 0,58	20,50 \pm 3,80	11,50 \pm 0,29
CMP	9,00 \pm 0,58	21,50 \pm 3,75	12,75 \pm 0,25
GMP	11,67 \pm 1,86	19,00 \pm 2,35	13,75 \pm 0,25

Es ist besonders im Vergleich der Messungen mit der 50 μm ID Kapillare *online* und *offline* auffällig, dass die Signalbreite deutlich zunimmt, im Schnitt etwa um den Faktor Drei. Eine solche Signalverbreiterung wurde bei allen Messungen beobachtet. Die breiten Signale stehen also offensichtlich in einem Zusammenhang mit den *offline* Messungen. Es scheint sich nicht um Adsorptionseffekte an der Kapillarwand zu handeln, denn dann hätte die Signalverbreiterung auch *offline* auftreten müssen. Auch ist eine weitere Auftrennung der Substanzen auszuschließen, auch diese hätte *offline* ebenso auftreten müssen. Die hier gemachten Versuche haben zwar nur bedingt Aussagekraft für Experimente mit anderen Proben, Adsorptionseffekte und auch eine Antrennung unbekannter Bestandteile können nach wie vor Gründe sein. Die Experimente sind jedoch ein starker Hinweis, dass andere Gründe

¹ID ist die Abkürzung für Innendurchmesser. Sie wird häufig im Folgenden verwendet werden

für den beobachteten Effekt vorhanden sein könnten.

Es wurde weiterhin ein Experiment durchgeführt, um den Faktor Erwärmung der Kapillare zu betrachten. Zwar war der Stromfluss und somit auch die elektrische Leistung in den Kapillaren bei allen Experimenten so niedrig, dass nicht von Temperatureffekten auszugehen ist, aber diese Möglichkeit sollte trotzdem geprüft werden. Die zugehörigen Experimente wurden *offline* durchgeführt, da die CE-Anlage der Firma Beckman in der Lage ist, die Kapillare zu temperieren. Es wurden daher Messungen an einem Peptidstandard bei 15°C, 25°C, 35°C, 45°C und 55°C vorgenommen². Die Messungen wurden mit einer 30 cm langen Kapillare von 50 µm ID bei einer Feldstärke von 667 V/cm gemacht. Der Elektrolyt war wiederum das Essigsäure-Wassergemisch (3/17, nach Volumen). Das Peptidgemisch, bestehend aus dem Dipeptid Glycin-Tyrosin (GY), dem Tripeptid Valin-Tyrosin-Valin (VYV), und den Peptiden Leucin-Enkephalin (YGGFL), Methionin-Enkephalin (YGGF M) sowie Angiotensin II (NRVYIHPF), wurde in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser aufgenommen. Injiziert wurde für 5 s bei 50 mbar, was etwa 2,5 pmol Probe ergibt. Die Signalbreite wurde für die Signale bei Absorption bei 192 nm Wellenlänge ermittelt. Bei den gewählten Versuchsbedingungen lassen sich Leucin-Enkephalin und Methionin-Enkephalin nicht trennen. Die Signalzuordnung erfolgte mittels eines CE-MS-Experimentes, dort konnte, ebenfalls in einem Elektrolyten aus Essigsäure und Wasser (1/19, nach Volumen), die vollständige Trennung erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Für die Aussage dieses Experimentes zur gegebenen Fragestellung ist eine Trennung jedoch nicht nötig. Die lediglich vorhandene Antrennung zeigt sich in der Tabelle durch die Breite des letzten Signals. Die Peptide sind in der Tabelle in der Reihenfolge ihrer Migration angegeben.

Tabelle 5.3: Vergleich der Signalbreiten bei unterschiedlichen Kapillartemperaturen

Signal	Signalbreite in [s] bei		
	15°C	35°C	55°C
NRVYIHPF	5,67 ± 0,67	4,67 ± 0,33	4,67 ± 0,33
GY	5,67 ± 0,67	4,67 ± 0,67	4,67 ± 0,33
VYV	7,33 ± 1,33	4,33 ± 0,33	3,67 ± 0,33
YGGF(L/M)	9,00 ± 8,00	8,00 ± 2,35	6,00 ± 0,67

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bis zu einer Temperatur von 55°C keine Verbreiterung der Signale festzustellen ist. Der gemessene Strom-

²Gezeigt werden hier jedoch nicht alle Messungen, sondern repräsentativ diejenigen bei 15°C, 35°C und 55°C.

fluss nahm bei den Experimenten kontinuierlich zu, von 30,5 μA bei den Messungen bei 15°C bis hin zu 45 μA bei den Messungen bei 55°C. Ebenso nahm die Migrationszeit der Signale ab. Dies ist durch die Verringerung der Viskosität des Elektrolyten durch die Erwärmung zu erklären.

Es bestand nicht die Möglichkeit, die Kapillartemperatur sowohl bei dem Eigenbau als auch bei der Anlage der Firma Beckman direkt zu messen. Der geringe Durchmesser der Kapillare verhindert eine Messung der Temperatur mit im Labor vorhandenen Mitteln. Durch Anfassen der Kapillare während der Experimente konnte keine Erwärmung gefühlt werden. Ausgehend davon, dass eine Erwärmung auf mehr als 55°C zu fühlen sein müsste und dass bis 55°C keine Signalverbreiterung im Experiment zu sehen ist, kann geschlossen werden, dass auch eine Joule'sche Erwärmung vermutlich nicht Grund für die Verbreiterung der Signale sein kann. Eine Betrachtung der elektrischen Leistung führt auf denselben Schluss. Bei den Experimenten mit den Peptiden wurde maximal 0,9 W Leistung aufgenommen, dieser Wert ist bereits weit höher als bei irgendwelchen anderen durchgeführten Experimenten. Trotzdem war hier keine Signalverbreiterung feststellbar. Zum Vergleich dazu lag die elektrische Leistung bei sämtlichen Trennungen von Lipopolysacchariden, Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden bei unter 25 mW.

Eine eventuelle Antrennung von Stoffen sollte durch die Experimente mit den erworbenen und massenspektrometrisch als rein zu betrachtenden Proben (Nukleoside, Nukleotide und Peptide) zumindest in diesem Falle als widerlegt gelten. Es bleibt als Erklärung ein irgendwie gearteter Zusammenhang mit der axialen Kopplung. Obgleich eine direkte Kopplung aufgebaut werden konnte, wurden mit keiner der getesteten direkten Kopplungsvarianten reproduzierbare Bedingungen geschaffen, bei der der Elektrospray über mehr als fünfzehn Minuten stabil blieb (Daten nicht gezeigt).

5.2 Trennung amphiphiler Membranmoleküle

Die Ergebnisse zur *online* CE-MS-Trennung amphiphiler Membranmoleküle werden im Folgenden dargestellt. Der Fokus lag dabei auf der Etablierung einer Methode zur Auftrennung von Lipopolysacchariden. Zu Beginn wird die Suche nach geeigneten Elektrolyten beschrieben. Hiernach werden die Möglichkeiten zur Auftrennung anhand von Probenbeispielen für ein Lipid A, eine Tiefraummutante und eine längerkettige Raumutante gezeigt. Ebenso wurde eine Mischung aus solchen Proben aufgetrennt, um zu zeigen, dass sich hier kein unerwartet anderes Verhalten im Vergleich zu den Einzelproben zeigt. Schließlich wurde das als funktionierend gefundene System auch an Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden getestet. Die Tests fanden bewusst

mit nicht für diese Substanzen optimierten Elektrolyten statt um zu testen, ob unter den gefundenen Bedingungen diese von den Lipopolysacchariden zumindest abgetrennt werden können.

5.2.1 Lipopolysaccharide

Ein für die CE-MS-Trennung der Lipopolysaccharide nutzbarer Elektrolyt muss drei Bedingungen erfüllen. Die Trennung muss gegeben sein, der Analyt sollte selbstverständlich gut darin lösbar sein und er sollte mit hoher Sensitivität darin massenspektrometrisch nachweisbar sein, also als potente Spraylösung fungieren können. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn auch eine Kopplung über einen direkten Anschluss möglich sein soll. In der Kapillarelektrophorese gängig sind Elektrolyte auf Wasserbasis mit hohen Ionenstärken und möglicherweise auch Detergenzien als Zusatz. Hohe Ionenstärken und Detergenzien müssen von vornherein ausgeschlossen werden, da solche Flüssigkeiten nicht in der ESI-Quelle nutzbar sind. Ebenso sind Elektrolyte rein auf Wasserbasis auszuschließen, da sich die amphiphilen Moleküle umso schlechter darin lösen lassen, je größer ihr hydrophober Anteil im Molekül wird. Bei der Suche nach geeigneten Elektrolyten wurde daher zuerst nach Spraylösungen gesucht, in denen sich die Probe sowohl aufnehmen als auch sensitiv nachweisen lassen musste. Hierbei wurden beschriebene Elektrolyte für *de-O*-acylierte Lipopolysaccharide getestet, bekannte Spraylösungen für die stark hydrophoben Phospholipide und funktionierende Spraylösungen für LPS. Ebenso wurden diverse Modifikationen an beschriebenen Elektrolyten und Spraylösungen durchgeführt und getestet.

Für die Eignungstests als Spraylösung wurde das Re-LPS F515 verwendet. Die Probe lag in einer Konzentration von 0,2 mM in 10 µl Wasser vor und wurde jeweils in 300 µl der zu testenden Spraylösung aufgenommen. Dann wurde diese mit 2 µl/min der ESI-Quelle zugeführt und unter immer gleichen Messbedingungen gemessen. Für jede Spraylösung wurde die Messung mindestens fünfmal wiederholt. Der Vergleich der Spraylösungen erfolgte dann über die mittleren Signalintensitäten der drei Hauptsignale der Probe. In der folgenden Tabelle sind einige der getesteten Spraylösungen aufgeführt. Die Auswahl spiegelt in etwa das Verhalten der Spraylösungen und Elektrolyte wieder. Die auf einer Ammoniumacetatlösung basierenden Elektrolyte, die in der Literatur für die *de-O*-acylierten Lipopolysaccharide beschrieben sind, sind nicht mit aufgeführt. Sie erwiesen sich unabhängig vom pH-Wert bei den beschriebenen Ionenstärken als nicht als Spraylösung nutzbar. Akzeptable Sensitivität konnte erst bei deutlich herabgesetzten Konzentrationen an Ammoniumacetat, vorzugsweise unter 5mM, erzielt werden (Daten nicht gezeigt). In der Tabelle sind jeweils die Intensitäten des monoisotopischen

Signals des zweifach negativ geladenen Ions des hexa-, penta- und tetraacylierten Re-LPS angegeben. Diese erscheinen in den Massenspektren etwa bei m/z 899,465, m/z 1012,560 und m/z 1117,658. Diese Signale sind in der Tabelle mit Re-LPS 4, Re-LPS 5 und Re-LPS 6 abgekürzt.

Tabelle 5.4: Vergleich der Nachweisempfindlichkeit verschiedener Spraylösungen für Re-LPS F515

Spraylösung	Signalintensität [Abs. Int. $\times 10^6$]		
	Re-LPS 6	Re-LPS 5	Re-LPS 4
Isopropanol, Wasser, Triethylamin, Essigsäure (2500/2500/3/1, nach Volumen)	$3,08 \pm 0,19$	$2,51 \pm 0,20$	$5,50 \pm 0,58$
Chloroform, Methanol, Ammoniumhydroxid 32%-ig (50/49/1, nach Volumen)	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,01$
Chloroform, Methanol, Ammoniumhydroxid 32%-ig (86/13/1, nach Volumen)	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
Chloroform, Methanol, Ammoniumhydroxid 32%-ig (150/147/13, nach Volumen)	$0,27 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,00$	$0,29 \pm 0,02$
Chloroform, Methanol, Ammoniumhydroxid 32%-ig, 30 mM Ammoniumacetat pH 9 (150/147/13/30, nach Volumen)	$0,13 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$
Chloroform, Methanol, Ammoniumhydroxid 32%-ig, 50 mM Ammoniumacetat pH 10 (150/147/13/30, nach Volumen)	$0,26 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	$0,27 \pm 0,00$
Isopropanol, Wasser, Methanol, Triethylamin, Essigsäure (5833/2500/1667/3/1, nach Volumen)	$3,10 \pm 0,14$	$3,15 \pm 0,18$	$7,91 \pm 0,79$
Isopropanol, Methanol, 30 mM Ammoniumacetat pH 9 (4/2/1, nach Volumen)	$0,12 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,04$

Als Ergebnis dieser und weiterer Messungen kann festgehalten werden, dass ein gewisser Wasseranteil nötig ist, Chloroform und hoch ionische Ammoniumacetatlösungen dagegen nicht nützlich sind. Die ersten *online* CE-

MS-Versuche wurden folglich mit Elektrolyten basierend auf Isopropanol und Wasser durchgeführt, trotz der schlechten elektrischen Leitfähigkeit solcher Elektrolyte.

Die Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines CE-MS-Experimentes mit einem Elektrolyten aus Isopropanol, Wasser, Triethylamin und Essigsäure (2500/2500/3/1, nach Volumen) mit pH 8,9. Diese Lösung wurde ebenso als *sheath liquid* verwendet, bei einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Messung wurde mit der Anlage der Firma Beckman mit einer 80 cm langen, unbelegten Kapillare mit 50 μm ID durchgeführt. Die angelegte Feldstärke betrug 375 V/cm, injiziert wurden etwa 220 fm Re-LPS F515. Dieses wurde ebenfalls in dem Elektrolyten aufgenommen.

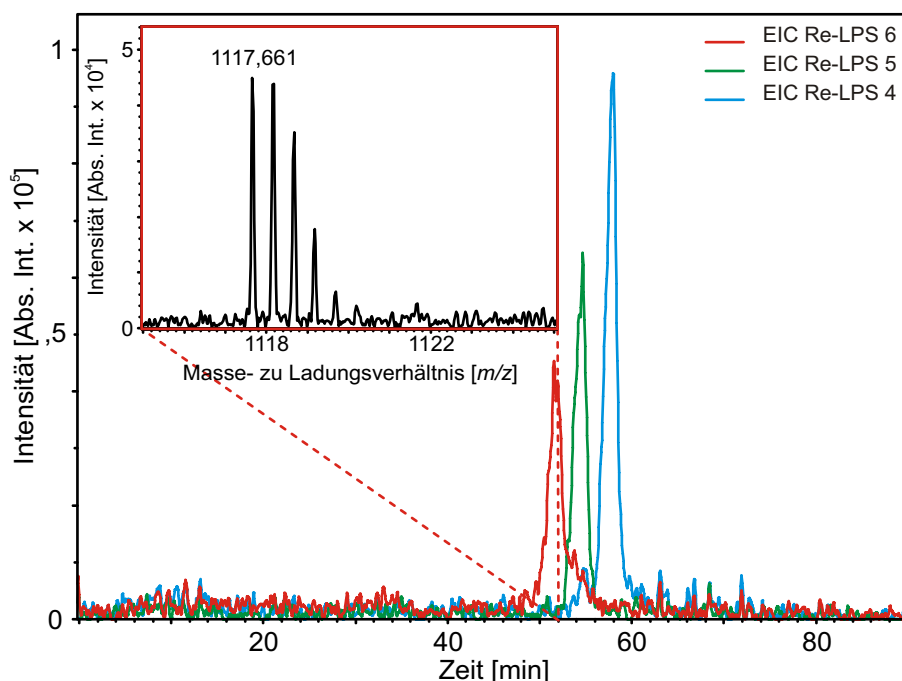


Abbildung 5.5: Die Abbildung zeigt extrahierte Ionenströme (EIC) der monoisotopischen Signale von drei in dem Experiment aufgetrennten und nachgewiesenen Re-LPS-Spezies. Der Ausschnitt zeigt beispielhaft ein einzelnes extrahiertes Massenspektrum aus dem Lauf für das hexaacylierte Re-LPS.

Die Probe wurde deutlich nach Anzahl der Fettsäureketten aufgetrennt. Ausgehend von diesem Ergebnis stellen sich zwei Fragen. Würde auch ein länger-kettiges LPS oder ein Lipid A in dieser Form aufgetrennt werden können? Und würden die Migrationszeiten sich deutlich genug unterscheiden, so dass auch eine Mischung verschiedener Raummutanten-LPS sowohl nach Länge des Oligosaccharidteils als auch nach Anzahl der Fettsäuren aufgetrennt

werden würde? Neben der Beantwortung dieser Fragen, die später in Ergebnisteil folgen wird, sind zwei Dinge an diesem Spektrum anzumerken. Die Migrationszeiten sind sehr lang. Die Kapillarelektrophorese gilt als schnelles Trennverfahren, die hier auftretenden Migrationszeiten liegen aber im Bereich von LC-MS-Experimenten. Die Signale sind sehr breit. Dies wurde beim Abschnitt über den Aufbau und die Kopplung bereits angesprochen. Die Erklärung für diese breiten Signale fehlt jedoch.

Um die Migrationszeit zu verkürzen wurde versucht, mit zusätzlich zur Hochspannung angelegtem Druck zu arbeiten. Die dadurch entstehende laminare Rohrströmung könnte jedoch zu einer weiteren Signalverbreiterung führen. Die Experimente wurden mit der Anlage der Firma Beckman durchgeführt. Verwendet wurde eine 80 cm lange Kapillare mit 50 μm ID. Die Probe wurde jeweils in 0,1 mM Konzentration im Elektrolyten aufgenommen und für 5 s bei 50 mbar Überdruck injiziert. Das entspricht bei der Kapillare etwa 200 fmol injizierter Substanz. Die Messungen wurden bei 30 kV und angelegtem Druck von 100 mbar, 150 mbar und 200 mbar durchgeführt.

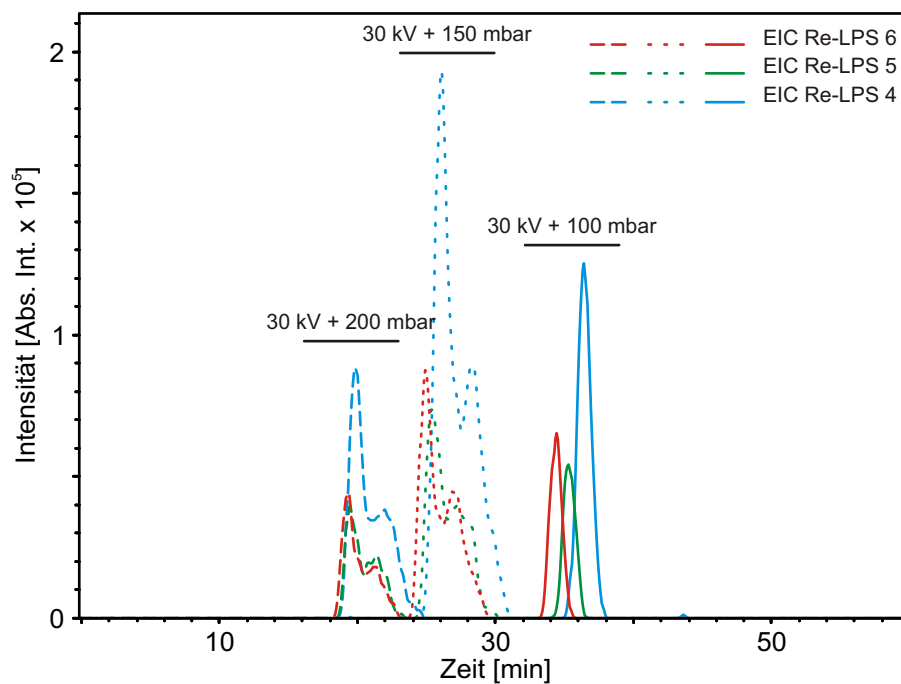


Abbildung 5.6: Die Abbildung zeigt die EIC von drei Experimenten bei 30 kV Hochspannung und unterschiedlichen zur Beschleunigung der Messungen angelegten zusätzlichen Drücken. Die Trennung der Substanzen geht bereits bei geringem Zusatzdruck verloren.

Abbildung 5.6 zeigt die extrahierten EIC der drei Hauptkomponenten der Probe, überlagert in einem Spektrum. Die unterschiedlichen Läufe werden hierbei durch unterschiedliche Art der Linien dargestellt. Die Proben migrieren erheblich schneller als in Abbildung 5.5. Es ist allerdings deutlich zu sehen, dass bereits bei einem zusätzlich angelegten Druck von 100 mbar die Trennung verloren geht. Das Anlegen eines zusätzlichen Druckes kann also nicht zur Verringerung der Migrationszeiten genutzt werden. Es bleibt als Möglichkeit zur Beeinflussung der Migrationszeiten die Veränderung des Elektrolyten. Es wurde, ausgehend von dem funktionierenden gefundenen Elektrolyten, dieser in seinem pH-Wert verändert. Dies wurde durch eine leichte Erhöhung des Anteils an Essigsäure erreicht. Eine weitere Veränderung in den basischen pH-Bereich kann nicht vorgenommen werden, da in diesem Fall im Elektrolyten die Ester-gebundenen Fettsäuren abgespalten würden. Da die im Verhältnis zugegebenen Mengen an Essigsäure deren Anteil im Vergleich zum Ausgangs-Elektrolyten kaum verändern, ist in der folgenden Tabelle ein gleichbleibender Anteil an Essigsäure angegeben.

Tabelle 5.5: Vergleich der Nachweisempfindlichkeit verschiedener Spraylösungen für Re-LPS F515

Elektrolyt und Abkürzung	Signalintensität [Abs. Int. x 10 ⁶]		
	Re-LPS 6	Re-LPS 5	Re-LPS 4
Isopropanol, Wasser, Triethylamin, Essigsäure (2500/2500/3/1, nach Volumen), pH 8,9, LPS89	3,08±0,19	2,51±0,20	5,50±0,58
Isopropanol, Wasser, Triethylamin, Essigsäure (2500/2500/3/1, nach Volumen), pH 7,3, LPS73	3,52±0,24	2,64±0,09	6,23±0,10
Isopropanol, Wasser, Triethylamin, Essigsäure (2500/2500/3/1, nach Volumen), pH 6,5, LPS65	3,62±0,08	2,83±0,07	6,46±0,11
Isopropanol, Wasser, 30 mM Ammoniumacetat, Essigsäure, (375/375/25/1, nach Volumen), pH 4,2, LPS42	-	-	-

Die pH-Werte wurden mit Hilfe eines pH-Meters ermittelt. Die Tabelle gibt eine Übersicht über eine Reihe weiterer auf Isopropanol und Wasser

basierender Elektrolyte, die in der Arbeit Verwendung fanden. Zusätzlich werden Abkürzungen für diese Elektrolyte eingeführt, die ab hier verwendet werden. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Elektrolyte wurden anhand derselben Art Experimente wie für alle anderen Spraylösungen und Elektrolyte getestet. Die Nachweisempfindlichkeiten sind demnach ähnlich gut geblieben, die Unterschiede sind nicht bedeutend. Der erste gefundene Elektrolyt LPS89 wurde auch mit Lipid A getestet. Die Messungen wurden mit dem Eigenbau durchgeführt, wie auch alle folgenden gezeigten Messungen. Für das LPS42 wurden keine Testmessungen durchgeführt. Es wurde nur probeweise für ein einzelnes Experiment zur Auftrennung eines LPS-Gemisches verwendet. Die verwendete Kapillare war eine 45 cm lange, unbelegte Kapillare mit 50 μm ID. LPS89 wurde sowohl als Elektrolyt, als auch als *sheath liquid* und zum Aufnehmen der Probe verwendet. Von der Probe wurden durch Anlegen von 50 mbar Überdruck für 5 s etwa 500 fmol in die Kapillare injiziert. Das *sheath liquid* wurde mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugeführt. Die angelegte Hochspannung betrug 25 kV, die Feldstärke somit 556 V/cm.

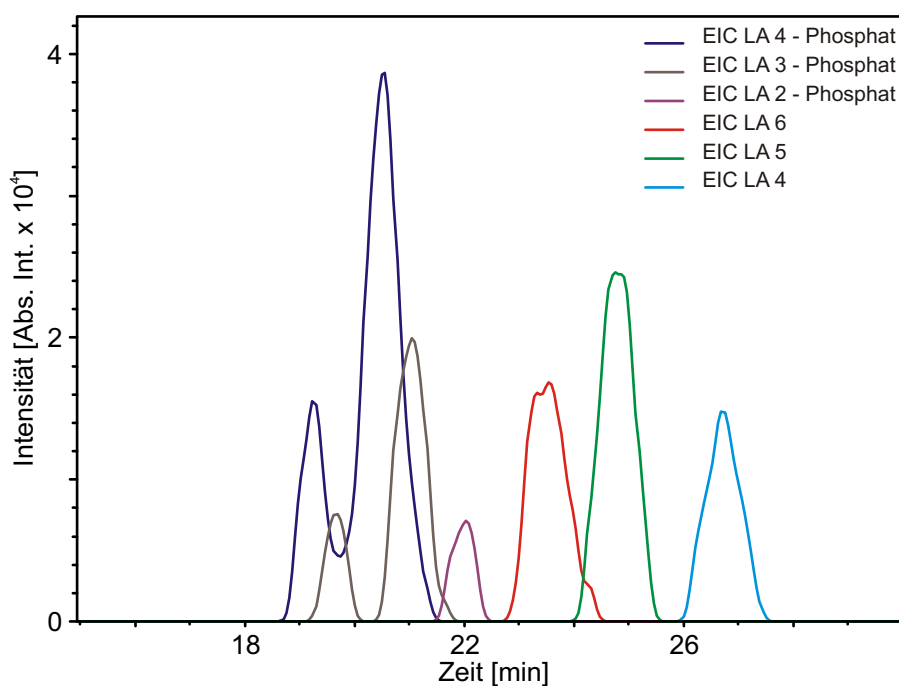


Abbildung 5.7: Das Lipid A der Probe wird nach Anzahl der Fettsäureketten aufgetrennt. Zusätzlich gab es eine Abtrennung einiger Spezies, die eine Phosphatgruppe weniger tragen. Die Doppelsignale des tetra- und triacylierten Lipid A, welche jeweils eine Phosphatgruppe weniger haben, deuten auf jeweils zwei massenisomere Spezies hin.

Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Das Spektrum zeigt sowohl die Auftrennung des hexa-, penta- und tetraacylierten Lipid A (LA 6, LA 5 und LA 4), als auch die Abtrennung weiterer Spezies. Dies sind jeweils tetra-, tri- und diacyliertes Lipid A, welches eine Phosphatgruppe weniger trägt als das vollständige Lipid A. Die auftretenden Doppelsignale bei zwei dieser Spezies deuten auf jeweils zwei massenisomere Spezies hin. Da aufgrund der geringen Signalintensitäten keine MS/MS-Experimente während des CE-MS-Laufs möglich waren, bleibt dies Spekulation.

Abschließende Versuche mit dem Elektrolyten LPS89 wurden mit einer langkettigen Tiefraummutante vorgenommen. Hiermit soll gezeigt werden, dass der Elektrolyt auch in diesem Fall geeignet ist. Die Experimente wurden wiederum am Eigenbau mit einer 45 cm langen Kapillare mit 50 μm ID bei einer Feldstärke von 556 V/cm durchgeführt. Die Probe wurde in einer Konzentration von 0,1 mM in LPS89 aufgenommen, das *sheath liquid* war in diesem Fall LPS73.

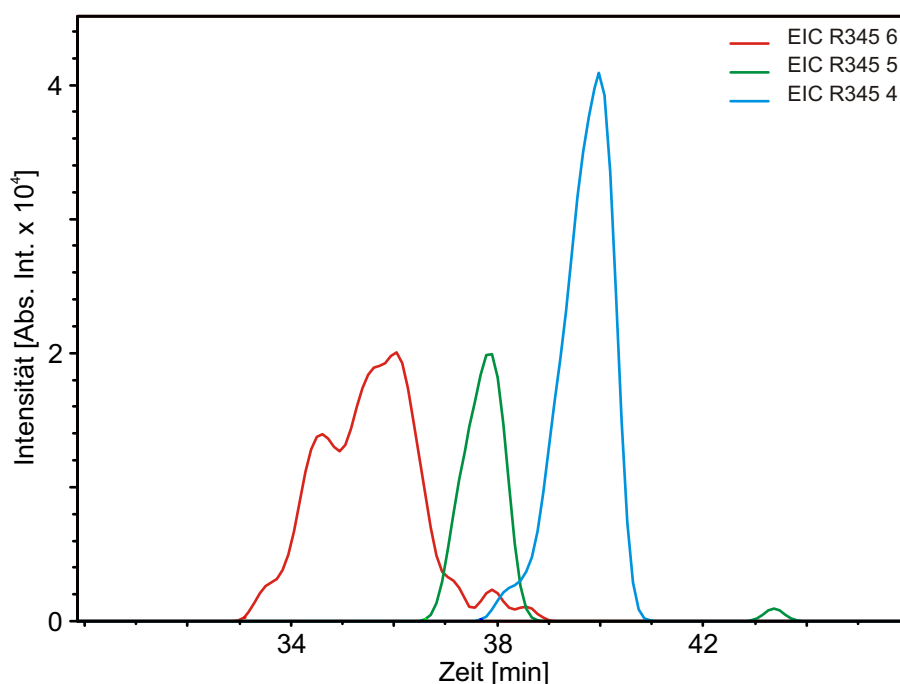


Abbildung 5.8: Das LPS R345 der Probe wird ebenso wie die Proben des Re-LPS F515 und des Lipid A nach Anzahl der Fettsäureketten aufgetrennt. Auch hier hat wieder das Molekül mit dem höchsten Molekulargewicht die kürzeste Migrationszeit, das kleinste Molekül die längste.

Den einzelnen Spezies des LPS R345 wurden Abkürzungen gegeben, wie auch bereits beim Lipid A und beim Re-LPS F515. Hexa-, penta- und tetraa-

cyliertes LPS R345 werden als R345 6, R345 5 und R345 4 abgekürzt. Die Auftrennung im CE-MS-Experiment erfolgt wieder nach Anzahl der Fettsäuren im Molekül. Die Migrationszeit ist deutlich länger als beim Lipid A. Auch ist sie anders als beim Re-LPS F515³. Daher sollten sich diese Bestandteile auch in einer Mischung auftrennen lassen. Dies ist bisher, ebenso wie die CE-MS-Trennung von einem Lipid A und von R-Form LPS, in der Literatur noch nicht gezeigt worden. Die Messungen am LPS R345 waren in ähnlicher Weise reproduzierbar wie beispielsweise die des Re-LPS F515. Die folgende Tabelle gibt die aus drei Läufen gemittelten Migrationszeiten und Signalintensitäten an. Die Intensitäten wurden dabei über die Fläche unter dem jeweiligen Signal bestimmt und werden relativ zum stärksten Signal angegeben.

Tabelle 5.6: Mittlere Migrationszeiten und relative Signalintensitäten von LPS R345 in LPS89

Signal	Migrationszeit in [min]	rel. Signalintensität
R345 4	43, 81 ± 1, 70	100, 00 ± 0, 00
R345 5	41, 70 ± 1, 20	34, 39 ± 3, 54
R345 6	40, 10 ± 1, 00	63, 33 ± 7, 14

Nachdem die Trennung einzelner, ausgewählter LPS Spezies gezeigt wurde, soll im Anschluss gezeigt werden, dass sich diese Substanzen auch aus einer Mischung heraus mit dem etablierten System trennen lassen. Durch die Veränderung der Probenbande kann die Laufzeit der einzelnen Komponenten verändert werden. Das Verhalten hierbei ist in der Regel nicht ohne Weiteres vorhersehbar.

Für die folgenden Versuche wurde eine Mischung aus Lipid A, Re-LPS F515 und LPS R345 hergestellt. Dazu wurden die Proben in LPS89 aufgenommen. Die Konzentrationen der Proben betragen 0,1 mM beim LPS F515, 0,15 mM beim Lipid A und 0,3 mM beim LPS R345. Die Messungen wurden am Eigenbau mit einer 45 cm langen, unbelegten Kapillare von 50 µm ID gemacht. Das *sheath liquid* war LPS73, zugeführt 2 µl/min. Der Lauf wurde bei 25 kV durchgeführt. Abbildung 5.9 zeigt die extrahierten EIC der Hauptbestandteile des LPS-Gemisches.

Das Experiment zeigt auch für die Mischung eine fast vollständige Auftrennung der einzelnen Hauptbestandteile. Die Signale überlagern sich aber teilweise, so dass für das tetraacylierte Re-LPS und das Lipid A Pendant keine Trennung zu sehen ist. Die Migrationszeiten unterscheiden sich überraschend

³Die Abbildung 5.2 zeigt unter gleichen Bedingungen getrenntes Re-LPS F515

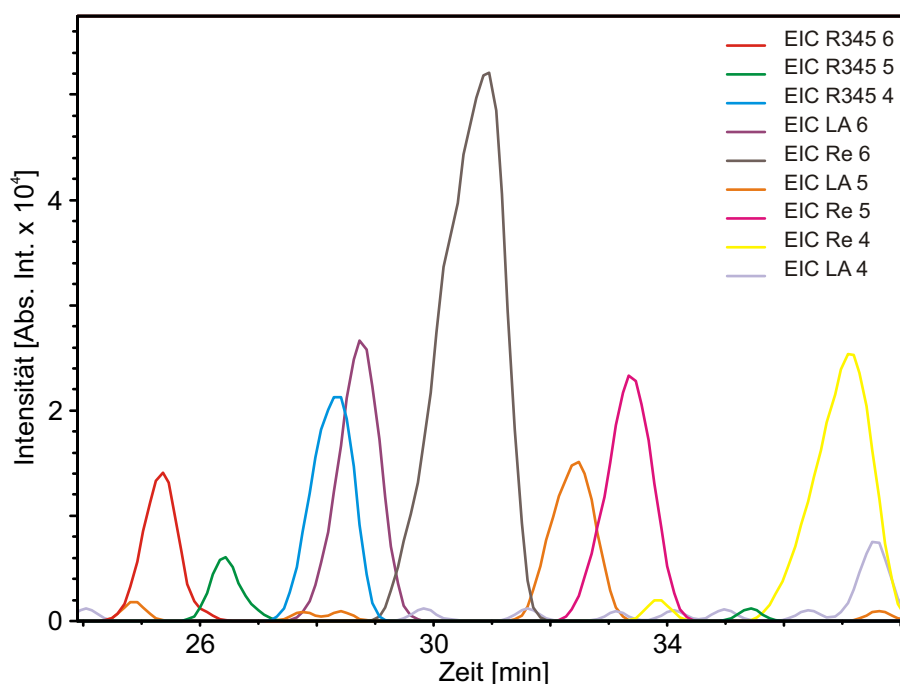


Abbildung 5.9: Die Abbildung zeigt die Auftrennung einer Mischung von Lipid A, LPS F515 und LPS R345. Die Bestandteile lassen sich fast alle voneinander trennen, jedoch sind die Migrationszeiten deutlich anders im Vergleich zu den einzelnen Experimenten zu Lipid A, LPS F515 und LPS R345.

deutlich von denen aus den Versuchen mit den einzelnen Proben. Die Messungen waren jedoch gut reproduzierbar. Um eventuell eine Verbesserung der Trennung zu erreichen, wurden die Messungen in genau derselben Art mit anderen Elektrolyten durchgeführt. Hierbei wurden LPS73, LPS65 und LPS42 als Elektrolyte genommen. Im Gegensatz zu den Messungen mit LPS89, bei denen die angegebenen Migrationszeiten aus drei Läufen gemittelt wurden, wird bei den anderen Elektrolyten nur die Migrationszeit eines Experimentes als beispielhafter Vergleich gezeigt.

Tabelle 5.7: Vergleich der Migrationszeiten des LPS-Gemisches für verschiedene Elektrolyte

Signal	Migrationszeit in [min]			
	LPS89	LPS73	LPS65	LPS42
R345 4	28,12 ± 0,24	31,47	24,33	21,67
R345 5	26,13 ± 0,28	29,96	23,78	21,12

R345 6	$25,11 \pm 0,23$	29,08	22,91	19,53
Re-LPS 4	$36,51 \pm 0,43$	42,2	30,71	24,56
Re-LPS 5	$32,88 \pm 0,36$	38,57	28,96	23,23
Re-LPS 6	$30,45 \pm 0,41$	34,87	26,32	18,51
LA 4	$36,89 \pm 0,48$	32,46	23,23	20,69
LA 5	$31,59 \pm 0,71$	27,98	22,15	19,53
LA 6	$28,07 \pm 0,56$	26,25	21,72	19,42

Eine Ansäuerung des Elektrolyten führt zu kürzeren Migrationszeiten. Eine Trennung ist lediglich noch bei LPS73 zu sehen, bei den beiden anderen Elektrolyten gehen die Signale fast ausschließlich ineinander über. Die durchgeführten Experimente zur Auftrennung der LPS-Mischung zeigten gute Ergebnisse für die bisher nahezu ausschließlich betrachteten Hauptbestandteile der einzelnen Proben. Eine vollständige Auswertung aller in dem CE-MS-Experiment zu findenden Signale zeigt jedoch, dass das entwickelte System zur *online* CE-MS-Trennung von Lipopolysacchariden zu weiterer Auftrennung in den Proben führt.

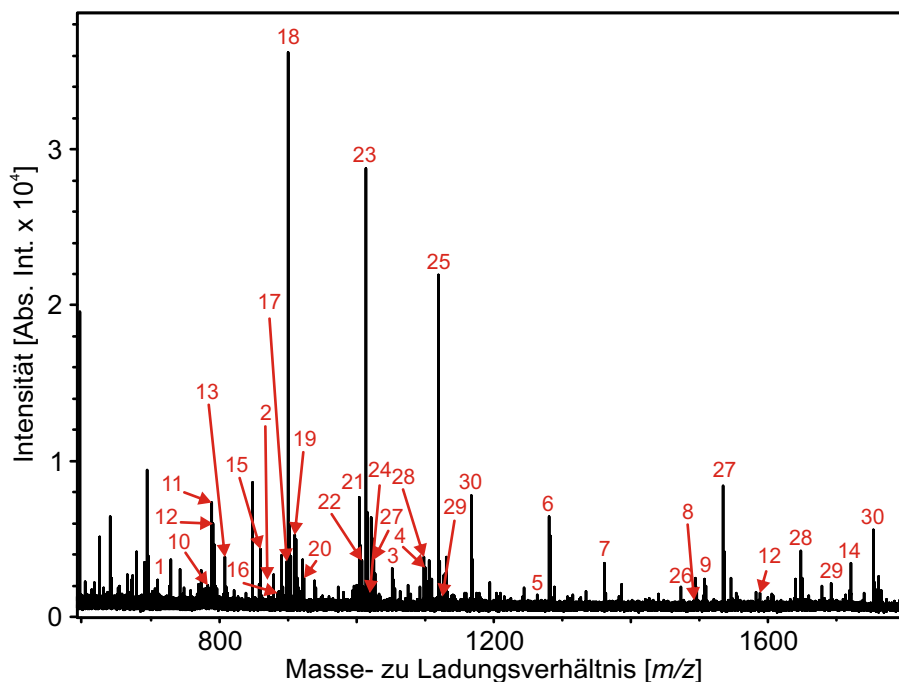


Abbildung 5.10: Das Spektrum der LPS-Mischung, aufgenommen aus einer Injektion und folgendem Drucklauf. Einige Signale, die in dem CE-MS-Experiment zu finden waren, sind hier kaum auszumachen. Sie scheinen bei der Ionisation in der Quelle unterdrückt zu werden.

Zum Abschluss dieses Abschnitts wird daher ein vollständig ausgewertetes CE-MS-Experiment eines LPS-Gemisches gezeigt. Die experimentellen Bedingungen entsprachen denen der bisher zum LPS-Gemisch gezeigten Versuche, der Elektrolyt war LPS89. Zur Übersicht wird zuerst ein normales Spektrum des LPS-Gemisches gezeigt (siehe Abbildung 5.10). Dieses wurde nicht *offline* gemessen, sondern ist ein Spektrum aus einer CE-MS-Kopplung. Es wurde aber keine Hochspannung angelegt, sondern lediglich eine injizierte Bande mit 100 mbar Druck durch die Kapillare geleitet. Dieses Experiment simuliert daher in Etwa die Nachweisempfindlichkeit bei einem richtigen CE-MS-Experiment dadurch, dass ebenso mit einer Kopplung und *sheath liquid* gearbeitet wurde.

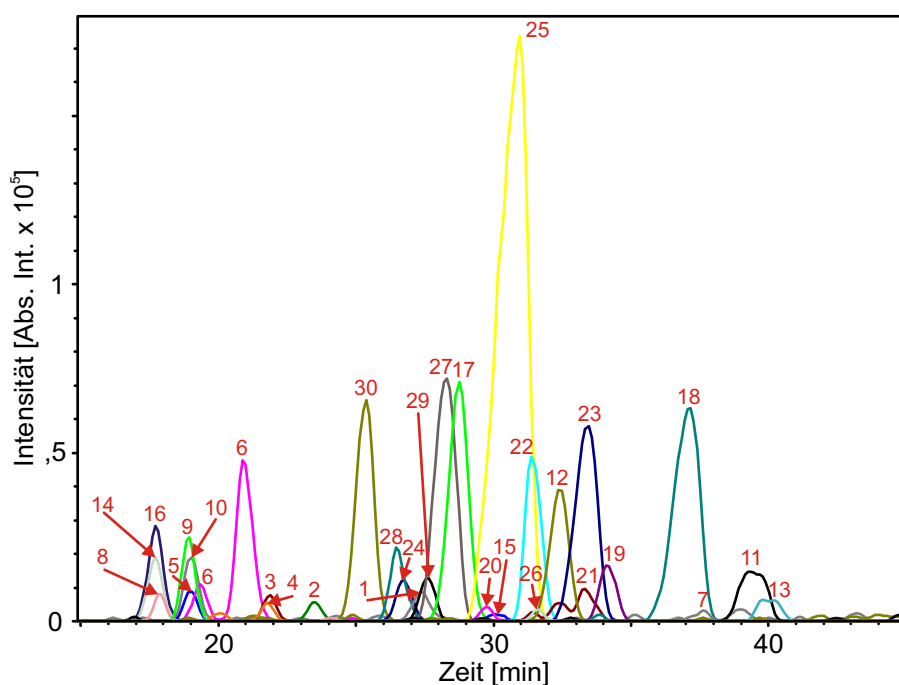


Abbildung 5.11: Im CE-MS-Experiment sind die Intensitäten der Signale zum Teil deutlich anders als im *offline* Experiment. Dies ist auf die unterschiedliche Ionisationseffizienz der Moleküle bei gleichzeitigem Eintritt in die Ionenquelle zurück zu führen. Die Abbildung zeigt auch, dass viele, wenn auch nicht alle vorkommenden Spezies getrennt werden können.

Es soll für den Vergleich mit der *online* Messung als *offline* Spektrum bezeichnet werden. In diesem sind all diejenigen Signale mit Nummern markiert, die auch in dem in Abbildung 5.11 gezeigten CE-MS-Experiment nachgewiesen wurden. Die Nummerierung wird für das *online* Spektrum übernommen. Eine dahinter angefügte Tabelle ermöglicht die Zuordnung der Nummern zu

den einzelnen LPS-Spezies. Es konnten nicht alle der gefundenen Signale identifiziert werden. Einige der Signale, die in der Folge im CE-MS-Experiment gefunden wurden, waren hier im *offline* Experiment fast nicht zu sehen. Sie wurden also in der Ionenquelle durch die Anwesenheit der anderen Moleküle unterdrückt und waren beim Ionisationsprozess benachteiligt.

Tabelle 5.8: Zuordnung der Signale aus dem komplett ausgewerteten MS- und CE-MS-Experiment des LPS-Gemisches zu LPS-Spezies

Nummer	LPS-Spezies
1	nicht identifiziert
2	Diacyl-Lipid A - Phosphat
3	nicht identifiziert
4	Triacyl-Lipid A - Phosphat
5	nicht identifiziert
6	Tetraacyl-Lipid A - Phosphat
7	Tetraacyl-Lipid A
8	nicht identifiziert
9	Pentaacyl-Lipid A - Phosphat
10	nicht identifiziert
11	Tetraacyl-LPS F515 - Kdo
12	Pentaacyl-Lipid A
13	nicht identifiziert
14	Hexaacyl-Lipid A - Phosphat
15	nicht identifiziert
16	nicht identifiziert
17	Hexaacyl-Lipid A
18	Tetraacyl-LPS F515
19	Pentaacyl-LPS F515 - Kdo
20	nicht identifiziert
21	nicht identifiziert
22	Hexaacyl-LPS F515 - Kdo
23	Pentaacyl-LPS F515
24	nicht identifiziert
25	Hexaacyl-LPS F515
26	Tetraacyl-LPS R345 - Phosphoethanolamin
27	Tetraacyl-LPS R345
28	Pentaacyl-LPS R345
29	Hexaacyl-LPS R345 - Phosphoethanolamin
30	Hexaacyl-LPS R345

Aus diesem Experiment ist ersichtlich, dass ein großer Bereich der Moleküle getrennt werden kann. Diese Trennung führt dazu, dass einige davon besser nachgewiesen werden. Dies hebt die Bedeutung einer CE-MS-Trennung hervor. Auch ist in eine *online* CE-MS-Trennung vom Lipopolysacchariden in dieser Form noch nicht gezeigt worden.

5.2.2 Glycerophospholipide und Glykosphingolipide

Nachdem die Möglichkeit zur *online* CE-MS-Trennung von Lipopolysacchariden etabliert und in der Arbeit dargestellt wurde, sollen nun die Ergebnisse zu den Tests des gezeigten Systems an Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden gezeigt werden. Der Versuch einer Auftrennung solcher Moleküle mit diesem System ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Die Ähnlichkeit im Aufbau vor allem der Glykosphingolipide legt den Versuch einer Auftrennung nahe. Der Versuch der *online* CE-MS-Auftrennung dieser Substanzklasse ist in der Literatur bisher nur für zwei andere Elektrolyt-Systeme exemplarisch gezeigt [81, 174]. Glycerophospholipide sind aufgrund ihres stark hydrophoben Charakters ebenfalls für *online* CE-MS kaum zugänglich. Diese bleiben jedoch bei einer Aufreinigung von LPS zuweilen als Kontamination in der Probe. Eine Abtrennung von LPS durch CE-MS wäre vorteilhaft, um gegenseitige Beeinflussung bei der Ionisation und somit beim Nachweis auszuschließen. Von den bisher genannten Gründen abgesehen sind Glycerophospholipide und Glykosphingolipide die Hauptbestandteile aller Biomembranen, eine erfolgreiche Trennung mit einem CE-MS-System würde das Anwendungsgebiet erheblich erweitern.

Die Experimente wurden in gleicher Weise wie die Versuche mit LPS durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in LPS89 aufgenommen, dies diente auch als *sheath liquid*, zugeführt mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Alle Versuche wurden mit der selbst gebauten Anlage gemacht. Die Kapillare war eine 45 cm lange, unbelegte Kapillare mit 50 μm ID, die angelegte Feldstärke betrug 556 V/cm. Der Elektrolyt wurde variiert. Gezeigt werden Ergebnisse zu Versuchen an einer Gangliosid-Mischung mit LPS89 als Elektrolyten und Ergebnisse einer Glycerophospholipid-Mischung aus DOPE, PI, DMPS und DMPG mit LPS89, LPS73, LPS66 und LPS42 als Elektrolyten. Die Gangliosid-Mischung wurde in einer Konzentration von 17 μM aufgenommen. Das Glycerophospholipid-Gemisch wurde 85 μM aufgenommen. Bei den mit 50 mbar Überdruck für 5 s durchgeführten Injektionen entspricht das etwa 1,5 pmol injizierter Substanz bei den Gangliosid-Messungen und etwa 7,5 pmol injizierter Substanz bei den Messungen des Glycerophospholipid-Gemisches. Zu diesem auch die Bemerkung, dass es sich bei PI um eine natürliche Mischung handelt, da PI nicht präparativ aufgetrennt werden kann. Die Hauptkomponente

dieser Mischung ist das PI 38:4, als mit insgesamt 38 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen, unbekannt verteilt auf die beiden Fettsäuren.

Abbildung 5.12 zeigt einen CE-MS-Versuch mit dem Glycerophospholipid-Gemisch. DOPE wird vom Rest der Mischung unter den gegebenen Bedingungen abgetrennt, eine leichte Abtrennung zeigt sich auch für PI. DMPS und DMPG dagegen konnten unter diesen Bedingungen nicht voneinander getrennt werden. Die Migrationszeiten überschneiden sich teilweise mit denen einzelner LPS-Proben.

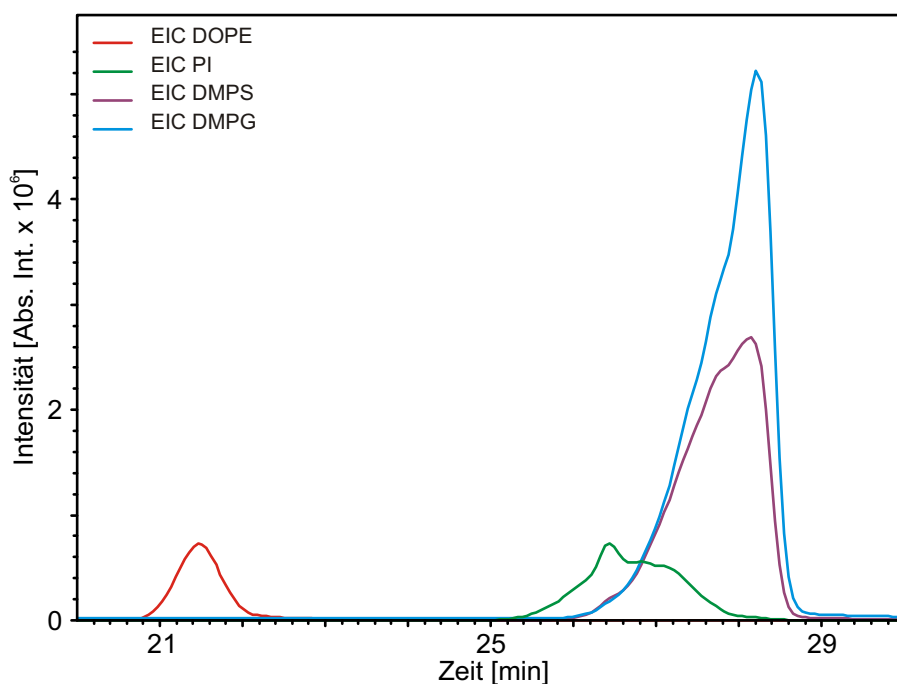


Abbildung 5.12: Bei dem Versuch einer CE-MS-Trennung verschiedener Glycerophospholipide ist zu erkennen, dass nur DOPE und ansatzweise PI aufgetrennt werden konnten.

Um eventuell eine Verbesserung der Trennung zu erreichen wurde der eingesetzte Elektrolyt variiert. Die Versuche wurden je Elektrolyt zwischen einem und dreimal durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Migrationszeiten der einzelnen Glycerophospholipide bei verschiedenen Elektrolyten. Die weiteren getesteten Elektrolyte zeigen keine Verbesserung der Trennung. Der Schritt zu saureren pH-Werten scheint sich dagegen wie auch beim LPS eher negativ auf die Trennung auszuwirken. Ausnahme ist hierbei die verwendete LPS42, bei dem sich eine Verbesserung der Trennung von PI, DMPS und DMPG andeutet. Dies ist jedoch bestenfalls als Trend zu deuten.

Tabelle 5.9: Vergleich der Migrationszeiten des Glycero-phospholipid-Gemisches für verschiedene Elektrolyte

Signal	Migrationszeit in [min]			
	LPS89	LPS73	LPS65	LPS42
DOPE	14,46 ± 0,35	15,07 ± 0,86	15,39	13,63
PI	18,08 ± 0,17	19,71 ± 0,95	19,47	21,17
DMPs	19,72 ± 0,14	20,95 ± 0,96	20,99	21,70
DMPG	19,02 ± 0,14	21,13 ± 1,00	21,20	22,34

Die CE-MS-Trennung von Gangliosiden ist in Abbildung 5.13 gezeigt. Sie zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Lipopolysaccharide und lassen sich nach ihrer Kopfgruppe, also der Anzahl der Monosaccharid-Residuen auf-trennen. Eine Trennung nach Fettsäureketten kann nicht beobachtet werden. Die Unterschiede in der Kettenlänge scheinen für eine Auftrennung zu gering. In der Abbildung sind die Unterschiede in der Kettenlänge innerhalb ei-ner Gangliosid-Spezies durch unterschiedliche Linienstile bei gleicher Farbe kenntlich gemacht worden.

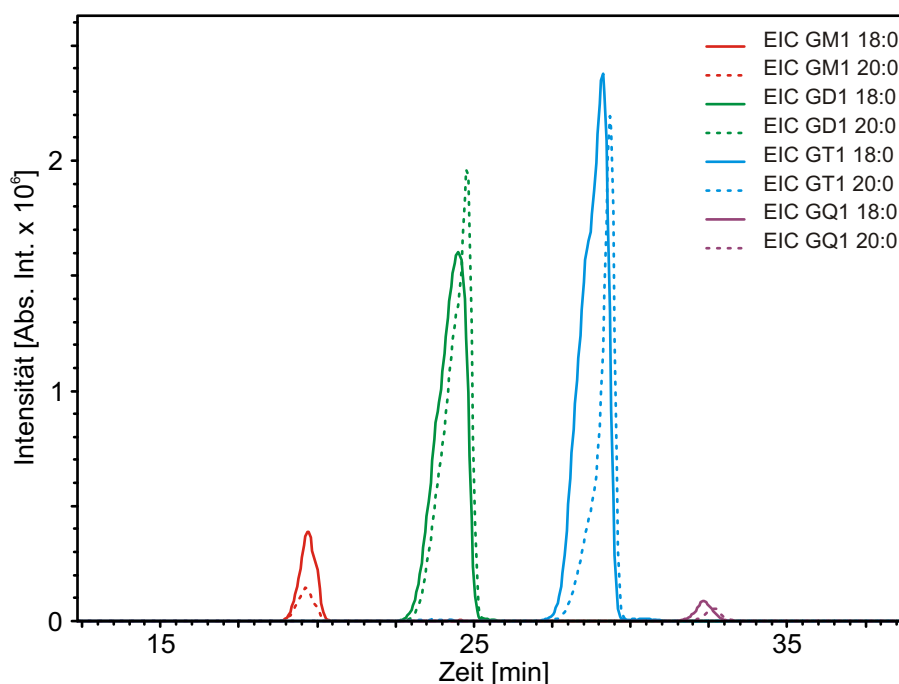


Abbildung 5.13: Eine Gangliosid-Mischung kann mit dem für die Trennung von LPS gefundenen Elektrolyten nach Kopfgruppe aufgetrennt werden.

Die gute Auftrennung der Ganglioside nach ihren Kopfgruppen findet in einem Bereich von Migrationszeiten statt, der mit dem der Lipopolysaccharide vollständig übereinstimmt. Ob es eine Auftrennung oder eine Koelution von Gangliosiden und LPS gibt, wird von der jeweiligen Probe abhängen. Anhand ihrer Masse sind Ganglioside und Lipopolysaccharide problemlos zu unterscheiden.

5.3 Software-gestützte Spektrenauswertung

Biologische Isolate von Glycerophospholipiden und auch Gangliosiden können im massenspektrometrischen Experiment zu recht komplexen Spektren führen. Eine Vortrennung solcher Isolate mit LC-MS- oder CE-MS-Methoden reduziert zwar im Regelfall die Komplexität der Einzelspektren, verlagert damit das Problem der zeitaufwändigen Auswertung aber nur auf eine andere Ebene, da in diesem Fall eventuell hunderte Spektren pro Experiment ausgewertet werden müssen. Hierbei seien auch eventuell zusätzlich gewonnene Informationen durch einige der Vorteile von Vortrennungen wie beispielsweise bezüglich der Ionisationseffizienz von ESI-Quellen noch außer Acht gelassen. Um diese Auswertung zu beschleunigen und etwas zu erleichtern wurde eine Software entwickelt, die die aus solchen Experimenten gewonnenen Signale schnell möglichen Glycerophospholipiden, Glykosphingolipiden und in gewissem Maße auch Oligosacchariden zuordnet.

Beim Entwurf dieser Software gab es einige Grundgedanken und Annahmen, die hier kurz dargelegt werden sollen. Ein Teil der Grundgedanken zu dieser Software betraf die gewünschte Funktionalität. Es sollte in einem ersten Schritt ermöglicht werden, Spektren nach Glycerophospholipiden auszuwerten. Die nahe liegende Gruppe der Glykosphingolipide wurde ebenso schnell zu den gewünschten Funktionen aufgenommen. Des Weiteren sollten selbstverständlich Ionenmodus und Adduktionen automatisch mit berücksichtigt werden können. Die Software sollte sowohl die Eingabe einzelner Signale, also Masse-zu-Ladungsverhältnisse, ermöglichen, als auch die Verarbeitung von Massenlisten, wie sie von der Bruker Aquisitions- und Auswertesoftware erstellt werden können. Für die Umsetzung waren einige weitere Gedanken maßgeblich. Die Software und damit die Zuordnung von möglichen Molekülen zu Signalen im Spektrum sollte auf hoher Massengenauigkeit basieren und die Möglichkeiten von Zuordnungen über MS/MS-Experimente außer Acht lassen, da der Entwicklungsaufwand in diesem Fall erheblich gestiegen wäre. Technisch sollte bei der Umsetzung so weit wie möglich eine auf Algorithmen basierende Lösung realisiert werden und nicht auf Datenbanken gesetzt werden, da diese deutlich weniger administrativen Aufwand benötigt. Zu guter

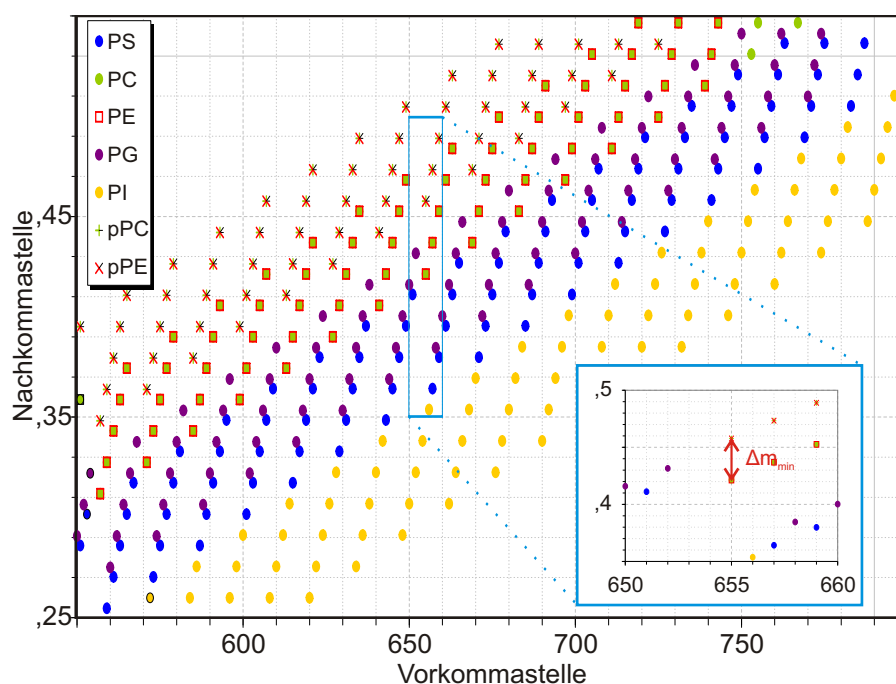


Abbildung 5.14: Plot des Massendefekts einiger Glycerophospholipide. Die Massen einer Auswahl von Glycerophospholipiden mit verschiedenen Fettsäurekettenlängen und bis zu vierfach gesättigt sind getrennt nach Vorkommastelle (Abszisse) und Nachkommastelle (Ordinate) aufgetragen. Aus dieser Art graphischer Darstellung von Massen sind besonders einfach Massenabstände abzulesen. Es ist zu erkennen, dass es Massenisomere von PC und PE beziehungsweise pPC und pPE gibt, die prinzipiell im Massenspektrometer einzig unter Bestimmung der genauen Masse nicht unterscheidbar sind. Der kleinste auftretende Massenabstand ist wie im Ausschnitt eingezeichnet Δm_{\min} mit 0,0364 u. Dieser Massenabstand ist im Massenbereich, in dem diese Substanzen im Massenspektrum auftreten, ohne Probleme mit einem FT-ICR MS auflösbar.

Letzt war ein wichtiger Grundgedanke, dass die erhaltenen Ergebnisse möglichst einfach für weitere Analysen und Weiterverarbeitung verfügbar sein sollten. Aus diesem Grunde wurde entschieden, die Software als Microsoft Excel AddIn in VBA (*Visual Basic for Applications*) zu realisieren und die Ergebnisse in Tabellenblättern in Excel auszugeben, da diese Software weit verbreitet ist, viele Menschen mit ihrer Bedienung vertraut sind, sowie Excel-Dateien auch vom frei verfügbaren OpenOffice⁴ verarbeitet werden können

⁴<http://www.openoffice.org>

und die Ergebnisse somit Jederman zur Weiterverarbeitung offen stehen. Dadurch, dass MS/MS-Daten keine Berücksichtigung finden sollten, stellte sich zuerst die Frage, ob alle zu berücksichtigenden Substanzen allein anhand ihrer exakten Masse getrennt werden können. Die Beantwortung dieser Frage liefert ein Plot, in dem von einer Reihe verschiedener Glycerophospholipide die Massen getrennt nach Vorkommawert und Nachkommawert aufgetragen werden. Dazu wurden für PI, PE, PS, PC und PE sowie die Plasmalogenespezies zu PE und PC die Massen für einige Fettsäurekettenlängen und Doppelbindungen berechnet. Der zugehörige Plot nach Vorkommastelle und Nachkommastelle (siehe Abbildung 5.14) lässt eine Struktur in der Verteilung der Datenpunkte erkennen. Jeweils ein zu einer Spezies gehörender Punkt liegt in einer steil ansteigenden Reihe von Punkten gleicher Farbe. Von einem oberen Punkt beginnend sind dies die steigenden Sättigungsgrade in den Fettsäureketten eines Glycerophospholipids. Es ist außerdem zu erkennen, dass alle Punkte langsam im Plot nach rechts oben wandern, also zu Werten höherer Vorkommastelle und Nachkommastelle. Die breiteren Abstände dazwischen repräsentieren jeweils eine Verlängerung der Fettsäureketten um eine Einheit. In dem Plot ist zu sehen, dass PE und PC sowie auch deren plasmalogene Spezies Massenisomere sein können, also nicht ohne Fragmentierungsexperimente unterscheidbar sind. Der kleinste Massenabstand, der vom Massenspektrometer aufgelöst werden können muss damit die Software hilfreich ist, ist Δm_{\min} mit 0,0364 u, der Abstand einer nicht-plasmalogenen zu einer plasmalogenen Spezies. Dieser Massenabstand ist für das FT-ICR MS auflösbar.

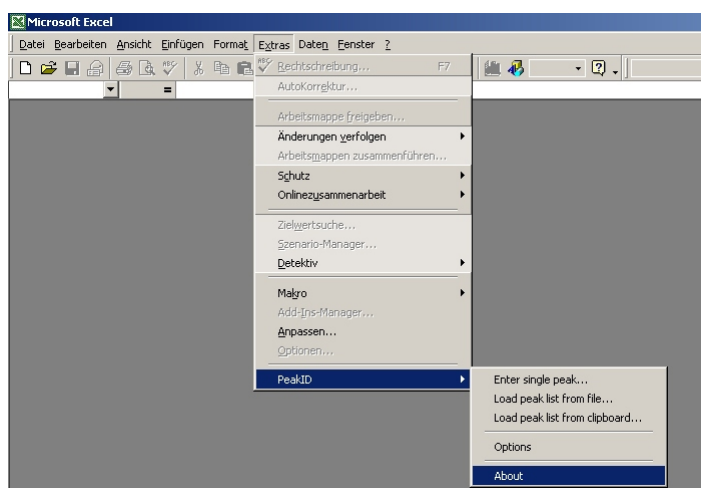


Abbildung 5.15: Das AddIn legt ein Menüunterpunkt in dem Menü Extras von Microsoft Excel an. Hierüber sind dann alle weiteren Funktionen zugänglich.

Die Auswertesoftware, die den (vorläufigen) Namen PeakID trägt, wird als AddIn zur Software Excel der Firma Microsoft installiert. Nach der Installation sind die Programmfunktionen über einen Unterpunkt des Menüs Extras in Excel aufrufbar. Abbildung 5.15 zeigt ein Bild des Programmfensters von Microsoft Excel mit den ausgeklappten Menüpunkten der Auswertesoftware. Es gibt drei Menüpunkte zur Dateneingabe sowie einen, der zu Bearbeitungsmöglichkeiten für diverse Optionen führt. Hinter diesen Optionen verbergen sich auch einige zu administrierende Grunddaten, die für die Funktion des Programms nötig sind. Die Dateneingabe kann entweder über die Eingabe einzelner Masse- zu Ladungsverhältnisse oder über die Eingabe von Massenlisten erfolgen. Diese können entweder aus einer Datei geladen werden oder direkt per *copy and paste* aus den Programmen apexControl und DataAnalysis der Firma Bruker übernommen werden. Es werden die Dateiformate für Massenlisten der Firma Bruker unterstützt, sowohl diejenigen der alten Aquisitions-Software XMass als auch die der neuen Auswerte-Software DataAnalysis.

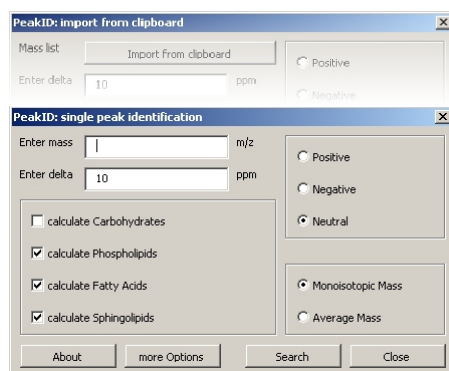


Abbildung 5.16: Das Hauptprogrammfensters von PeakID, im Vordergrund in der Variante zur Eingabe eines einzelnen m/z -Wertes oder eines einzelnen Massenwertes aus einem Spektrum. Im Hintergrund, mit teilweiser Abblendung, ein Bild desselben Menüs im Falle der gewünschten Übernahme einer ganzen Liste von Werten aus der Zwischenablage. Nicht gezeigt ist die Variante zum Laden einer Massenliste aus einer Datei, die jedoch der Variante zur Übernahme aus der Zwischenablage sehr ähnlich ist. Die Optionen zur Suche nach möglichen Zuordnungen sind in allen Fällen gleich und entsprechen der gezeigten Ansicht.

Abbildung 5.16 zeigt das Programmfenster zur Dateneingabe, einmal als Ganzes in der Variante zur Angabe einzelner Masse- zu Ladungsverhältnisse, einmal im Hintergrund angedeutet zur Übernahm von Daten aus der Zwischenablage. Das Programmfenster zur Angabe von Massenlisten-Dateien ist

nahezu identisch zu demjenigen zur Übernahme von Daten aus der Zwischenablage. Bei der Eingabe von Daten müssen einige Angaben gemacht werden. Dies sind der Ionenmodus, also der Ladungszustand, den das Programm zur Berechnung annehmen soll. Es kann angegeben werden, ob es sich bei den Eingaben um monoisotopische Signale handelt. Des Weiteren kann zur Beschleunigung der Datenverarbeitung eine Einschränkung der Stoffklasse angegeben werden, die bei der Berechnung berücksichtigt werden sollen. Hier hat insbesondere die Berechnung von Kohlenhydraten großen Einfluss auf die Verarbeitungsgeschwindigkeit. Hierauf wird bei Erläuterung des Funktionsprinzips der Software später in diesem Abschnitt noch eingegangen. Schließlich ist auch noch die Angabe einer erwarteten instrumentellen Massengenauigkeit nötig. Dazu kann ein Toleranzbereich in ppm angegeben werden, innerhalb dessen nach möglichen Zuordnungen für ein eingegebenes Masse- zu Ladungsverhältnis gesucht wird. Zu allen in diesem Programmfenster möglichen Optionen können Standardwerte hinterlegt werden, die dann als Vorgaben bei jedem Aufruf des Programms bereits eingetragen sind. Diese Angabe dieser Standardwerte ist über den Programmpunkt Optionen möglich. Hier kann auch das Erscheinungsbild der Datenausgabe angepasst werden. Über diesen Programmpunkt ist auch der Programmteil zur Pflege und Erweiterung der Grunddaten erreichbar.

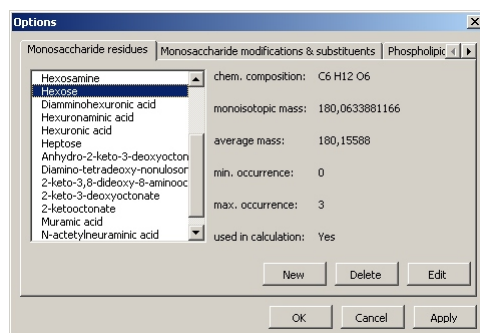


Abbildung 5.17: Bild des Programmfensters für die Verwaltung von Grunddaten in PeakID. Die Grunddaten sind, sortiert nach Molekülklasse, in mehreren Karteireitern aufgeführt.

Das Programm basiert auf der Berechnung von möglichen Molekülen zu einem gegebenen Masse- zu Ladungsverhältnis, benötigt aber trotzdem einige Grunddaten. Dies sind Informationen zu den Kopfgruppen der Glycerophospholipide und Glykosphingolipide, sowie Monosaccharid-Residuen und deren möglicher Modifikationen. Des Weiteren können hier Einschränkungen für die Fettsäureketten-Berechnung vorgenommen werden, betreffend Länge und Sättigungsgrad. Abbildung 5.17 zeigt das Programmfenster zur Grunddaten-

Verwaltung. In verschiedenen Karteireitern sind die Grunddaten nach Molekülspezies geordnet abrufbar und auch editierbar. Der Benutzer kann diese Grunddaten beliebig erweitern und somit den Umfang der möglichen Ergebnisse steuern und erheblich nach eigenen Bedürfnissen erweitern.

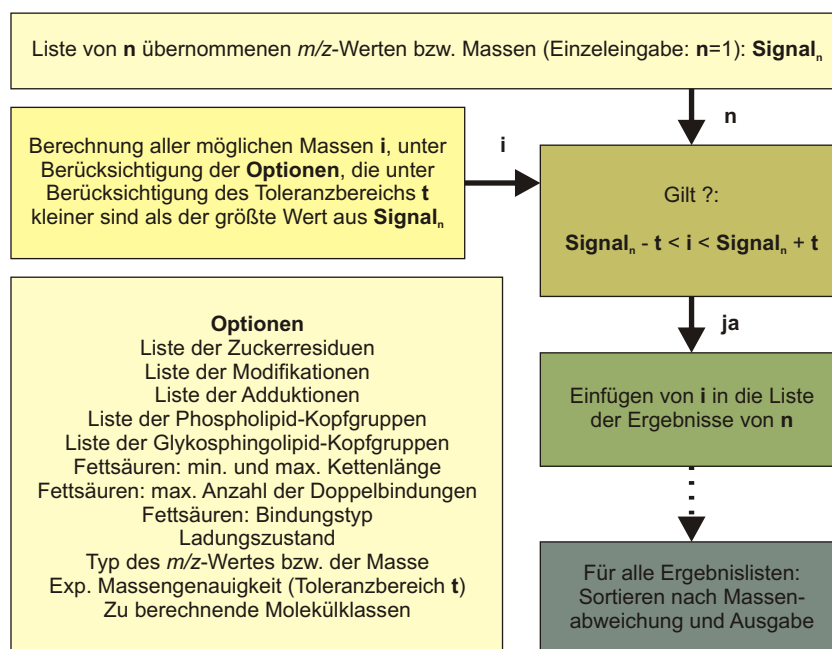


Abbildung 5.18: Schematische Darstellung der Arbeitsweise von PeakID. Unter Berücksichtigung der gegebenen Optionen berechnet PeakID alle möglichen Moleküle, und vergleicht diese jeweils mit allen Einträgen aus der Massenliste. Stimmen Eintrag aus der Massenliste und berechneter Wert innerhalb eines angegebenen Toleranzbereichs überein, so wird der berechnete Wert zur Liste der Ergebnisse eines Eintrags der Massenliste hinzugefügt. Nach Berechnung aller möglichen Moleküle werden die Ergebnislisten nach kleinster Massenabweichung sortiert und ausgegeben.

Die Funktionsweise der Software lässt sich zusammengefasst in einem Satz ausdrücken. Es werden nach allen gemachten Vorgaben des Benutzers alle Möglichkeiten von Molekülen durchgerechnet, wobei innerhalb des Toleranzbereichs passende als Ergebnis ausgegeben werden. Die Komplexität dieser Berechnung beginnt bei Betrachtung der optionalen Einstellungen zur Molekülberechnung deutlich zu werden. Abbildung 5.18 zeigt stark vereinfacht die Funktionsweise des Programms. Basis ist die Berechnung von Molekülen, die

sich je nach Molekülklasse etwas voneinander unterscheidet. Freie Fettsäuren können über ihre Kettenlänge und mögliche Doppelbindungen berechnet werden. Sie werden im Rahmen von Benutzervorgaben zum minimaler und maximaler Kettenlänge und maximaler Anzahl von Doppelbindungen alle durchgerechnet. Einziger weiterer Berechnungspunkt ist die Art des eingegeben Masse- zu Ladungsverhältnisses. Je nachdem, ob der Benutzer den Wert eines positiv geladenen oder negativ geladenen Ions oder einen bereits auf die Neutralmasse zurück gerechneten Moleküls angibt, wird dies vom Programm berücksichtigt. Hinzu kommen eine Reihe möglicher Addukt-Ionen. Ausgehend hiervon erhält man Glycerophospholipide und Glykosphingolipide durch hinzufügen eines Rückgrads und der Kopfgruppen. Beides ist in den Grunddaten erweiterbar hinterlegt. Hier wird für die Glycerophospholipide auch die Art der Bindung der Fettsäure einbezogen, um auch Plasmalogene zu erfassen. Eine erheblich Erweiterung stellt die Berechnung von Oligosacchariden dar, wobei die Software nur mögliche Zusammensetzungen berechnen kann und keinerlei Aussagen über die Art der Verknüpfung. Ohne jegliche Einschränkungen ist diese Aufgabe nur über Berechnung aller möglichen Kombinationen zu erreichen, was jedoch schnell zu unzähligen Möglichkeiten und auch Ergebnissen führen würde. Die Berechnung wäre schon bei nur wenigen Elementen nicht mehr in vertretbarem Zeitaufwand zu machen, in Abhängigkeit davon, wie viele verschiedene Monosaccharide als Bausteine des Oligosaccharides in Frage kommen sollen. Daher sind Möglichkeiten im Programm vorgesehen, mit denen der Benutzer die Berechnung einschränken kann. Die betrifft die minimale und maximale Anzahl des Vorkommens einer Residue im Molekül, ebenso ob diese Residue überhaupt vorkommen kann. Des Weiteren kann auch die Anzahl der pro Monosaccharid möglichen Modifikationen beschränkt werden. Die Berechnung von Oligosacchariden ist für sich genommen zum Beispiel für entsprechende Fragmente in LPS-Spektren nützlich. Wichtiger ist sie aber als Hilfsmittel, um den Bereich möglicher zu berechnender Glykosphingolipide zu erweitern, ohne Unmengen möglicher Kopfgruppen administrieren zu müssen. Zudem sollten mit einem solchen Ansatz auch Glykosphingolipide mit bisher unbekanntem Kopfgruppen in Massenspektren gefunden werden können. Die Software kann also schnell einen Hinweis liefern, wo weitergehende Experimente, zum Beispiel MS/MS-Experimente, interessant sein könnten.

5.3.1 Zwei Anwendungsbeispiele der Software

Die Software-gestützte Spektrenauswertung soll im Folgenden anhand zweier Beispiele gezeigt werden. Es geht hierbei nicht um die Daten an sich, es sollen vielmehr der Arbeitsablauf gezeigt und der Nutzen demonstriert wer-

den. Die beiden Beispiele werden die Software anhand von Massenspektren einer Gangliosid-Mischung demonstrieren. Dazu wurden 10 µg Gangliosid-Mischung in 300 µl Spraylösung (LPS89) aufgenommen und mit einer Flussrate von 2 µl/h der ESI-Quelle zugeführt. Die Spektren sind jeweils aus 30 Einzelmessungen akkumuliert.

Q MS/MS-Spektrum eines Signals einer Gangliosid-Mischung

Für das erste Beispiel wurde ein Signal aus der Gangliosid-Mischung mit Hilfe des Quadrupol-Massenfilters isoliert und anschließend im Hexapol mit CID fragmentiert.

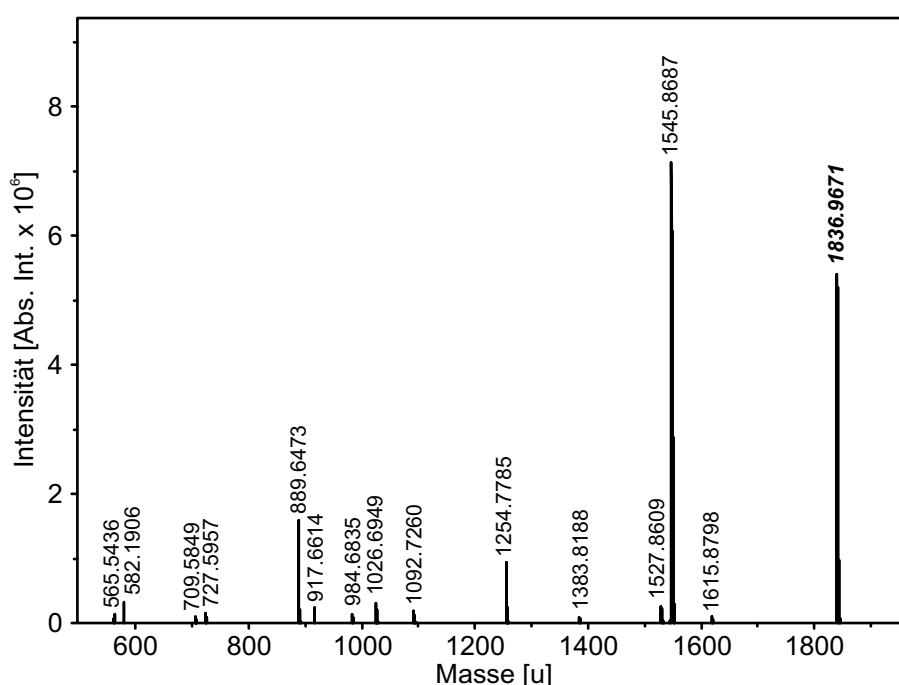


Abbildung 5.19: Ein dekonvuliertes Q MS/MS-Spektrum eines isolierten Signals aus einer Messung einer Gangliosid-Mischung, aufgenommen im negativen Ionenmodus. Das ausgewählte *parent ion* war das Ion zur Masse 1836,9671 u. Es sind die Signale einer Reihe von Fragmenten zu sehen.

Die für das Fragmentieren angelegte Beschleunigungsspannung betrug 25 V. Als *parent ion* wurde das zweifach negativ geladene Ion bei m/z 918 gewählt. Abbildung 5.19 zeigt das dekonvulierte Spektrum des MS/MS-Experiments. Das *parent ion* ist kursiv dargestellt, es erscheint hier aufgrund der Rückrechnung auf den Neutralwert bei der Masse 1836.9671 u. Die zu

diesem Spektrum gehörende Massenliste wurde per *copy and paste* aus DataAnalysis in PeakID überführt und von der Software abgearbeitet. Dabei wurde nach Gangliosiden und Kohlenhydraten gesucht, der angegebene Toleranzbereich war 10 ppm.

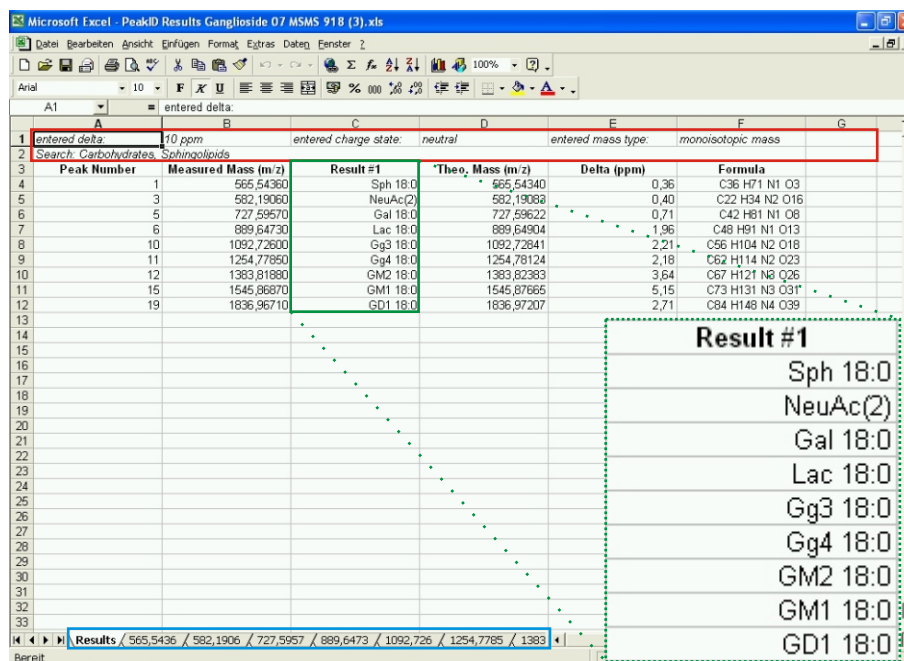


Abbildung 5.20: Ergebnisse von PeakID zum Spektrum aus Abbildung 5.19. Von den aus der Massenliste übernommenen Signalen konnten neun zugeordnet werden.

Die Abbildung 5.20 zeigt die Ausgabe der Ergebnisse in Microsoft Excel. Das Programm gibt im ersten, standardmäßig angezeigten Tabellenblatt eine Übersicht über die Ergebnisse. Im oberen Bereich werden für den Benutzer nochmals die Bedingungen angegeben, unter denen die Berechnung durchgeführt wurde (roter Kasten). Dann folgen die Ergebnisse, wobei in diesem Fall die Nummer des Signals⁵, das experimentelle Masse- zu Ladungsverhältnis⁶, das beste gefundene Ergebnis, das theoretische Masse- zu Ladungsverhältnis dieses Ergebnisses, die Abweichung vom Messwert und die Summenformel angegeben sind. Der Umfang der Ausgabe ist vom Benutzer anpassbar, bis

⁵Die Signale in den Massenlisten sind in der Software der Firma Bruker durchnummeriert. Diese Nummerierung wird in PeakID übernommen, um eine einfachere Zuordnung der Ergebnisse zu ermöglichen.

⁶Hier war dies eine Masse, das Programm unterscheidet dies jedoch (bis jetzt) in der Ausgabe nicht. Was eingegeben wurde ist im Kopfbereich des Tabellenblattes ersichtlich.

auf Signalnummer, Masse- zu Ladungsverhältnis der Eingabe und bestes gefundenes Ergebnis sind alle Spalten in der Ausgabe optional. Signale, zu denen keine mögliche Zuordnung gefunden wurde, werden in der Ausgabe generell nicht berücksichtigt. Die Benennung der Ergebnisse erfolgt weitestgehend nach Benutzervorgaben (grüner Kasten).

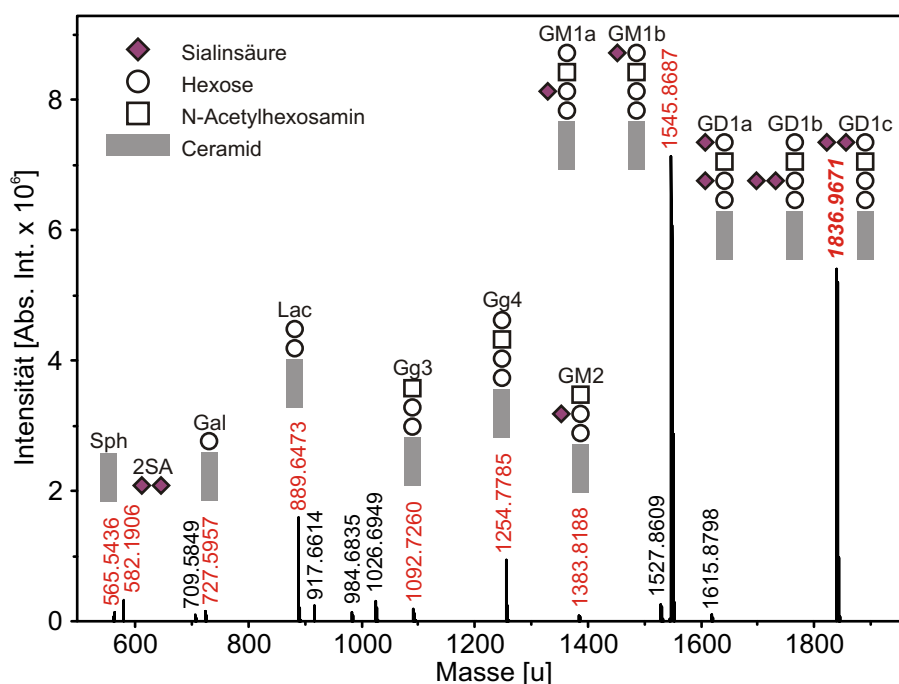


Abbildung 5.21: Ein dekonvuliertes Q MS/MS-Spektrum eines isolierten Signals aus einer Messung einer Gangliosid-Mischung, aufgenommen im negativen Ionenmodus. Das ausgewählte *parent ion* war das Ion zur Masse 1836,9671 u. Es sind die Signale einer Reihe von Fragmenten zu sehen. Alle rot dargestellten Massen sind per Software zugeordnet worden. Zu diesen Signalen sind auch schematisch die möglichen Fragmente dargestellt. Zu dem *parent ion* und zu einem weiteren Fragment gibt es mehrere mögliche Zuordnungen, da aus den hier gewonnenen Daten die Position einiger Residuen nicht determiniert werden kann. Die schematische Darstellung erfolgt in Anlehnung an [161].

Bei Fettsäuren werden nur Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen angegeben. Bei Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden wird eine vom Benutzer wählbare Abkürzung für die Kopfgruppe vorangestellt. Oligosaccharide haben ebenfalls eine vom Benutzer wählbare Abkürzung, diese wird zusammen mit der Anzahl ihres Auftretens ausgegeben. Für alle Masse- zu Lagungsverhältnisse oder auch Massen, zu denen innerhalb des

Toleranzbereichs mehrere mögliche Zuordnungen gefunden wurden, werden diese, nach ihrer Abweichung vom Messwert geordnet, in weiteren Tabellenblättern im Detail aufgeführt (blauer Kasten). Mit den Ergebnissen von PeakID können die Signale im Spektrum nun zugeordnet werden. Abbildung 5.21 zeigt nochmals das Spektrum, diesmal mit den von PeakID zugeordneten Signalen in Rot. Dazu eingezeichnet sind auch schematisch die möglichen Glykosphingolipide. Zu einigen Signalen gibt es mehrere massenisomere Möglichkeiten der Zuordnung. In diesem Experiment ist die Zuordnung einiger Signale aufgrund fehlender charakteristischer Fragmente nicht eindeutiger möglich. Es ist aber die sukzessive Abspaltung von Monosacchariden vom GD1, dem *parent ion*, zu sehen. PeakID lieferte hierzu schnell und in der Gesamtheit der Zuordnungen in sich schlüssig die Zuordnungen zu den resultierenden Fragmenten.

Gesamtspektrum einer Gangliosid-Mischung

Das zweite Beispiel verdeutlicht den Nutzen der Software bei der Auswertung komplexer, heterogener Glykolipid-Mischungen.

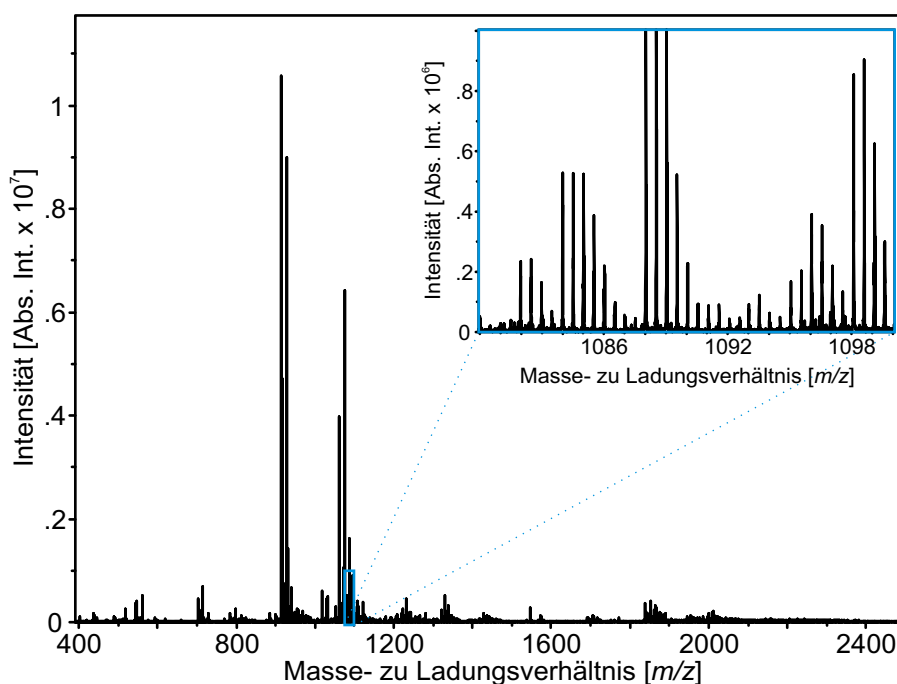


Abbildung 5.22: Ein Spektrum eines Gangliosidgemisches, aufgenommen im negativen Ionenmodus. Der gewählte vergrößerte Ausschnitt (blauer Kasten) veranschaulicht die Komplexität des Spektrums.

Beispielhaft für eine solche Mischung wurde die Gangliosid-Mischung verwendet. Das in Abbildung 5.22 gezeigte Spektrum beinhaltet neben den intensiven Signalen der Hauptbestandteile der Mischung hunderte von Signalen, die ein Signal- zu Rauschverhältnis von über 10 haben. Der Ausschnitt in der Abbildung verdeutlicht die große Anzahl an Signalen.

Peak Number	Measured Mass (m/z)	Result #1	Theo. Mass (m/z)	Delta (ppm)	Formula
7	888,63480	Lac 18.0 - H (1-	888,64122	7,22	C48 H90 N1 O13
30	1440,73300	GM1 11.3 - H (1-	1440,71233	14,35	C66 H110 N3 O31
35	1544,88150	GM1 18.0 - H (1-	1544,86883	8,20	C73 H130 N3 O31
36	1544,89670	GM1 18.0 - H (1-	1544,86883	18,04	C73 H130 N3 O31
37	1572,93120	GM1 20.0 - H (1-	1572,90013	19,75	C75 H134 N3 O31
40	1807,93295	GD1 16.0 - H (1-	1807,93295	9,71	C82 H143 N4 O39
42	1821,94860	GD1 17.0 - H (1-	1821,94860	9,77	C83 H145 N4 O39
43	1835,98150	GD1 18.0 - H (1-	1835,96425	9,40	C84 H147 N4 O39
46	1849,97930	GD1 19.0 - H (1-	1849,97990	0,32	C85 H149 N4 O39
48	1857,96920	GD1 20.3 - H (1-	1857,94860	11,09	C86 H145 N4 O39
49	1864,01370	GD1 20.0 - H (1-	1863,99555	9,74	C86 H151 N4 O39
51	1871,96080	GD1 21.3 - H (1-	1871,96425	1,84	C87 H147 N4 O39
54	1886,00340	GD1 22.3 - H (1-	1885,97990	12,46	C88 H149 N4 O39
55	1892,04850	GD1 22.0 - H (1-	1892,02695	11,44	C88 H155 N4 O39
57	1899,97970	GD1 23.3 - H (1-	1899,99555	8,34	C89 H151 N4 O39
58	1906,02620	GD1 23.0 - H (1-	1906,04250	8,55	C89 H157 N4 O39
80	2015,03270	GT2 22.3 - H (1-	2015,02249	5,07	C93 H156 N5 O42
85	2061,07280	GT2 25.1 - H (1-	2061,10074	13,56	C96 H166 N5 O42
94	2127,08170	GT1 18.0 - H (1-	2127,05966	10,36	C95 H164 N5 O47
97	2149,06520	GT1 20.3 - H (1-	2149,04401	9,86	C97 H162 N5 O47
100	2155,11220	GT1 20.0 - H (1-	2155,09096	9,85	C97 H168 N5 O47
102	2165,03690	GT1 21.2 - H (1-	2165,07531	17,74	C98 H166 N5 O47
103	2169,09560	GT1 21.0 - H (1-	2169,10651	5,98	C98 H170 N5 O47
104	2177,08860	GT1 22.3 - H (1-	2177,07531	10,70	C99 H166 N5 O47
106	2191,06530	GT1 23.3 - H (1-	2191,09096	11,71	C100 H168 N5 O47
108	2197,12500	GT1 23.0 - H (1-	2197,13791	5,88	C100 H174 N5 O47
112	2219,10420	GT1 25.3 - H (1-	2219,12226	8,14	C102 H172 N5 O47
130	2418,18200	GO1 18.0 - H (1-	2418,15508	11,13	C106 H181 N6 O55
131	2440,16270	GO1 20.3 - H (1-	2440,13943	9,54	C108 H179 N6 O55
132	2446,21450	GO1 20.0 - H (1-	2446,18638	11,50	C108 H185 N6 O55

Abbildung 5.23: Ergebnisse zum Spektrum aus Abbildung 5.22. Von den übernommenen 167 Signalen wurden 34 Gangliosiden zugeordnet (grüner Kasten). Die Einstellungen zur Suche sind im Kopf des Tabellenblatts nochmals angegeben (roter Kasten), in weiteren Tabellenblättern (blauer Kasten) befinden sich die Listen der Ergebnisse zu einzelnen Massen (Masse- zu Ladungsverhältnissen), sofern mehr als ein Ergebnis im angegebenen Toleranzbereich gefunden wurde.

Als Test der Software wurden die Massenlisten sowohl eines dekonvulierten als auch des nicht dekonvulierten Spektrums verwendet. Diese beinhalteten 167 Signale beim dekonvulierten Spektrum, 2568 Signale beim nicht dekonvulierten. Die Dekonvolution wurde in diesem Fall nicht auf den Neutralzustand, sondern auf den einfach negativ geladenen Zustand hin berechnet. Diese Listen wurden mit einer Toleranz von 20 ppm mit PeakID auf mögliche Glykosphingolipide abgesucht. Die Software lieferte im Falle der nicht dekonvulierten Liste für 138 Signale Ergebnisse. Berechnung und Datenausgabe waren dabei in weniger als einer Sekunde abgeschlossen. In die

Liste des dekonvulierten Spektrums wurden 34 Signale möglichen Molekülen zugeordnet. Die Verwendung vorher dekonvulierter Daten ist dabei zu empfehlen, da hierbei nur die monoisotopischen Signale in die Liste übernommen werden. Daher ist diese in diesem Beispiel auch so deutlich kürzer. PeakID selbst verfügt nur über einen sehr einfach gehaltenen Algorithmus zur Erkennung möglicher Isotopensignale und liefert somit bei nicht dekonvulierten Daten eventuell zu erheblich mehr Signalen mögliche Zuordnungen. Kommerzielle Software bietet hier weitaus ausgereifere Lösungen zum Zurückrechnen des Ladungszustands. Abbildung 5.23 zeigt das Ergebnis von PeakID für die Daten des dekonvulierten Spektrums.

Kapitel 6

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache Kapillarelektrophorese-Anlage gebaut und an ein hochauflösendes FT-ICR Massenspektrometer gekoppelt. Die selbst gebaute Anlage sollte dabei trotzdem volle Funktionalität hinsichtlich Trennung der Proben und Beladung mit Hilfe von angelegtem Überdruck bieten. Sie sollte weiterhin platzsparend sein und damit die Kopplung die ESI-Quelle mit möglichst kurzen Kapillaren ermöglichen. Die Anlage sollte zur *online* CE-MS-Auftrennung von amphiphilen Zellmembrankomponenten, darunter insbesondere Lipopolysacchariden, dienen. Die hierbei verwendete koaxiale Kopplung wurde hinsichtlich ihrer Möglichkeiten und eventueller Einschränkungen charakterisiert. Die erfolgreiche CE-MS-Trennung amphiphiler Zellmembrankomponenten wurde mit Lipid A und verschiedenen R-Form LPS alleine und in Mischung gezeigt. Hierbei wurden auch die Grenzen der Methode aufgezeigt. Das gefundene Elektrolyt-System wurde weiterhin an Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden getestet. Für die Auswertung von Massenspektren solcher Proben wurde eine Software entwickelt, die es ermöglicht unter Ausnutzung der hohen Massengenauigkeit des FT-ICR MS schnell und umfassend die Signale solcher Spektren möglichen Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden zuzuordnen.

6.1 Aufbau der CE-Anlage und koaxiale Kopplung

In der Arbeit wurde gezeigt, dass mit der selbst gebauten CE-Anlage qualitativ vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können wie mit der P/ACE MDQ. Die etwas schwierigere Handhabung des Eigenbaus beeinflusst nicht die Reproduzierbarkeit. Dies wurde mehrfach gezeigt, so zum Beispiel mit Nukleosiden und Nukleotiden in rein wässrigen Elektrolyten (siehe Abschnitt

5.1.2), als auch zum Beispiel mit LPS F515 in Elektrolyten mit hohem Anteil organischen Lösungsmittels (siehe Abschnitt 5.2.1). Eine Verbesserung des Eigenbaus ist im Hinblick auf eine exaktere Regelung der Zeitdauer, für die ein Überdruck zur Beladung der Kapillare angelegt wird, möglich. Dies würde eine weitere Verbesserung der Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und insbesondere Signalintensitäten bringen.

Ogleich der Eigenbau keine Temperierung der Kapillare zulässt, geben die Ergebnisse keinen direkten Hinweis darauf, dass die beobachtete Signaltbreite durch Erwärmung der Kapillare zustande kommt (siehe Abschnitt 5.1.2). Die P/ACE MDQ hat einen Kühlkreislauf um die Kapillare, dieser kann aber aufgrund des Aufbaus der Anlage im Falle einer Kopplung an ein Massenspektrometer auch nur etwa die ersten 50 cm der benutzten Kapillare temperieren. Ein möglicher Vorteil dieser Anlage gegenüber dem Eigenbau wäre eine Nutzung des PDA-Detektors gleichzeitig zur CE-MS-Kopplung, wobei dies konstruktionsbedingt nur mit baulicher Anpassung möglich wäre. Für die Lipopolysaccharide, Glycerophospholipide und Glykosphingolipide bringt dieser Detektor aufgrund mangelnder Absorption dieser Moleküle im messbaren Wellenlängenbereich jedoch keinen Nutzen.

Die beobachtete Verbreiterung der Signale beim Vergleich von *offline* und *online* Experimenten kann trotz der durchgeführten Experimente keinem eindeutigen Grund zugeordnet werden. Mögliche Erklärungen hierfür wären zu große Erwärmung der Kapillare, Diffusion der Probe aus dem Bereich der injizierten Bande heraus aufgrund von zu großen Konzentrationsunterschieden (Überladung) oder auch eine Adsorption der Probe an den Kapillarwänden (siehe dazu auch Abschnitt 3.2). Die Experimente, die bei unterschiedlich temperierter Kapillare *offline* mit der P/ACE MQD durchgeführt wurden, zeigten bis 55°C keine Verbreiterung der Signale. Zusammen mit der geringen elektrischen Leistung von lediglich wenigen Milliwatt kann Joule'sche Wärme als Ursache der Signalverbreiterung fast sicher ausgeschlossen werden. Die *offline* Versuche bei unterschiedlicher Temperierung wurden mit einem rein auf Wasser basierenden Elektrolyten gemacht. Die Verbreiterung der Signale ist bei den Versuchen mit Elektrolyten mit hohem Anteil organischen Lösungsmittels bei definierten Proben (Glycerophospholipide, Ganglioside) allerdings gleich (siehe Abschnitte 5.1.2, 5.2.2). Einzig die LPS-Proben zeigten zum Teil noch breitere Signale, dies könnte ein Anzeichen für eine Antrennung unbekannter Komponenten in den Proben sein. Die Adsorption an die Kapillarwände wird beispielsweise für LPS in der Literatur genannt [42], jedoch ohne experimentellen Beweis. Die Anlagerung negativ geladener Ionen an die positiv geladene diffuse Schicht in der Kapillare erscheint offensichtlich. Es fehlt jedoch für die meisten der untersuchten Proben an Information zu ihrem Ladungszustand in einer Flüssigkeit wie den verwendeten Elektrolyten.

Weiterhin sprechen auch die Experimente mit den Nukleotiden und Nukleosiden, für die ein direkter Vergleich von *offline* und *online* Messungen möglich ist und durchgeführt wurde, gegen die Hypothese der Anlagerung (siehe Abschnitt 5.1.2). Die Signalverbreiterung konnte bei diesen Experimenten *online* beobachtet werden, *offline* jedoch nicht, obwohl sie dort genauso hätte auftreten müssen. Mit genau dieser Begründung beziehungsweise durch die Ergebnisse der eben diskutierten Experimente scheidet auch die Diffusion aufgrund zu großer Konzentrationsunterschiede zwischen Probenbande und Elektrolyt als Grund für die Signalbreite aus. Auch dies hätte *offline* ebenso wie *online* auftreten müssen. Es bleiben als mögliche Gründe nur eine wirkliche Auftrennung unbekannter Massenisomere in den Proben und Probleme unbekannter Natur im Zusammenhang mit der Verwendung der *sheath liquid* Kopplung. Ersteres erscheint zumindest im Falle der Experimente mit den käuflich erworbenen Nukleosiden, Nukleotiden, Peptiden und Glycerophospholipiden (mit Ausnahme des PI) als sehr unwahrscheinlich. Es bleiben als wahrscheinlichste Erklärung nicht näher definierbare Auswirkungen der Verwendung der koaxialen Anbindung.

Dieses Problem würde sich, ebenso wie der Nachteil der Verdünnung der Probe durch das *sheath liquid* und damit einhergehendem Verlust an Nachweisempfindlichkeit, wahrscheinlich durch Verwendung einer direkten Kopplung lösen lassen. Hierbei wird auf zusätzliche Flüssigkeit zum Herstellen des Potentialausgleichs auf der Ausgangsseite der Kapillare und zum Angleichen der Flussraten an ESI-Bedingungen verzichtet. Statt dessen wird die Kapillare als Zuleitung für eine Nano-ESI-Quelle genutzt. Hierbei sind aber der Potentialausgleich und die Kombination von CE-Flussrate, Innendurchmesser der Kapillare und Innendurchmesser der Kapillarspitze schwierige Probleme. In der Literatur sind eine Vielzahl von Designs für eine direkte Kopplung publiziert, eine Übersicht liefert [58]. Diese unterscheiden sich in ihrem Aufbau zum Teil nur marginal. Größtes zu lösendes Problem und damit auch ein Grund für die Vielzahl verschiedener Detailansätze ist der zuverlässige Potentialausgleich zwischen der Auslass-Seite der CE-Kapillare und der ESI-Quelle. Nach der Publikation eines neuen Designs einer Kopplung folgt nur in sehr wenigen Fällen eine Publikation, in der diese Kopplung auch für analytische Fragestellungen genutzt wurde. Dies mag ein Hinweis darauf sein, wie schwierig es ist, eine wirklich zuverlässige und einfach zu handhabende direkte Kopplung zu konstruieren. Es wurde auch im Rahmen der Arbeit aufgrund der erheblichen möglichen Vorteile versucht, eine direkte Kopplung zu bauen und zu etablieren. Verwendung verschiedener publizierter und nach Publikationen abgewandelter Konstruktionen führten nicht zu dauerhaft stabilen Spraybedingungen (Daten nicht gezeigt). Länger als einige wenige Minuten war kaum ein stabiler Elektrospray zu erhalten. Noch

schwieriger war es Bedingungen in der Ionenquelle zu finden, so dass nach einer Beladung der Kapillare alleine durch Anlegen der CE-Hochspannung wieder der Elektrospray-Prozess einsetzt. Daher wurde in der Arbeit die ko-axiale Anbindung verwendet. Diese Qualität der Kopplung ist allerdings auch hier von einigen schwer handhabbaren Parametern abhängig, wie zum Beispiel der genauen Ausrichtung der Kapillare in der Spitze des Sprayers und einer sorgsamem Vorbehandlung des Kapillarendes im Sprayer.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die selbst gebaute CE-Anlage ähnlich gute Ergebnisse wie eine kommerzielle Anlage erzielen kann. Sie hat, was Kapillarlängen und somit mögliche elektrische Feldstärken angeht, sogar klare Vorteile, da bei ihr 30 cm kurze Kapillaren verwendet werden können. Bei Verwendung P/ACE MDQ war eine Nutzung von Kapillaren unter 80 cm Länge bei Kopplung an das MS nicht möglich.

6.2 CE-MS von Lipopolysacchariden

Die Arbeit zeigt erstmals die erfolgreiche *online* CE-MS-Trennung von nativen, kompletten LPS-Isolaten. Die Verwendung von *online* CE-MS zur Untersuchung von LPS ist in der Literatur nur wenig erwähnt. In der Regel wird der Oligosaccharid-Teil alleine untersucht [10, 102]. Nur einige sehr wenige Arbeiten beschäftigen sich mit der CE-MS-Analyse von de-*O*-acyliertem LPS [95, 97]. Die in der Arbeit gezeigten Experimente demonstrieren die Möglichkeit der CE-MS-Auftrennung und Analyse chemisch unveränderter LPS-Spezies. Die de-*O*-Acylierung, bei der labile, biologisch wichtige Gruppen vom LPS abgespalten werden können, wird durch die nun etablierte Möglichkeit, auch sehr hydrophobe LPS-Spezies inklusive einer Vortrennung zu analysieren, unnötig.

Die Versuche an dem LPS F515, dem Lipid A und dem größeren R-Form LPS R345 (siehe Abschnitt 5.2.1) zeigen eine Trennung der einzelnen Bestandteile der Probe nach der Anzahl der Fettsäureketten. Die größeren Moleküle haben hierbei die kürzeren Migrationszeiten. Im Falle des Lipid A ist auch die Abtrennung von Spezies mit nur einer Phosphatgruppe zu sehen. Diese haben aufgrund ihrer Ladung kürzere Migrationszeiten als solche mit zwei Phosphatgruppen. Auch hierbei verlässt die Spezies mit dem höchsten Molekulargewicht zuerst die Kapillare. Auffallend ist bei allen Versuchen die oft vor allem an der Basis der Signale nochmals erhöhte Signalbreite. Hier könnte es sich eventuell um eine Antrennung einer massenisomeren Variante handeln, denn bei einigen Versuchen waren zu bestimmten Masse- zu Ladungsverhältnissen auch zwei Signale im entsprechenden EIC zu sehen. Ohne die Möglichkeit (im optimalen Falle datenabhängiger) MS/MS-Versuche wäh-

rend des CE-MS-Experimentes bleibt dies jedoch Spekulation. Die datenabhängige MS/MS-Fragmentierung ist auch nur für den Fall wichtig, dass keine vollständige Auftrennung aller Bestandteile einer Probe im *online* Versuch erreicht wird. Ist dies der Fall, würde der Einsatz unspezifischer Fragmentierung in der Ionenquelle oder der Quadrupol-Einheit des Massenspektrometers ausreichen. Die Vortrennung sorgt gewissermaßen für die Spezifität, also ein *parent ion*. Die unspezifische Fragmentierung, die zur diagnostisch wertvollen Abspaltung des Oligosaccharid-Teils vom Lipid A führt, dürfte hierbei auch einen Geschwindigkeitsvorteil haben, da keine Messung zur Selektion eines *parent ion* nötig ist. Die koaxiale Kopplung mit ihrer starken Verdünnung und die starke Verbreiterung der injizierten Probenbande sorgen indes für Signalintensitäten, die meist zu gering sind um bei einem MS/MS-Experiment noch sichtbare Fragmente zu erhalten. Abhilfe könnte eine Aufkonzentrierung der Probe bringen, die aber aufgrund der begrenzten Löslichkeit von LPS im gewählten Elektrolyten nicht beliebig möglich ist. Alle gezeigten Experimente wurden im negativen Ionenmodus durchgeführt, hierfür wurde das System etabliert. Viele wichtige Informationen über die Struktur von LPS und insbesondere des Lipid A können nur über die Fragmentierung im positiven Ionenmodus gewonnen werden. Hierfür ist noch kein funktionierender Elektrolyt bekannt. Auch wenn ein solcher gefunden wird, ist das Problem der kaum für MS/MS-Experimente ausreichenden Signalintensität einzig über die Verwendung einer Nano-ESI-Kopplung zu lösen. Diese konnte in der Arbeit aber nicht stabil etabliert werden. Trotz der Verwendung der *sheath liquid* Kopplung ist der Nachweis von 200 fmol bei einem Signal- zu Rauschverhältnis von über 300 in der Arbeit gezeigt. Da diese Mengenangabe für eine Mischung von Molekülen gemacht wurde, ist die Nachweisempfindlichkeit bezogen auf einzelne LPS-Spezies noch deutlich darunter und dürfte im Bereich einiger Zehn Femtomol liegen.

Auffällig ist an den Experimenten auch die für CE-Verhältnisse lange Laufzeit. Um diesem Problem zu begegnen wurde versucht, den Elektrolyten zu ändern oder zusätzlich zur Hochspannung einen Überdruck auf der Einlassseite anzulegen. Die Experimente in der Arbeit zu Variationen am Elektrolyten zeigten keinen Erfolg (siehe Abschnitt 5.2.1). Eine in manchen Fällen etwas kürzere Migrationszeit wurde durch einen Verlust der Trennung erkauft. Auch das Anlegen eines Druck hat in den Experimenten sehr schnell zu einem totalen Verlust der Trennung geführt. Dieses Ergebnis ist insbesondere deshalb bemerkenswert, weil in aktueller Literatur von erstmals gezeigter druckunterstützter Analyse eines intakten Lipooligosaccharides und eines unveränderten Lipopolysaccharides die Rede ist [42]. Hierbei wird jedoch mit einem Druck von 500 mbar gearbeitet, wohingegen die Experimente in dieser Arbeit eindeutig zeigen, dass bereits ab einem Druck von 100 mbar

keine Trennung mehr stattfindet. Zudem wird in diesen Veröffentlichungen kein experimenteller Beweis einer Trennung in Form eines Totalionenstroms gezeigt.

Nach den Versuchen mit einzelnen LPS-Spezies wurden Mischungen von diesen untersucht, wobei in der Arbeit die Experimente zur Mischung aus Lipid A, LPS F515 und LPS R345 gezeigt sind. Die Vermutung, dass sich die Proben in einer Mischung womöglich etwas anders verhalten als einzeln, hat sich bestätigt. Die Migrationszeiten ändern sich zum Teil erheblich. Ein möglicher Grund ist, dass sich durch Änderung der Probenbande die elektrischen Eigenschaften, insbesondere der elektrische Widerstand, in der Kapillare erheblich geändert haben könnten. Als Folge der geänderten Migrationszeiten können einige wenige Spezies nicht mehr ganz aufgetrennt werden. Für die generelle Aussage, dass es mit dem etablierten System möglich ist, *online* CE-MS-Auftrennung von LPS zu erreichen, ändert sich dadurch nichts. Auch das haben die Experimente gezeigt (siehe Abbildung 5.9). Insbesondere die Betrachtung des Beispiels für einen vollständig ausgewerteten Lauf zeigt die Möglichkeiten der Methode. Hierbei ist insbesondere auch die Ionisationseffizienz zu erwähnen. Bei einer komplexen Mischung kommt es in der Regel zu Unterdrückung einzelner Signale in der ESI-Quelle aufgrund unterschiedlich guter Ionisierbarkeit der Substanzen in der Probe. Dies kann dazu führen, dass einige Bestandteile in einer Mischung im Massenspektrum deutlich unterrepräsentiert sind oder sogar gar nicht nachgewiesen werden. Dieses typische Problem von *offline* MS-Messungen umgeht die CE-MS-Kopplung, ebenso wie andere Vortrennungsmethoden auch. In dem in der Arbeit gezeigten Beispiel der LPS-Mischung (siehe Abbildungen 5.10, 5.11) ändert sich zum Beispiel die Signalintensität des Signals des hexaacylierten Lipid A (Signal Nummer 17), erheblich. Gleiches gilt zum Beispiel für die Verhältnisse der Signale des tetraacyl-LPS F515 (18), und des hexaacyl-LPS F515 (25) zueinander. Das Intensitätsverhältnis dieser beiden Ionen hat sich vom *offline* zum *online* Experiment betrachtet umgekehrt.

Die gezeigten Experimente demonstrieren die Möglichkeiten des für eine *online* CE-MS-Analyse etablierten Systems. Dies könnte durch Verwendung einer zuverlässigen direkten Kopplung, für die es ohne Abstriche nutzbar ist, noch erheblich weitreichendere Analysen bieten.

6.3 CE-MS von Glycerophospho- und Glykosphingolipiden

Glycerophospholipide sind eine mögliche Kontamination von LPS-Isolaten. Es wäre von Vorteil, wenn diese auch durch dasselbe System vom LPS abtrennbar wären. Die für die Trennung von LPS gefundenen Elektrolyte wurden daher auch an Glycerophospholipid-Gemischen und an einer Gangliosid-Mischung getestet. Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass sich eine Mischung aus verschiedenen Glycerophospholipiden nicht vollständig im Elektrolyt-System der LPS-Auftrennung separieren lässt (siehe Abschnitt 5.2.2). Ebenfalls legen die Migrationszeiten den Schluss nahe, dass sich in einer Mischung mit LPS die Signale der Glycerophospholipide und einiger LPS-Spezies überlagern würden. Soll das CE-MS-System für die Analytik von Glycerophospholipiden genutzt werden, so müssen weiter dafür optimierte Elektrolyte gesucht werden. Eine Variation des LPS-Elektrolyten nach pH-Wert brachte keine Besserung der Trennung. In der Kapillarelektrophorese werden auch kaum Trennungen von Glycerophospholipiden beschrieben, sie werden aber zur Belegung von Kapillaren eingesetzt [38].

Ganglioside ließen sich, wie in den Experimenten gezeigt, sehr gut nach ihrer Kopfgruppe auftrennen. Die CE-MS-Trennung von Gangliosiden ist in der Literatur bereits mit anderen Elektrolyten gezeigt [81, 174], auch diese aber eher beispielhaft als denn mit einem für diese Fragestellung optimierten System. In dieser Arbeit wird die erstmalige Trennung in einem Elektrolyten mit hohem Anteil organischen Lösungsmittels gezeigt.

6.4 Die Software-gestützte Auswertung

Im Bereich der Peptid- und Proteinanalytik gibt es eine unüberschaubare Anzahl an Software zur Auswertung von massenspektrometrischen Daten. Dies liegt daran, dass die Massenspektrometrie im Bereich der Strukturanalytik von Peptiden bereits sehr schnell und sehr früh ihre Stärken ausspielen konnte. Peptide und Proteine sind als lineare Biopolymere und durch ihre aus Sicht der Strukturanalytik optimale und einfache massenspektrometrische Fragmentierung sehr gut zu charakterisieren. Diese führte bereits früh dazu, dass die Möglichkeiten für Peptidsequenzierung bei hohem Probandendurchsatz erkannt und dementsprechend optimiert und entwickelt wurden. In den letzten Jahren wurde im Bereich der Massenspektrometrie angefangen, für die Kohlenhydratforschung etwas Ähnliches aufzubauen, hier sei als Beispiel das EuroCarb-Konsortium genannt [22, 23, 109]. Nach dem Begriff der *proteomics*, also der Erforschung des Proteoms eines Organismus als Ganzes,

geht der Trend nun zur Erforschung des Glykoms, also der Glykolisierungen. Hier wurde in Anlehnung an *proteomics* der Begriff *glycomics* geprägt. Die Entwicklung verbesserter Software zur Analyse von Massenspektren ist also auch hier logische Folge des steigenden Interesses am Forschungsgebiet. Im Gegensatz zu den Proteinen und Peptiden ist die Aufgabe hier ungleich schwerer, da Oligosaccharide häufig vielfach verzweigte Biopolymere sind. Der Bereich der Lipidanalytik (*lipidomics*) steht dagegen, was die Software für halbautomatische Auswertung von Massenspektren betrifft, noch sehr weit am Anfang. Da dieses Gebiet in der Arbeitsgruppe von Interesse ist, wurde daher im Rahmen der Arbeit eine eigene Software zur Auswertung von Lipid-Massenspektren geschrieben. Diese basiert auf der hohen Massengenauigkeit des in der Arbeitsgruppe vorhandenen FT-ICR MS. Es wird daher eine Zuordnung von Signalen zu möglichen Lipiden einzig aufgrund der genauen Masse versucht. Die Software gibt zu einem Signal alle möglichen Zuordnungen an, die innerhalb eines Toleranzbereichs liegen. Dieser kann zwar vom Benutzer angegeben werden, richtet sich aber natürlich nach der Massengenauigkeit des vorhandenen Massenspektrometers. Stehen Daten mit hoher Massengenauigkeit nicht zu Verfügung, könnte die automatische Verwendung von MS/MS-Daten zur Interpretation trotzdem gute Ergebnisse bei der automatischen Zuordnung liefern. Dies würde jedoch einen erheblich gesteigerten Entwicklungsaufwand nach sich ziehen. Nichtsdestotrotz wird auch an dieser Variante gearbeitet [143]. Der Nachteil, der bei einer solchen Lösung in Kauf genommen werden muss, ist erhöhter administrativer Aufwand, denn Daten zur Fragmentierung von Lipiden lassen sich nur in sehr begrenztem Umfang mit einem Algorithmus herleiten. Sie müssen schlicht hinterlegt werden. Die in der Arbeit entwickelte Software basiert hingegen so weit wie möglich auf Berechnungen, lediglich Kopfgruppen der Glycerophospholipide und Monosaccharid-Residuen und -Modifikationen müssen hinterlegt werden. Für Glykosphingolipide ist dies nicht mehr zwingend nötig, sondern optional, um eine einfachere Möglichkeit zu haben, dem Benutzer bekannte Namen und Abkürzungen als Ergebnis zu liefern. Seitens der Geschwindigkeit ist die Software auch für die Verarbeitung großer Datenmengen zu gebrauchen. Einzig der Algorithmus zur Berechnung von Oligosacchariden sollte noch deutlich beschleunigt werden, die Verbesserungen sind aber bereits in der Phase der Implementierung.

Wie bei jeder Software-gestützten Auswertung obliegt es auch bei PeakID dem Anwender, über die Sinnhaftigkeit der erstellten Signalzuordnungen zu entscheiden. Hierbei ist eine *online* an ein Massenspektrometer gekoppelte Vortrennungsmethode sehr hilfreich. Die zusätzliche Information einer Retentionszeit oder Migrationszeit kann bei der eindeutigen Zuordnung im Falle mehrerer passender Vorschläge zu einem Signal sehr wertvoll sein. Eine halb

automatisierte Auswertung kann letztlich nur als Hinweis dienen, der erst durch weitere Information wie zum Beispiel durch Vortrennungsmethoden oder durch MS/MS-Versuche an Wert gewinnt.

Es gab Überlegungen, die Software auch um den Bereich der Lipopolysaccharide zu erweitern. Für diese Substanzklasse gibt es im Bereich Software-gestützter Auswertung noch keinerlei Arbeiten. Einige Überlegungen führen jedoch zu dem Schluss, dass der Nutzen einer solchen Lösung basierend auf genauen Massen begrenzt wäre. Hauptsächlich betrafen diese Überlegungen die mögliche Anzahl an Ergebnissen zu einem Signal. Schon durch die große Anzahl an Zuckern bei langkettigem R-Form LPS würde die Anzahl der massenisomeren Möglichkeiten stark steigen, wenn keine sehr restriktiven Einschränkungen hinsichtlich zum Beispiel der möglichen vorkommenden Monosaccharid-Residuen getätigt werden könnten. Ebenso wäre die Ausgabe zur Natur der Fettsäuren zu ungenau um informativ zu sein, da nur die Gesamtkettenlänge und die gesamte Anzahl an Doppelbindungen aller Fettsäuren zusammen angegeben werden könnte. Bei bis zu sieben möglichen Fettsäuren im Lipid A-Teil ist diese Information in der Form zu ungenau. Daher wurde vorerst von einer Erweiterung für LPS abgesehen und der Schwerpunkt der Weiterentwicklung auf die Betrachtung höherer Ladungszustände und die Berücksichtigung von Homo- sowie Heteromultimeren gelegt.

Kapitel 7

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Lipopolysaccharide von R-Form LPS mit Hilfe *online* an ein hochauflösendes FT-ICR Massenspektrometer gekoppelter Kapillarelektrophorese zu trennen. Dies wurde zuvor in der Literatur nicht beschrieben, selbst die Auftrennung von de-*O*-acyliertem LPS ist nur an einem Beispiel mit einer Antrennung gezeigt. Die gewählte koaxiale Kopplung mit Hilfe eines *sheath liquid* gilt als die zuverlässigste Methode der Anbindung. Sie hat jedoch den Nachteil der Verdünnung der Probe. Diese ist so erheblich, dass bei Nutzung einer Kapillare von 20 μm Innendurchmesser ein Nachweis von LPS nicht mehr möglich ist. Die Ausgangskonzentration der Probe kann nicht mehr so weit gesteigert werden, dass ein Nachweis mit solch dünnen Kapillare und der koaxialen Kopplung gelingt. Eine direkte Kopplung ohne die zwangsläufige Verdünnung der Probe durch das *sheath liquid* wird die Nachweisempfindlichkeit erheblich steigern. Jedoch zeigen die momentan zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zur direkten Kopplung noch große Probleme bei der Handhabung und der Einstellung stabiler Spraybedingungen, insbesondere nach Probeneinlass. Sobald eine stabile direkte Kopplung verfügbar sein wird, wird das etablierte System erheblich davon profitieren, da seitens des Elektrolyten keinerlei Anpassungen nötig sind. Er wurde im Hinblick auf die Verwendbarkeit ohne *sheath liquid* entwickelt. Wichtiger noch ist, dass dies die Verwendung nicht nur dünnerer, sondern auch kürzerer Kapillaren ermöglichen würde. Dies würde die Trennung nochmals erheblich verbessern und zur Klärung der nach wie vor offenen Frage zur Breite der Signale beitragen. Mit einer gesteigerten Nachweisempfindlichkeit wären auch datenabhängige Fragmentierungsexperimente während eines CE-MS-Experimentes möglich. Sollte eine solche direkte Kopplung mit den dünneren Kapillaren etabliert sein, so wird die entwickelte Methode noch stärker als jetzt bereits zu einer weit detaillierteren Strukturanalytik von Lipopolysacchariden führen kön-

nen. Unter Verwendung kleiner Probenmengen werden eventuell Antworten auf biologische Fragestellungen möglich sein, die heute nicht eindeutig zu beantworten sind. Die bisherige Analytik einer isolierten LPS-Probe setzt einige chemische Veränderungen der Probe voraus, die biologisch bedeutsame labile Gruppen vom Molekül trennen. Mit Hilfe einer sensitiven, auf CE-MS-Kopplung basierenden Analytik in der entwickelten Form könnten diese chemischen Veränderungen weitestgehend unnötig werden.

Die Weiterentwicklung des verwendeten Elektrolyten oder die Etablierung neuer birgt noch erhebliches Potential. Das hier gefundene System kann wahrscheinlich weiter verbessert werden, sodass eine noch bessere und vielleicht auch schnellere Trennung von LPS erreicht werden kann. Auch sollte der Elektrolyt noch im Hinblick auf die Trennung von Glycerophospholipiden und Glykosphingolipiden verbessert werden können. Dies würde die Methode auch der Analytik von Zellmembrankomponenten gänzlich anderer Herkunft besser zugänglich machen.

In der Lipidanalytik ist nur sehr wenig Software zur Auswertung von Massenspektren vorhanden. Die in der Arbeit durchgeführten Experimente haben den Nutzen einer solchen Software bereits gezeigt, dieser ergibt sich insbesondere bei CE-MS- und HPLC-MS-Experimenten durch die große Anzahl zu analysierender Spektren. Die Software wird in der Arbeitsgruppe intensiv bei der HPLC-MS-Analytik von Membran-Mikrodomänen genutzt [37]. Es bieten sich jedoch noch einige Verbesserungs- und Erweiterungsmöglichkeiten. So wird eine Erweiterung für die Berechnung auch höher geladener Zustände wichtig sein. Die Berechnung von beliebigen Oligosacchariden als Kopfgruppen für Glykosphingolipide wird den Umfang möglicher Zuordnungen erheblich erweitern und auch den Vorteil einer auf Algorithmen basierten Zuordnung gegenüber auf Datenbanken basierenden Lösungen noch deutlicher machen. Hierbei wäre ein Hinweis, falls eine gefundene Kopfgruppe mit einer bereits bekannten übereinstimmt, vermutlich sehr nützlich. Eine weitere wichtige Erweiterung wäre die Berechnung von Homo- und Heterodimeren oder -multimeren. Es hat sich gezeigt, dass sowohl Glycerophospholipide als auch Glykosphingolipide zum Teil bereits in niedriger Konzentration Dimere oder Multimere bilden. Bei der Analyse biologischer Isolate kann dieses Problem nicht durch Herabsetzen der Konzentration gelöst werden, da in dem Fall in geringem Anteil vorkommende Spezies der Analytik verloren gingen. Mit der allgemein zunehmenden Lipidanalytik wird auch die Notwendigkeit für entsprechende Software steigen, so dass die getätigte Entwicklungsarbeit eventuell in ein weiter gefasstes Projekt einfließen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] AEBERSOLD, R., AND MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 6928 (2003), 198–207.
- [2] ALBARGHOUTH, M. N., AND BARRON, A. E. Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 18 (2000), 4096–4111.
- [3] ALEXANDER, J. N., SCHULTZ, G. A., AND POLI, J. B. Development of a nano-electrospray mass spectrometry source for nanoscale liquid chromatography and sheathless capillary electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12, 17 (1998), 1187–1191.
- [4] ASHLIN, D., SINGH, S., HANNEMAN, A., AND REINHOLD, V. Congruent strategies for carbohydrate sequencing. 1. Mining structural details by msⁿ. *Anal Chem* 77, 19 (2005), 6250–6262.
- [5] BABAG, A., GUILIANI, A., AND LAPRÉVOTE, O. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides. *Int J Mass Spectrom* 264, 1 (2007), 1–9.
- [6] BARBER, M., BORDOLI, R. S., SEDGWICK, R. D., AND TYLER, A. N. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* 293, 5830 (1981), 270–275.
- [7] BARBER, M., BORDOLI, R. S., SEDGWICK, R. D., AND TYLER, A. N. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry. *J Chem Soc Chem Commun* 10, 7 (1981), 325–327.
- [8] BARNES, C. A. S., AND LIM, A. Application of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrom Rev* 26, 3 (2007), 370–388.

- [9] BARNIDGE, D. R., NILSSON, S., MARKIDES, K. E., RAPP, H., AND HJORT, K. Metallized sheathless electrospray emitters for use in capillary electrophoresis orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 11 (1999), 994–1002.
- [10] BATEMAN, K. P., BANOUB, J. H., AND THIBAUT, P. Probing the microheterogeneity of θ -specific chains from *Yersinia ruckeri* using capillary zone electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 12 (1996), 1818–1828.
- [11] BATEMAN, K. P., WHITE, R. L., AND THIBAUT, P. Disposable emitters for on-line capillary zone electrophoresis/nano electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11, 3 (1997), 307–315.
- [12] BEAUCHAMP, J. L. Theory of collision-broadened ICR spectra. *J Chem Phys* 46, 4 (1967), 1231–1243.
- [13] BECKEY, H. D., KNÖPPEL, H., METZINGER, G., AND SCHULZE, P. *Advances in mass spectrometry, Vol. 3*. The Institute of Petroleum, 1966.
- [14] BELDER, D., HUSMAN, H., AND WARNKE, J. Directed control of electroosmotic flow in nonaqueous electrolytes using poly(ethylene glycol) coated capillaries. *Electrophoresis* 22, 4 (2001), 666–672.
- [15] BERGQUIST, J., HÅKANSSON, P., SUNDQUIST, B., AND ZUBAREV, R. Mass spectrometry of proteins — Uppsala perspectives on past and present. *Int J Mass Spectrom* 268, 2–3 (2008), 73–82.
- [16] BJØRNSDOTTIR, I., AND HANSEN, S. H. Comparison of separation selectivity in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 771, 11 (1995), 313–322.
- [17] BO, T., AND PAWLISZYN, J. Dynamic process of phospholipid-protein interaction studied by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection. *Electrophoresis* 27, 4 (2006), 852–858.
- [18] BO, T., WIEDMER, S. K., AND RIEKKOLA, M.-L. Phospholipid-lysozyme coating for chiral separation in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 12 (2004), 1784–1791.
- [19] BOGDANOV, B., AND SMITH, R. D. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev* 24, 2 (2005), 168–200.

- [20] CAO, P., AND MOINI, M. A novel sheathless interface for capillary electrophoresis / electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode. *J Am Soc Mass Spectrom* 8, 5 (1997), 561–564.
- [21] CARAVATTI, P., AND ALLEMANN, M. RF shim by trap segmentation. *Org Mass Spectrom* 26, 5 (1991), 514–518.
- [22] CERONI, A., DELL, A., AND HASLAM, S. M. The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures. *Source Code Biol Med* 2, 3 (2007), 1–13.
- [23] CERONI, A., MAASS, K., GEYER, H., GEYER, R., DELL, A., AND HASLAM, S. M. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *Source Code Biol Med* 2, 3 (2007), 1–13.
- [24] CHA, S., AND YEUNG, E. S. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and MSⁿ of small molecules. 1. Imaging of cerebrosides directly from rat brain tissue. *Anal Chem* 79, 6 (2007), 2373–2385.
- [25] CHANG, S. Y., AND YEUNG, E. S. Laser vaporization/ionization interface for capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 69, 13 (1997), 2251–2257.
- [26] CHANG, Y. Z., CHEN, Y. R., AND HER, G. R. Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated tapered fused-silica capillary with a beveled edge. *Anal Chem* 73, 21 (2001), 5083–5087.
- [27] CHANG, Y. Z., AND HER, G. R. Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated fused-silica capillary. *Anal Chem* 72, 3 (2000), 626–630.
- [28] CHANKVETADZE, B., AND BLASCHKE, G. Enantioseparations using capillary electromigration techniques in nonaqueous buffers. *Electrophoresis* 21, 18 (2000), 4159–4178.
- [29] CHEN, F. T. A., DOBASHI, T. S., AND EVANGELISTA, R. A. Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis. *Glycobiology* 8, 11 (1998), 1045–1052.

- [30] CHEN, Y., ALLEGOOD, J., LIU, Y., WANG, E., CACHÓN-GONZALES, B., COX, T. M., MERILL, A. H. J., AND SULLARDS, M. C. Imaging MALDI mass spectrometry using an oscillating capillary nebulizer matrix coating system and its application to analysis of lipids in brain from a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease. *Anal Chem* 80, 8 (2008), 2780–2788.
- [31] CHEN, Y.-R., TSENG, M.-C., AND HER, G.-R. Design and performance of a low-flow capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry interface using an emitter with dual beveled edge. *Electrophoresis* 26, 7–8 (2005), 1376–1382.
- [32] CHEN, Z., BOGGESE, B., AND CHANG, H.-C. Open-tubular capillary electrochromatography-mass spectrometry with sheathless nanoflow electrospray ionization for analysis of amino acids and peptides. *J Mass Spectrom* 42, 2 (2007), 244–254.
- [33] CODY, R. B. J., BURNIER, R. C., AND FREISER, B. S. Collision-induced dissociation with Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem* 54, 1 (1982), 96–101.
- [34] COMISAROW, M. B., AND MARSHALL, A. G. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem Phys Lett* 25, 2 (1974), 282–283.
- [35] COOPER, H. J., HÅKANSSON, K., AND MARSHALL, A. G. The role of electron capture dissociation in biomolecule analysis. *Mass Spectrom Rev* 16, 6 (2003), 880–882.
- [36] COOPER, J. W., WANG, Y., AND LEE, C. S. Recent advances in capillary separations for proteomics. *Electrophoresis* 25, 23–24 (2004), 3913–3926.
- [37] CRONE, C. *Aufbau einer quantitativen massenspektrometrischen Analytik zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen und ihre Anwendung auf Membranmikrodomänen*. PhD thesis, Universität Lübeck, Deutschland, 2007.
- [38] CUNLIFFE, J. M., BARYLA, N. E., AND LUCY, C. A. Phospholipid bilayer coatings for the separation of proteins in capillary electrophoresis. *Anal Chem* 74, 4 (2002), 776–783.
- [39] DEMPSTER, A. J. A new method of positive ray analysis. *Phys Rev* 11, 4 (1917), 316–325.

- [40] DOLNÍK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2003-2005. *Electrophoresis* 27, 1 (2006), 126–141.
- [41] DOLNÍK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* 29, 1 (2008), 143–156.
- [42] DZIECIATKOWSKA, M., BROCHU, D., VAN BELKUM, A., HEIKEMA, A. P., YUKI, N., HOULISTON, R. S., RICHARDS, J. C., GILBERT, M., AND LI, J. Mass spectrometric analysis of intact lipooligosaccharide: Direct evidence for *O*-acetylated sialic acids and discovery of *O*-linked glycine expressed by *Campylobacter jejuni*. *Biochemistry* 46, 50 (2007), 14704–14714.
- [43] EHRICH, M., NELSON, M. R., STANSSENS, P., ZABEAU, M., LILO-GLOU, T., XINARIANOS, G., CANTOR, C. R., FIELD, J. K., AND VAN DEN BOOM, D. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 44 (2005), 15785–15790.
- [44] EL RASSI, Z. Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatographie of carbohydrate species. *Electrophoresis* 20, 15–16 (1999), 3134–3144.
- [45] EL RASSI, Z., AND MECHREF, Y. Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates. *Electrophoresis* 2, 15–16 (1996), 275–301.
- [46] FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H. J., MURPHY, L. C., RAETZ, C. R. H., RUSSELL, D. W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VAN NIEUWENHZE, M. S., WHITE, S. H., WITZTUM, J. L., AND DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46, 5 (2005), 839–861.
- [47] FANALI, S., CATARCINI, P., BLASCHKE, G., AND CHANKVETADZE, B. Enantioseparations by capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 15, 2 (2001), 3131–3151.
- [48] FORET, F., THOMPSON, T. J., VOUIROS, P., AND KARGER, B. L. Liquid sheath effects on the separation of proteins in capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 66, 24 (1994), 4450–4458.

- [49] FRAYSSE, N., VEROLLET, C., COUDERC, F., AND POINSOT, V. Capillary electrophoresis as a simple and sensitive method to study polysaccharides of *Sinorhizibium* sp. NGR234. *Electrophoresis* 24, 19 (2003), 3364–3370.
- [50] FREITAG, R., FIX, M., AND BRÜGGEMAN, O. Analysis of endotoxins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18, 10 (1997), 1899–1905.
- [51] GALANOS, C., LÜDERITZ, O., AND WESTPHAL, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 9, 2 (1969), 143–152.
- [52] GAO, F., DONG, J., LI, W., WANG, T., LIAO, J., LIAO, Y., AND LIU, H. Separation of phospholipids by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *J Chromatogr A* 1130, 2 (2006), 259–264.
- [53] GAO, F., ZHANG, Z., FU, X., LI, W., WANG, T., AND LIU, H. Analysis of phospholipids by NACE with on-line ESI-MS. *Electrophoresis* 28, 9 (2007), 1418–1425.
- [54] GARZA, S., CHANG, S., AND MOINI, M. Simplifying capillary electrophoresis–mass spectrometry operation: Eliminating capillary derivatization by using self-coating background electrolytes. *J Chromatogr A* 1159, 1–2 (2007), 14–21.
- [55] GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and practice. *J Mass Spectrom* 32, 7 (1997), 677–688.
- [56] GASPAR, A., ENGLMANN, M., FEKETE, A., HARIR, M., AND SCHMITT-KOPPLIN, P. Trends in CE-MS 2005–2006. *Electrophoresis* 29, 1 (2008), 66–79.
- [57] GEERDES, H. F., ZIEGLER, D., LODE, H., HUND, M., LOEHR, A., FANGMANN, W., AND WAGNER, J. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin Infect Dis* 15, 6 (1992), 991–1002.
- [58] GELPÍ, E. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *J Mass Spectrom* 37, 3 (2002), 241–253.
- [59] GLAUSER, M. P., ZANETTI, G., BAUMGARTNER, J. D., AND COHEN, J. Septic shock: Pathogenesis. *Lancet* 338, 8769 (1991), 732–736.

- [60] GLÄSER, R., HARDER, J., LANGE, H., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E., AND SCHRÖDER, J.-M. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol* 6, 1 (2005), 57–64.
- [61] GROB, M., AND STEINER, F. Application of nonaqueous capillary electrophoresis to the simultaneous analysis of anionic surfactants. *Electrophoresis* 23, 12 (2002), 1921–1927.
- [62] GUAN, S., AND MARSHALL, A. G. Stored waveform inverse Fourier transform axial excitation/ejection for quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem* 65, 9 (1993), 1288–1294.
- [63] GUO, B.-Y., WEN, B., SHAN, X.-Q., ZHANG, S.-Z., AND LIN, J.-M. Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1074, 1–2 (2005), 205–213.
- [64] HAN, N.-Y., HAUTALA, J. T., BO, T., WIEDMER, S. K., AND RIEKKOLA, M.-L. Immobilization of phospholipid-avidin on fused-silica capillaries for chiral separation in open-tubular capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 27, 8 (2006), 1502–1509.
- [65] HANCOCK, R. E. Alterations in outer membrane permeability. *Ann Rev Microbiol* 38, 1 (1984), 237–264.
- [66] HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 9049 (1997), 418–422.
- [67] HARVEY, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom Rev* 18, 6 (1999), 349–450.
- [68] HASELBERG, R., DE JONG, G. J., AND SOMSEN, G. W. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins. *J Chromatogr A* 1159, 1–2 (2007), 81–109.
- [69] HAU, J., AND ROBERTS, M. Advantages of pressurization in capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 71, 18 (1999), 3977–3984.
- [70] HAUTALA, J. T., WIEDMER, S. K., AND RIEKKOLA, M.-L. Influence of pH on formation and stability of phosphatidylcholine/phosphatidylserine coatings in fused-silica capillaries. *Electrophoresis* 26, 1 (2005), 176–186.

- [71] HERRING, C. J., AND QIN, J. An on-line preconcentrator and the evaluation of electrospray interfaces for the capillary electrophoresis/mass spectrometry of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 1 (1999), 1–7.
- [72] HOFSTADLER, S. A., WAHL, J. H., BRUCE, J. E., AND SMITH, R. D. On-line capillary electrophoresis with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 115, 15 (1993), 6983–6984.
- [73] HÅKANSSON, K., CHALMERS, M. J., QUINN, J. P., MCFARLAND, M. A., HENDRICKSON, C. L., AND MARSHALL, A. G. Combined electron capture and infrared multiphoton dissociation for multistage MS/MS in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal Chem* 75, 13 (2003), 3256–3262.
- [74] HSIEH, F., BARONAS, E., MUIR, C., AND MARTIN, S. A. A novel nanospray capillary zone electrophoresis/mass spectrometry interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 1 (1999), 67–72.
- [75] ISAAQ, H. J., JANINI, G. M., CHAN, K. C., AND VEENSTRA, T. D. Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis–mass spectrometric detection advantages and limitations. *J Chromatogr A* 1053, 1–2 (2004), 37–42.
- [76] JACKSON, S. N., WANG, H.-Y. J., AND WOODS, A. S. In situ structural characterization of glycerophospholipids and sulfatides in brain tissue using MALDI-MS/MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 18, 1 (2007), 17–26.
- [77] JANINI, G. M., CONRADS, T. P., WILKENS, K. L., ISSAQ, H. J., AND VEENSTRA, T. D. A sheathless nanoflow electrospray interface for on-line capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* 75, 7 (2003), 1615–1619.
- [78] JANINI, G. M., ZHOU, M., YU, L.-R., BLONDER, J., GIGNAC, M., CONRADS, T. P., ISSAQ, H. J., AND VEENSTRA, T. D. On-column sample enrichment for capillary electrophoresis sheathless electrospray ionization mass spectrometry: Evaluation for peptide analysis and protein identification. *Anal Chem* 75, 21 (2003), 5984–5993.
- [79] JENNINGS, K. R. Collision-induced decomposition of aromatic molecular ions. *Int J Mass Spectrom Ion Phys* 1, 3 (1968), 227–235.

- [80] JOUCLA, G., BRANDO, T., REMAUD-SIMEON, M., MONSAN, P., AND PUZO, G. Capillary electrophoresis analysis of glucooligosaccharide regioisomers. *Electrophoresis* 25, 6 (2004), 861–869.
- [81] JU, D.-D., LAI, C.-C., AND HER, G.-R. Analysis of gangliosides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 779, 1–2 (1997), 195–203.
- [82] JUSSILA, M., SINERVO, K., PORRAS, S. P., AND RIEKKOLA, M.-L. Modified liquid junction interface for nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 15 (2000), 3311–3317.
- [83] KARAS, M., BACHMAN, D., BAHR, U., AND HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 78, 1 (1987), 53–68.
- [84] KARIMA, R., MATSUMOTO, S., HIGASHI, H., AND MATSUSHIMA, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 5, 3 (1999), 123–132.
- [85] KASICKA, V. Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* 29, 1 (2008), 179–206.
- [86] KELE, Z., FERENC, G., KLEMENT, E., TÓTH, G. K., AND JANÁKY, T. Design and performance of a sheathless capillary electrophoresis/mass spectrometry interface by combining fused-silica capillaries with gold-coated nanoelectrospray tips. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 7 (2005), 881–885.
- [87] KEOUGH, T., TAKIGIKU, R., LACEY, M. P., AND PURDON, M. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of proteins isolated by capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 64, 14 (1992), 1594–1600.
- [88] KILÁR, A., FARKAS, V., KOVÁCS, K., KOCSIS, B., AND KILÁR, F. Novel quantitative electrophoretic analysis of endotoxins on microchips. *Electrophoresis* 29, 8 (2008), 1713–1722.
- [89] KILÁR, A., KOCSIS, B., KUSTOS, I., KILÁR, F., AND HJERTÉN, S. CE to monitor endotoxins by protein complexation. *Electrophoresis* 27, 21 (2006), 4188–4195.

- [90] KLEINIG, H., SITTE, P., AND MAIER, U. *Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 199.
- [91] KONDAKOVA, A., AND LINDNER, B. Structural characterization of complex bacterial glycolipids by Fourier transform mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 11, 5 (2005), 535–546.
- [92] KRYLOV, S. N., AND DOVICI, N. J. Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers. *Anal Chem* 72, 12 (2000), 111–128.
- [93] LARSSON, M., SUNDBERG, R., AND FOLESTAD, S. On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A* 934, 1–2 (2001), 75–85.
- [94] LAZAR, I. M., LEE, E. D., ROCKWOOD, A. L., AND LEE, M. L. General considerations for optimizing a capillary electrophoresis–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry system. *J Chromatogr A* 829, 1–2 (1998), 279–288.
- [95] LI, J., COX, A. D., HOOD, D., MOXON, E. R., AND RICHARDS, J. C. Application of capillary electrophoresis–electrospray–mass spectrometry to the separation and characterization of isomeric lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis*. *Electrophoresis* 25, 13 (2004), 2017–2025.
- [96] LI, J., COX, A. D., HOOD, D. W., SCHWEDA, E. K. H., MOXON, E. R., AND RICHARDS, J. C. Electrophoretic and mass spectrometric strategies for profiling bacterial lipopolysaccharides. *Mol Biosyst* 1, 1 (2005), 46–52.
- [97] LI, J., DZIECIATKOWSKA, M., HOOD, D. W., COX, A. D., SCHWEDA, E. K. H., MOXON, E. R., AND RICHARDS, J. C. Structural characterization of sialylated glycoforms of *H. influenzae* by electrospray mass spectrometry: Fragmentation of protonated and sodiated *O*-deacylated lipopolysaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 6 (2007), 952–960.
- [98] LI, J., MARTIN, A. COX, A. D., MOXON, E. R., RICHARDS, J. C., AND THIBAUT, P. Mapping bacterial glycolipid complexity using capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *Methods Enzymol* 405, 1 (2005), 369–397.

- [99] LI, J., PURVES, R. W., AND RICHARDS, J. C. Coupling capillary electrophoresis and high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry mass spectrometry for the analysis of complex lipopolysaccharides. *Anal Chem* 76, 16 (2004), 4676–4683.
- [100] LI, J., AND RICHARDS, J. C. Application of capillary electrophoresis mass spectrometry to the characterization of bacterial lipopolysaccharides. *Mass Spectrom Rev* 26, 1 (2006), 35–50.
- [101] LI, J., THIBAUT, P., RICHARDS, J. C., WAKARCHUK, W. W., AND VAN DER WILP, W. Development of an on-line preconcentration method for the analysis of pathogenic lipopolysaccharides using capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry. Application to small colony isolates. *J Chromatogr A* 817, 1–2 (1998), 325–336.
- [102] LI, J., WANG, Z., AND ALTMAN, E. In-source fragmentation and analysis of polysaccharides by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 10 (2005), 1305–1314.
- [103] LI, L., WANG, A. P. L., AND COULSEN, L. D. Continuous-flow matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 65, 4 (1993), 496–497.
- [104] LI, Y., SHRESTHA, B., AND VERTES, A. Atmospheric pressure infrared MALDI imaging mass spectrometry for plant metabolomics. *Anal Chem* 80, 2 (2008), 407–420.
- [105] LINDÉN, M. V., HOLOPAINEN, J. M., LAUKKANEN, A., RIEKKOLA, M.-L., AND WIEDMER, S. K. Cholesterol-rich membrane coatings for interaction studies in capillary electrophoresis: application to red blood cell lipid extracts. *Electrophoresis* 27, 20 (2006), 3988–3998.
- [106] LITTLE, D. P., SPEIR, J. P., SENKO, M. W., O’CONNOR, P. B., AND MCLAFFERTY, F. W. Infrared multiphoton dissociation of large multiply-charged ions for biomolecule sequencing. *Anal Chem* 66, 18 (1994), 2809–2815.
- [107] LIU, C. C., JONG, R., AND COVEY, T. Coupling of a large-size capillary column with an electrospray mass spectrometer a reliable and sensitive sheath flow capillary electrophoresis–mass spectrometry interface. *J Chromatogr A* 1013, 1–2 (2003), 9–18.

- [108] LIU, C. C., ZHANG, J., AND DOVICH, N. J. A sheath-flow nano-spray interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 2 (2005), 187–192.
- [109] MAASS, K., RANZINGER, R., GEYER, H., VON DER LIETH, C. W., AND GEYER, R. Glyco-peakfinder—de novo composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* 7, 24 (2007), 4435–4444.
- [110] MACFARLANE, R. D., AND TORGERSON, D. F. Californium-252 plasma desorption mass spectrometry. *Science* 191, 4230 (1976), 920–925.
- [111] MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 72, 6 (2000), 1156–1162.
- [112] MAO, W., THANAWIROON, C., AND LINHARDT, R. J. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462, 1–2 (1999), 1–10.
- [113] MAO, W., THANAWIROON, C., AND LINHARDT, R. J. Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Biomed Chromatogr* 16, 2 (2002), 77–94.
- [114] MAZEREEUW, M., HOFTE, A. J. P., TJADEN, U. R., AND VAN DEN GREEF, J. A novel sheathless and electrodeless microelectrospray interface for the on-line coupling of capillary zone electrophoresis to mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11, 9 (1997), 981–986.
- [115] MCDONELL, L. A., AND HEEREN, R. M. A. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 26, 4 (2005), 606–643.
- [116] MOINI, M. Capillary electrophoresis mass spectrometry and its application to the analysis of biological mixtures. *Anal Bioanal Chem* 373, 6 (2002), 466–480.
- [117] MONTON, M. R. N., AND TERABE, S. Recent developments in capillary electrophoresis-mass spectrometry of proteins and peptides. *Anal Sci* 21, 1 (2005), 5–13.
- [118] MOSELEY, M. A., DETERING, L. J., TOMER, K. B., AND JORGENSEN, J. W. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using a coaxial continuous-flow fast atom bombardment interface. *J Chromatogr* 516, 1 (1990), 167–173.

- [119] MUDDIMAN, D. C., ROCKWOOD, A. L., GAO, Q., SEVERS, J. C., UDSETH, H. R., SMITH, R. D., AND PROCTOR, A. Application of sequential paired covariance to capillary electrophoresis electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry: Unraveling the signal from the noise in the electropherogram. *Anal Chem* 67, 23 (1995), 4371–4375.
- [120] MUNSON, M. S. B., AND FIELD, F. H. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *J Am Chem Soc* 88, 12 (1966), 1621–2630.
- [121] NEUSÜSS, C., PELZING, M., AND MACHT, M. A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 23, 18 (2002), 3149–3159.
- [122] NIKAIDO, H., AND VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49, 1 (1985), 1–32.
- [123] OLIVARES, J. A., NGUYEN, N. T., YONKER, C. R., AND SMITH, R. D. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 59, 8 (1987), 1230–1232.
- [124] PALMER, M. E., TETLER, R. W., AND WILSON, I. D. Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 9 (2000), 808–817.
- [125] PALONEN, S., JUSSILA, M., PORRAS, S. P., HYÖTYLÄINEN, T., AND RIEKKOLA, M.-L. Nonaqueous capillary electrophoresis with alcoholic background electrolytes: Separation efficiency under high electrical field strengths. *Electrophoresis* 23, 3 (2002), 393–399.
- [126] PALONEN, S., PORRAS, S. P., JUSSILA, M., AND RIEKKOLA, M.-L. Peak dispersion and contributions to plate height in nonaqueous capillary electrophoresis at high electric field strengths: propanol as background electrolyte solvent. *Electrophoresis* 24, 10 (2003), 1565–1576.
- [127] PAUL, W., AND STEINWEDEL, H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z Naturforsch A* 8, 7 (1953), 448–450.
- [128] PAULUS, A., AND KLOCKOW, A. Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 740, 1–2 (1996), 353–376.

- [129] PEDDICORD, M. B., AND WEBER, S. G. Nonaqueous affinity capillary electrophoresis investigation of small molecule molecular recognition. *Electrophoresis* *23*, 3 (2002), 431–436.
- [130] PERRON, G. G., ZASLOFF, M., AND BELL, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci* *273*, 1583 (2006), 251–256.
- [131] PORRAS, S. P., JUSSILA, M., SINERVO, K., AND RIEKKOLA, M.-L. Alcohols and wide-bore capillaries in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* *20*, 12 (1999), 2510–2518.
- [132] PORRAS, S. P., AND KENNDLER, E. Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion. *Electrophoresis* *26*, 17 (2005), 3279–3291.
- [133] PORRAS, S. P., MARZIALI, E., GAS, B., AND KENNDLER, E. Influence of solvent on temperature and thermal peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* *24*, 10 (2003), 1553–1564.
- [134] PORRAS, S. P., RIEKKOLA, M.-L., AND KENNDLER, E. Resolution in capillary electrophoresis with nonaqueous methanol as solvent: Theoretical prediction and experimental confirmation. *Electrophoresis* *22*, 17 (2001), 3798–3804.
- [135] PORRAS, S. P., RIEKKOLA, M.-L., AND KENNDLER, E. The principles of migration and dispersion in capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents. *Electrophoresis* *24*, 10 (2003), 1485–1498.
- [136] PSUREK, A., MATYSIK, F.-M., AND SCRIBA, G. K. E. Determination of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* *27*, 5–6 (2006), 1199–1208.
- [137] PSUREK, A., AND SCRIBA, G. K. E. Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: comparison of methanol and aqueous buffers. *Electrophoresis* *24*, 5 (2003), 765–773.
- [138] RAETZ, C. R. H. Bacterial endotoxins: Extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol* *175*, 18 (1993), 5745–5753.
- [139] RAITH, K., WOLF, R., WAGNER, J., AND NEUBERT, R. H. H. Separation of phospholipids by nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* *802*, 1–2 (1998), 185–188.

- [140] RIEKKOLA, M.-L. Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23, 22–23 (2002), 3865–3883.
- [141] SCHMITT-KOPPLIN, P., AND ENGLMANN, M. Capillary electrophoresis - mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003-2004. *Electrophoresis* 26, 7–8 (2005), 1209–1220.
- [142] SCHMITT-KOPPLIN, P., AND FROMMBERGER, M. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* 24, 22–23 (2003), 3837–3867.
- [143] SCHWUDKE, D., OEGEMA, J., BURTON, L., ENTCEV, E., HANNICH, J. T., EJSING, C. S., KURZCHALIA, T., AND SHEVCHENKO, A. Lipid profiling by multiple precursor and neutral loss scanning driven by the data-dependent acquisition. *Anal Chem* 78, 2 (2006), 585–595.
- [144] SCRIBA, G. K. E. Nonaqueous capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1159, 1–2 (2007), 28–41.
- [145] SHIMMA, S., SUQIURA, Y., HAYASAKA, T., ZAIMA, N., MATSUMOTO, M., AND SETU, M. Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal Chem* 80, 3 (2008), 878–885.
- [146] SIETHOF, C., NIGGE, W., AND LINSCHIED, M. Characterization of a capillary zone electrophoresis/electrospray-mass spectrometry interface. *Anal Chem* 70, 7 (1998), 1357–1361.
- [147] SIKANEN, T., TUOMIKOSKI, S., KETOLA, R. A., KOSTIAINEN, R., FRANSSILA, S., AND KOTIAHO, T. Fully microfabricated and integrated SU-8-based capillary electrophoresis-electrospray ionization microchips for mass spectrometry. *Anal Chem* 79, 23 (2007), 9135–9144.
- [148] SMITH, R. D., BARINAGA, C. J., AND UDSETH, H. R. Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Chem* 60, 18 (1988), 1948–1952.
- [149] SMITH, R. D., WAHL, J. H., GOODLETT, D. R., AND HOFSTADLER, S. A. Capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Anal Chem* 65, 5 (1993), 574–584.
- [150] SMYTH, W. F., AND RODRIGUEZ, V. Recent studies of the electrospray ionisation behaviour of selected drugs and their application in

- capillary electrophoresis–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1159, 1–2 (2007), 159–174.
- [151] STEINER, F., AND HASSEL, M. Control of electroosmotic flow in nonaqueous capillary electrophoresis by polymer capillary coatings. *Electrophoresis* 24, 3 (2003), 399–407.
- [152] STEVENS, W. E. Proceedings of the american physical society. *Phys Rev* 69, 11–12 (1946), 674.
- [153] TAKADA, Y., SAKAIRI, M., AND KOIZUMI, H. On-line combination of micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry using an electrospray-chemical ionization interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9, 6 (1995), 488–490.
- [154] TAKÁTS, Z., WISEMAN, J. M., GOLOGAN, B., AND COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306, 5695 (2004), 471–473.
- [155] TEMPORINI, C., CALLERI, E., MASSOLINI, G., AND CACCIALANZA, G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Mass Spectrom Rev* 27, 3 (2008), 207–236.
- [156] TETLER, L. W., COOPER, P. A., AND POWELL, B. Influence of capillary dimensions on the performance of a coaxial capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry interface. *J Chromatogr A* 700, 1–2 (1995), 21–26.
- [157] THOMSON, J. J. Rays of positive electricity. *Proc R Soc A* 89, 607 (1913), 1–20.
- [158] TRIM, P. J., ATKINSON, S. J., PRINCIVALLE, A. P., MARSHALL, P. S., WEST, A., AND CLENCH, M. R. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22, 10 (2008), 1503–1509.
- [159] VAHER, M., KOEL, M., AND KALJURAND, M. Ionic liquids as electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23, 3 (2002), 426–430.
- [160] VALASKOVIC, G. A., KELLEHER, N. K., AND MCLAFFERTY, F. W. Attomole protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Science* 273, 5279 (1996), 1199–1202.

- [161] VARKI, A., CUMMINGS, R., ESKO, J., FREEZE, H., HART, G., AND MARTH, J. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [162] VOLPI, N. Separation of *Escherichia coli* 055:B5 lipopolysaccharide and detoxified lipopolysaccharide by high-performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* *24*, 17 (2003), 3097–3103.
- [163] VROUWE, E. X., GYSLER, J., TJADEN, U. R., AND VAN DER GREEF, J. Chip-based capillary electrophoresis with an electrodeless nanospray interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* *14*, 18 (2000), 1682–1688.
- [164] WACHS, T., AND HENION, J. Electrospray device for coupling microscale separations and other miniaturized devices with electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* *73*, 3 (2001), 632–638.
- [165] WOBSCHELL, D., GRAHAM, J. R. J., AND MALONE, D. P. ICR and the determination of collision cross sections. *Phys Rev* *131*, 4 (1963), 1565–1571.
- [166] WOODLIN, R. L., BOMSE, D. S., AND BEAUCHAMP, J. L. Multiphoton dissociation of molecules with low power continuous wave infrared laser radiation. *J Am Chem Soc* *100*, 10 (1978), 3248–3250.
- [167] WOODS, A. S., AND JACKSON, S. N. Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *AAPS J* *8*, 2 (2006), E391–E395.
- [168] YAMASHITA, M., AND FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* *88*, 20 (1984), 4451–4459.
- [169] YAMASHITA, M., AND FENN, J. B. Negative ion production with the electrospray ion source. *J Phys Chem* *88*, 20 (1984), 4671–4675.
- [170] YATES, J. R. Mass spectrometry and the age of the Proteome. *J Mass Spectrom* *33*, 1 (1998), 1–19.
- [171] YOO, Y. S., KIM, Y. S., JHON, G.-J., AND PARK, J. Separation of gangliosides using cyclodextrin in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* *652*, 2 (1993), 431–439.
- [172] ZAIA, Z. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev* *23*, 3 (2004), 161–227.

- [173] ZAMFIR, A., AND PETER-KATALINIĆ, J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research. *Electrophoresis* 25, 13 (2004), 1949–1963.
- [174] ZAMFIR, A., VUKELIĆ, Z., AND PETER-KATALINIĆ, J. A capillary electrophoresis and off-line capillary electrophoresis/electrospray ionization-quadrupole time of flight-tandem mass spectrometry approach for ganglioside analysis. *Electrophoresis* 23, 17 (2002), 2894–2903.
- [175] ZAMFIR, A. D. Recent advances in sheathless interfacing of capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1159, 1–2 (2007), 2–13.
- [176] ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 6870 (2002), 389–395.
- [177] ZHANG, B., FORET, F., AND KARGER, B. L. A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 72, 5 (2000), 1015–1022.
- [178] ZHANG, B., LIU, H., KARGER, B. L., AND FORET, F. Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem* 71, 15 (1999), 3258–3264.
- [179] ZHANG, J., LAMOTTE, L., DODDS, E. D., AND LEBRILLA, C. B. Atmospheric pressure MALDI Fourier transform mass spectrometry of labile oligosaccharides. *Anal Chem* 77, 14 (2005), 4429–4438.
- [180] ZÄHRINGER, U., LINDNER, B., AND RIETSCHER, E. T. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50, 1 (1994), 211–276.
- [181] ZUBAREV, R. A., KELLEHER, N. L., AND MCLAFFERTY, F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J Am Chem Soc* 120, 13 (1998), 3265–3266.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Übersicht über die Zellhülle Gram-negativer Bakterien	7
2.2	Schematische Übersicht über Lipopolysaccharide	10
2.3	Schematische Übersicht über Glycerophospholipide und Glykosphingolipide	12
2.4	Schematische Übersicht über die häufigsten Ganglioside	13
3.1	Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers	22
3.2	Ionenbewegung in der ICR Zelle	23
3.3	Anregung und Detektion in einem FT-ICR MS	28
3.4	Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionenquelle	33
3.5	Schema des verwendeten Massenspektrometers Bruker Apex Qe	35
3.6	Schema zur Kapillarelektrophorese	37
3.7	Elektrophorese und Elektrosmose	38
3.8	Schematische Darstellung möglicher CE-MS-Kopplungen	43
3.9	Bild des verwendeten CE-Sprayers	44
3.10	Auswertung <i>offline</i> durchgeführter CE-Experimente	46
3.11	Abbildung einer unbearbeiteten und einer bearbeiteten CE-Kapillare	48
3.12	Beispiel für die Signalintensität eines Ions im Massenspektrum und dem Untergehen dieses Signals im Rauschen des Totalionenstroms	51
3.13	Vergleich von <i>total ion chromatogram</i> , <i>base peak chromatogram</i> und <i>extracted ion chromatogram</i>	52
3.14	Glättung der Chromatogramme mittels Gauss-Algorithmus	53
5.1	Photo der selbstgebauten Kapillarelektrophorese-Anlage, aufgebaut neben der ESI-Quelle und gekoppelt	65
5.2	Reproduzierbarkeit bei Verwendung der selbstgebauten Anlage	68

5.3	Extrahierte EIC eines Spektrum der Experimente zur Reproduzierbarkeit mit der selbstgebauten Anlage	70
5.4	Vergleich einer <i>offline</i> CE-Messung und einer <i>online</i> CE-MS-Messung einer Nukleosid- und Nukleotid-Probe	71
5.5	CE-MS-Versuch mit Re-LPS F515 mit der Anlage der Firma Beckman	77
5.6	CE-MS-Versuche mit Re-LPS F515 bei verschiedenen zusätzlich angelegten Drücken	78
5.7	CE-MS-Auftrennung der Lipid A Probe	80
5.8	CE-MS-Auftrennung der LPS R345 Probe	81
5.9	CE-MS-Auftrennung einer Mischung von Lipid A, LPS F515 und LPS R345	83
5.10	<i>Offline</i> Spektrum des LPS-Gemisches	84
5.11	CE-MS-Auftrennung einer LSP-Mischung mit allen zu findenden Signalen	85
5.12	CE-MS-Auftrennung eines Glycerophospholipid-Gemisches	88
5.13	CE-MS-Auftrennung eines Gangliosid-Gemisches	89
5.14	Graph zum Massendefekt einiger ausgewählter Glycerophospholipide	91
5.15	Microsoft Excel Menü mit installiertem PeakID zur Spektrenauswertung	92
5.16	Hauptprogrammfenster von PeakID	93
5.17	Eine Ansicht des PeakID Programmfensters zu den Einstellungen und Optionen	94
5.18	Schema zur Arbeitsweise von PeakID	95
5.19	Ein Beispiel zur Anwendung von PeakID: Q MS/MS-Spektrum eines isolierten Signals einer Gangliosid-Mischung	97
5.20	Ein Beispiel zur Anwendung von PeakID: Ergebnisse der Suche zur Massenliste des Q MS/MS-Spektrums	98
5.21	Ein Beispiel zur Anwendung von PeakID: Mittels PeakID zugeordnete Signale im Q MS/MS-Spektrum	99
5.22	Ein Beispiel zur Anwendung von PeakID: Gesamtspektrum einer Gangliosid-Mischung	100
5.23	Ein Beispiel zur Anwendung von PeakID: Gesamtspektrum einer Gangliosid-Mischung - Ergebnisse von PeakID	101

Tabellenverzeichnis

3.1	Werte für die Formfaktoren α , β und γ in Abhängigkeit der Zellgeometrie einer Penning-Falle	30
3.2	Ein Rechenbeispiel zu Signalintensitäten im Massenspektrum und daraus folgenden Änderungen des Totalionenstroms . . .	50
4.1	Übersicht über die Hersteller beziehungsweise Lieferanten aller in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte (in alphabetischer Reihenfolge)	55
4.2	Baumaterial, Geräte und Teile, die beim Bau der Kapillarelektrophorese-Anlage verwendet wurden	57
4.3	Verwendete Chemikalien	59
4.4	Verbrauchsmaterial	60
4.5	Probensubstanzen	60
5.1	Reproduzierbarkeit bei manueller Injektion	69
5.2	Vergleich der Signalbreiten <i>offline</i> und <i>online</i>	72
5.3	Vergleich der Signalbreiten bei unterschiedlichen Kapillartemperaturen	73
5.4	Vergleich der Nachweisempfindlichkeit verschiedener Spraylösungen für Re-LPS F515	76
5.5	Vergleich der Nachweisempfindlichkeit verschiedener Spraylösungen für Re-LPS F515	79
5.6	Mittlere Migrationszeiten und relative Signalintensitäten von LPS R345 in LPS89	82
5.7	Vergleich der Migrationszeiten des LPS-Gemisches für verschiedene Elektrolyte	83
5.8	Zuordnung der Signale aus dem komplett ausgewerteten MS- und CE-MS-Experiment des LPS-Gemisches zu LPS-Spezies .	86
5.9	Vergleich der Migrationszeiten des Glycerophospholipid-Gemisches für verschiedene Elektrolyte	89

7.1	Auflistung der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen	137
-----	--	-----

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7.1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abs. Int.	Absolute Intensität
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
BPC	<i>Base peak chromatogram</i>
CAD	<i>Collision activated dissociation</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
CE-MS	<i>Capillary electrophoresis-mass spectrometry</i>
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CSD	<i>Capillary skimmer dissociation</i>
DESI	<i>Desorption electrospray ionization</i>
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho-L-Serin]
DMPS	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)]
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i>
FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
FT-ICR MS	<i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
GC	<i>Gas chromatography</i> / Gaschromatographie
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
ID	Innendurchmesser
IS	<i>In-source</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IRMPD	<i>Infrared multiphoton dissociation</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LG	Laborgruppe
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> / Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
NACE	<i>Non-aqueous capillary electrophoresis</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PC	Phosphatidylcholin
PDA	<i>Photodiode array</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
pPC	plasmanyl-/plasmenyl-Phosphatidylcholin
pPE	plasmanyl-/plasmenyl-Phosphatidylethanolamin
ppm	<i>Parts per million</i>
PS	Phosphatidylserin
Q	Quadrupol
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TOF MS	<i>Time-of-flight mass spectrometry</i>
VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Buko Lindner für die interessante und fordernde Aufgabenstellung. Weiterhin möchte ich mich herzlich für die gewährte Unterstützung und für das mir entgegen gebrachte Vertrauen bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Wiese von der Universität Bonn für die Leihgabe der Kapillarelektrophorese-Anlage der Firma Beckman.

Herzlicher Dank gilt Frau Dr. Catharina Crone. Sie unterstützte mich auch unter ungünstigen Bedingungen immer mit fachlichem Rat und persönlichen Worten.

Ich möchte Frau Helga Lüthje für die extrahierten Proben des Lipid A und des LPS danken. Weiter gilt mein Dank Ihr und Frau Brigitte Kunz für die Unterstützung bei vielen praktischen Fragen zum Alltag im MS-Labor. Frau Kunz gilt dabei besonderer Dank für die Organisation und den Transport der geliehenen Kapillarelektrophorese-Anlage. Herrn Kai Treichel danke ich für die Ausführung vieler Experimente zu Tests von möglichen Elektrolyten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Phys. Florian Mumm dafür, dass ich ihn, Skandinavien sei Dank, um fast jede Literatur innerhalb kürzester Zeit bitten konnte, und das auch zu teilweise unmöglichen Zeiten.

Den Herren Dr. Arne Böhling, Dr. Malte Hammer, sowie Dipl.-Phys. Jörg Howe gilt mein Dank für eine tolle Studienzeit und eine interessante und freudige Promotionszeit am Forschungszentrum Borstel. Physik verbindet!

Ich möchte Frau Dipl.-Biol. Susanne Keese für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken, ebenso Frau Dr. Jessica Mittelstädt.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Laborgruppen Biophysik und Immunchemie, insbesondere soweit namentlich nicht bereits erwähnt, gilt

mein Dank für die tolle, kollegiale Atmosphäre. Ihr habt alle Euren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Ein letzter Dank für fachliche Unterstützung gilt vielen Borstelern und Externen, die mit mir über Physik, Massenspektrometrie, Software-Entwicklung, Chemie und Biologie diskutiert haben und mich mit ihrem Wissen weiter gebracht haben.

Ein persönlicher Dank gilt allen Freunden, deren indirekte Unterstützung immer wichtig war. Es gibt doch tatsächlich etwas anderes als die Arbeit.

Mein letzter und doch innigster Dank gilt meiner Familie und Jessi, bei denen ich immer die Unterstützung fand, ohne die mein bisheriger Weg nicht möglich gewesen wäre. DANKE!

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Originalpublikationen

Malm S, Engel R, Walter K, Maass S, Pfau S, Hübner G, Lindner B, Holst O, Ehlers S und Bange F-C *In vitro and in vivo characterization of a Mycobacterium tuberculosis mutant deficient in glycosyltransferase Rv1500*. **Int J Med Microbiol**, angenommen (IJMM-D-07-00122R1)

Hanuszkiewicz A, Hübner G, Vinogradov E, Lindner B, Brade L, Brade H, Debarry J, Heine H and Holst, O *Immunochemistry of the lipopolysaccharide (LPS) from Acinetobacter lwoffii F78 - the first LPS outside Chlamydiaceae carrying a Chlamydia-LPS-specific epitope*. **Chem Eur J**, eingereicht

Tagungsbeiträge

Hübner G und Lindner B *Structural analysis of glycolipids by high resolution Fourier transform mass spectrometry*. **2nd Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates**, Rostock, Deutschland, 4. bis 8. Oktober 2006, **Vortrag**

Hübner G, Crone C und Lindner B *Computer-aided identification of lipids by high resolution FT-ICR MS*. **40. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie**, Bremen, Deutschland, 11. bis 14. März 2007, **Poster**

Hübner G, Hanuszkiewicz A, Holst O und Lindner B *Analysis of lipopolysaccharide and lipid A isolated from Acinetobacter lwoffii F78 by FT-ICR MS. 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Indianapolis, IN, USA, 3. bis 7. Juni 2007, **Poster**

Hübner G und Lindner B *Application of capillary electrophoresis coupled to Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to the analysis of glyco- and phospholipids. 41. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Gießen, Deutschland, 2. bis 5. März 2008, **Poster**

Hübner G und Lindner B *Mass spectrometric characterization of complex glycolipids: Can software help to interpret mass spectra?. Annual EuroCarbDB Meeting*, Stockholm, Schweden, 22. bis 24. April 2008, **Vortrag, auf Einladung**

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Göran Hübner
Geburtsdatum: 21.12.1977
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Wohnsitz: Parkallee 38d
D-23845 Borstel

Bisheriger Werdegang

seit 2004 Promotion am Forschungszentrum Borstel in den Laborgruppen Biophysik und Immunchemie
05/2004 Abschluß: Diplom
1998-2004 Studium der Physik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1997-1998 Grundwehrdienst im Panzerartillerie-Bataillon 515, Liliencronkaserne Kellinghusen
06/1997 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1988 - 1997 Besuch der Jürgen-Fuhlendorf-Schule, Bad Bramstedt
1984 - 1988 Besuch der Grundschule Kellinghusen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und ausschließlich die angegebenen Quellen verwendet wurden. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im Mai 2008

Göran Hübner