

**Optimierung monolithischer Trennmedien für
die Analyse von kleinen Molekülen und die
Kopplung an die Orbitrap-Massenspektrometrie
zur Charakterisierung intakter Proteine**

DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN DER
NATURWISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FAKULTÄT III
CHEMIE, PHARMAZIE UND WERKSTOFFWISSENSCHAFTEN
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

VON

JENS MOHR

SAARBRÜCKEN UND SALZBURG

2010

TAG DES KOLLOQUIUMS: 28.04.2011

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm Maier

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Huber

Prof. Dr. Dietrich Volmer

Vorsitz: Prof. Dr. Michael Springborg

Akademischer Mitarbeiter: PD Dr. Holger Kohlmann

Danksagung

Auf den ersten Blick scheint es, als wäre eine Dissertation lediglich das Werk einer einzelnen Person. Doch letztendlich war die Mithilfe vieler Personen notwendig, um diese Arbeit erfolgreich fertig zu stellen.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Herrn Prof. Dr. Christian Huber** für die Stellung dieses interessanten Themas, die ausgezeichnete und engagierte Betreuung sowie das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich **Herrn Dr. Markus Martin** danken für die Hilfestellung bei theoretischen und praktischen Fragen und Problemstellungen, sowie die zahlreichen fachbezogenen Diskussionen.

Weiterhin danke ich **Herrn Reiner Wintringer (Windy)**, der für nahezu jedes apparative und praktische Problem eine Lösung parat hatte und mir wertvolle Tipps für die vorliegende Dissertation geben konnte.

Ein weiterer Dank geht an **Frau Christa Gölten** und **Frau Anela Dizdarevic** für ihre oftmals notwendige Unterstützung bei den vielen bürokratischen Angelegenheiten.

Darüber hinaus danke ich der gesamten Arbeitsgruppe in Saarbrücken und Salzburg für die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, aber auch die vielen lustigen Stunden, Limnatt-Pausen, Besuche im Fitness-Studio und anderen willkommenen Ablenkungen von der Arbeit. Hierbei sind zu erwähnen: Meine (Ex-)Büroteams aus Salzburg und Saarbrücken, bestehend aus **Nathanaël „Natha“ Delmotte**, **Patrick „Robocop“ Eschhold**, **Andreas „Höhlenmensch“ Leinenbach**, **Giuseppe „Haci“ Martano**, **Katja Melchior**, **Martin Samonig**, **Christian Schley**, **Lisa Weilnböck**, **Martin „Weinberger“ Weinbauer** sowie **Verena Rémenyi geb. Fraaß** mitsamt dem „Wurm“, **David Gode**, **Dr. Iris Gostomski**, **Dr. Andreas Handler**, **Thomas „Hoffi“ Hoffmann**, **Dr. Manuela Hügel**, **Volker „Mücke“ Neu**, **Patrick Riefer**, **Sascha Quinten**, **Silke Ruzek**, **Dr. Leena Suntornsuk**, **Bilgin Vatansever** und unser ehemaliger Laborantenazubi **Devid „Deniz“ Hero**.

Ein großer Dank geht an **Herrn Dr. Remco Swart** und die Firma Dionex Benelux, Amsterdam (Die Niederlande) für die Finanzierung dieser Arbeit und die wertvollen Diskussionen und Anregungen für diese Arbeit. Dank gilt auch **Herrn Dr. Sebastiaan Eeltink** und der Firma Dionex Benelux, Amsterdam (Die Niederlande) für die Bereitstellung der „ProSwift RP 50 x 1.0 mm“-Monolithen.

Darüber hinaus danke ich **Frau Dr. med Nathalie Acevedo** und **Herrn Prof. Dr. Luis Caraballo** (Universität Cartagena, Kolumbien) für die Bereitstellung des *Ascaris lumbricoides* Proteinextrakts und der Anfertigung der Immunoblots und Gele im Rahmen unseres Kooperationsprojekts.

Ich danke **Herrn PD Dr. Frank Steiner** und **Herrn Dr. Frasier McLeod** von der Firma Dionex Softron, Germering (Deutschland) für die Unterstützung dieser Dissertation.

Darüber hinaus danke ich **Herrn Dipl.-Ing. Jörg Schmauch** für die qualitativ hochwertigen Aufnahmen am Raster- und Transmissionselektronenmikroskop.

Ich danke **Herrn Assoz. Prof. PD Mag. Dr. Hanno Stutz** und **Frau MA. rer. nat. Verena Dullnig** (Universität Salzburg) für die Bereitstellung der monoklonalen Betv1-Antikörper.

Ein zusätzlicher Dank geht an **Herrn Dr. Ralf Braun** (Peptido GmbH, Bexbach, Deutschland) für die Bereitstellung des Schilddrüsenhormonstandards.

Ein weiterer Dank gilt dem Werkstatt-Team in Saarbrücken (**Herr Hans-Peter Skohoutil, Herr Norbert Ochs, Herr Jens Wiegert** und **Herr Robin Adolph**) für die Unterstützung in allen technischen Belangen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern **Kurt** und **Marlene Mohr** und all meinen Freunden für ihre Unterstützung während meines Studiums und auch während meiner Dissertation herzlich bedanken.

*"Our greatest glory is not in never failing, but in rising up every
time we fail."*

(Ralph Waldo Emerson, 1803-1882)

Abkürzungen und Akronyme

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
AIBN	α,α' -Azobisisobutyronitril
ACN	Acetonitril
BPC	base peak chromatogram
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
CE	Kapillarelektrophorese
D	Dimensional
Dansyl	Dimethylaminonaphthylsulfonyl-Rest
D.E.R.	Ethylenglycoldiglycidlether
d.h.	das heißt
DMAE	Dimethylaminoethanol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Ameisensäure
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz- Massenspektrometer
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
I.D.	Innendurchmesser
IgG	Immunglobulin G
IEX	Ion-Exchange (Ionenaustausch)
IP	Ionenpaar
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
mAB	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse <i>m</i> zu Ladung <i>z</i>
NP	Normalphase
NPC	Normalphasen-Chromatographie
Nr.	Nummer
NSA	Nonenyl Succinic Anhydride
O.D.	Außendurchmesser
PEEK	Polyetheretherketon
pI	isoelektrischer Punkt
PS/DVB	Poly-(styrol-divinylbenzol)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
ROMP	Ring opening metathesis polymerization
RP	Umkehrphase
RPC	Umkehrphasen-Chromatographie
RSD	relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
SAX	Strong Anion Exchange
SCX	Strong Cation Exchange
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TMOS	Tetramethoxysilan
ToF	Flugzeit
ToF-MS	Flugzeitmassenspektrometrie
UV	Ultraviolettes Licht
v:v	Zusammensetzung in Volumenprozent
Vis	sichtbares Licht
w:w	Zusammensetzung in Gewichtsprozent
WW	Wechselwirkung
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG	XVI
DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	XV
I. THEORETISCHER TEIL	2
1. HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE	2
1.1 Chromatographische Kenngrößen	2
1.1.1 Einleitung	2
1.1.2 Retentionszeit und Retentionsvolumen	2
1.1.3 Retentionsfaktor	4
1.1.5 Peakkapazität	5
1.1.6 Selektivität bzw. Trennfaktor	6
1.1.7 Bodenzahl und Trennstufenhöhe	7
1.1.8 Auflösung	8
1.1.9 Asymmetriefaktor	9
1.1.10 Bandenverbreiterung und die van-Deemter-Theorie	10
1.2 (Ionenpaar-)Umkehrphasenchromatographie	12
1.3 Micro/Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	14
1.3.1 Miniaturisierung in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	14
1.3.2 Instrumentelle Anforderungen an Micro-HPLC-Systeme und Downscaling	17
1.4 Detektionsmethoden für die Micro- und Nano-HPLC	21
2. MONOLITHISCHE TRENNMEDIEN	38
2.1 Einleitung	38

2.2	Synthese von monolithischen Kapillarsäulen auf Polystyrol/Divinylbenzol-Basis	45
2.2.1	Silanisierung der Kapillarinnenwand	45
2.2.2	Polymerisationstechnik und Synthesekomponenten	46
2.2.3	Kontrolle der Phasenmorphologien bei der Synthese von Polystyrol-Divinylbenzol-Monolithen	49
3.	SUBSTANZKLASSEN UND REALPROBEN	54
3.1	Eigenschaften und Strukturen der Aminosäuren	54
3.2	Eigenschaften und Aufbau der Proteine und Peptide	55
3.3	Struktur und Bedeutung der Parabene	58
3.4	Einteilung, Struktur und Bedeutung der Antibiotika	59
3.5	Eigenschaften und Bedeutung der Schilddrüsenhormone	61
3.6	Struktur und Bedeutung der Triazine	63
I.	PS/DVB-MONOLITHEN: ANWENDUNGEN FÜR DIE TRENNUNG VON KLEINEN MOLEKÜLEN	66
1.	EINLEITUNG	66
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	67
2.1	Chemikalien und Materialien	67
2.2	HPLC-Systeme	68
2.3	Rasterelektronenmikroskopie	69
2.4	Silanisierung der Kapillaren	70
2.5	Synthese der monolithischen Kapillarsäulen	70
2.6	Synthese von Bleimethacrylat	70

2.7	Synthese des modifizierten Spurr-Harzes	71
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	72
3.1	Physikalische und chromatographische Charakterisierung der PS/DVB-Monolithen	72
3.1.1	Rasterelektronenmikroskopie	72
3.1.2	Transmissionselektronenmikroskopie	79
3.1.3	Mechanische Stabilität und Quellverhalten der Monolithen	81
3.1.4	Van-Deemter-Kurve für Dansyl-Asparagin	83
3.2	Trennung von Parabenen	85
3.3	Trennung von Triazinen	88
3.4	Trennung von dansylierten Aminosäuren	89
3.5	Trennung von Antibiotika	100
3.6	Trennung von Schilddrüsenhormonen	104
3.7	Trennung von Biopolymeren	108
3.7.1	Trennung von Peptiden	108
3.7.2	Trennung von Proteinen	110
4.	ZUSAMMENFASSUNG	112
	KAPITEL II	115
	EVALUIERUNG VON MONOLITHISCHEN 50 X 1.0 MM I.D. PS/DVB-SÄULEN	115
1.	EINLEITUNG	116
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	117
2.1	Chemikalien und Materialien	117
2.2	HPLC-Systeme	118

2.3	Massenspektrometer	119
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	120
3.1	Reproduzierbarkeit	120
3.2	Mechanische Stabilität und Quellverhalten	127
3.3	Carryover-Effekte und Wiederfindung von Proteinen	129
3.3.1	Carryover-Effekte von Proteinen	129
3.3.2	Wiederfindung von Proteinen	132
3.4	Anwendungen	137
3.4.1	Schnelle Analyse von Proteinen aus Molkegetränken	137
3.4.2	Analyse von Proteinen aus Eiern	140
3.4.3	Analyse von Antikörpern mittels HPLC-UV	142
4.	ZUSAMMENFASSUNG	145
	KAPITEL III	146
	ANALYSE VON INTAKTEN PROTEINEN MIT SCHWERPUNKT AUF MICRO-HPLC-FT-MS	146
1.	EINLEITUNG	147
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	148
2.1	Chemikalien und Materialien	148
2.2	HPLC-Systeme	149
2.3	Massenspektrometer und dazugehörige Accessoires	149
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	151

3.1	Charakterisierung eines micro-HPLC-FT-MS Analysensystems durch die Analyse diverser Proteinmischungen	151
3.1.1	micro-HPLC-FT-MS einer 3er-Proteinmischung	151
3.1.2	micro-HPLC-FT-MS einer 4er-Proteinmischung	155
3.1.3	Analyse einer 10er-Proteinmischung mittels micro-HPLC-FT-MS	161
3.1.4	Analyse von großen Proteinen bis 80 kDa mittels micro-HPLC-FT-MS	167
3.1.5	Analyse des monoklonalen Antikörpers 5.1 gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 mittels micro-HPLC-FT-MS	175
3.1.6	Bestimmung der Nachweisgrenzen von Proteinen mittels micro-HPLC-FT-MS	178
3.1.7	Einfluss der Auflösung auf die Peakbreite von Proteinen	181
3.2	Anwendung für die Analyse von Antikörpern	183
3.2.1	Analyse von f(ab') ₂ -Fragmenten von zwei monoklonalen Maus-anti-Troponin-I-Antikörpern	183
3.2.2	Analyse der monoklonalen Antikörper 8.3 und 5.1 gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1	189
3.3	Analyse des Proteinextrakts aus dem Spulwurm <i>Ascaris lumbricoides</i>	192
3.3.1	Micropräparative Fraktionierung eines Proteinextrakts des Spulwurms <i>Ascaris lumbricoides</i>	194
3.3.2	Analyse von aufgereinigten Glutathion-S-Transferase-Proben aus <i>Ascaris lumbricoides</i>	195
3.3.3	Analyse des Gesamtproteinextrakts aus <i>Ascaris lumbricoides</i> mittels micro-HPLC-ToF-MS und Vergleich der GST-Massen	206
	Zusammenfassung	214
	LITERATURVERZEICHNIS	216

Zusammenfassungen

englische Zusammenfassung

deutsche Zusammenfassung

Zusammenfassung (englisch)

Poly(styrene-divinylbenzene)-based monolithic capillary columns for HPLC have been shown to be effective separation media for large biomolecules such as peptides or proteins. Smaller molecules however are difficult to separate with such columns. This work includes the optimization of monolithic morphology to make organic monoliths also suitable for small molecule separations including amino acids, antibiotics, thyroid hormones or other compounds. Monolithic morphology was characterized by scanning electron micrography and transmission electron micrography. Furthermore, physical and chromatographic properties of the monoliths were determined including a Van Deemter plot and studies about permeability and stability of the monoliths. The second chapter includes the evaluation of 50 x 1.0 mm PS-DVB ProSwift monoliths. Recovery rates of proteins were in the range of 50-100% and no carryover effects were detected. Different real samples were analyzed including whey drinks, chicken eggs, monoclonal antibodies and protein extracts from parasite *Ascaris lumbricoides*. The last chapter describes the applicability of the Orbitrap Mass Analyzer for intact protein analysis using μ HPLC-FT-MS. Limits of detection for proteins were in the range of 2- 400 fmol. The mass accuracy of the Orbitrap was generally less than 10 ppm for intact protein masses. Fast quality control of monoclonal antibodies, complex protein extracts from *Ascaris lumbricoides* and antibody fragments could be realized.

Zusammenfassung (deutsch)

Monolithische Trennmedien auf Poly(styrol-divinylbenzol)-Basis sind effiziente Säulenmaterialien zur Trennung von großen Biopolymeren (Proteine, Peptide etc.). Eine Trennung von kleineren Molekülen ist auf diesen Säulen allerdings nur schwierig zu realisieren. Diese Arbeit enthält Studien über die Optimierung der Phasenmorphologien, um organische Monolithen auch für die Analyse kleiner Moleküle, z.B. Antibiotika, Schilddrüsenhormonen, Aminosäuren oder Parabene zu verwenden. Darüber hinaus wurden wichtige Parameter wie die mechanische Stabilität der Materialien untersucht. Das zweite Kapitel beinhaltet die Evaluierung von 50 x 1 .0 mm PS/DVB-ProSwift-Monolithen. Die Wiederfindungsraten der getesteten Proteine lagen zwischen 50 und 100%. Darüber hinaus wurden verschiedene Realproben analysiert wie Molkegetränke, Hühnereier, monoklonale Antikörper oder komplexe Proteinextrakte aus dem Parasiten *Ascaris lumbricoides*. Das letzte Kapitel beschreibt die Anwendbarkeit des Orbitrap-Massenanalysators für die Analyse von intakten Proteinen mittels μ HPLC-FT-MS. Die Nachweisgrenzen für Proteine lagen in einem Bereich von 2-400 fmol. Bzgl. der Massengenauigkeit konnten generell Werte unter 10 ppm für die intakten Proteinmassen ermittelt werden. Abschließend wurden die beschriebenen μ HPLC-FT-MS-Setups zur Analyse von Realproben verwendet (Qualitätskontrolle von Antikörpern, Antikörper-Fragmenten oder Proteinextrakten aus dem Parasiten *Ascaris lumbricoides*).

Theoretischer Teil

I. Theoretischer Teil

1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

1.1 Chromatographische Kenngrößen

1.1.1 Einleitung

Um in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie die Trenneffizienz und Leistungsfähigkeit der eingesetzten Säulen und Säulenmaterialien zu charakterisieren, gibt eine Vielzahl von chromatographischen Parametern, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden. Hierzu zählen die klassischen Kenngrößen wie Peakbreiten, Retentionsfaktoren, Peakkapazitäten [1], Auflösung, Bodenzahlen oder auch Bodenhöhen. Alle die in diesem Kapitel beschriebenen Parameter sind die Basis zum Verständnis der bei isokratischen und Gradient-Trennungen ablaufenden Prozesse. Darüber hinaus sind die beschriebenen Kenngrößen von fundamentaler Bedeutung, um chromatographische Trennungen optimieren zu können. Bei der Optimierung einer Trennung ist es von großer Wichtigkeit, die Bandenverbreiterung so gering wie möglich zu halten, indem man säulenexterne Totvolumina minimiert und Parameter wie Lineargeschwindigkeit, volumetrische Flussrate etc. an das gegebene Trennproblem und die Säulendimensionen anpasst, um möglichst hohe Selektivitäten, hohe Bodenzahlen und schmale Peakbreiten zu realisieren. Hilfreich hierfür sind unter anderem die Van-Deemter-Theorie [2], die sich generell mit dem Phänomen der Bandenverbreiterung beschäftigt, sowie das Gradientenvolumenkonzept (GVK), die beide in diesem Kapitel ebenfalls erläutert werden und hilfreiche Mittel zur Optimierung von chromatographischen Trennungen sind.

1.1.2 Retentionszeit und Retentionsvolumen

Generell ist es möglich, die Retentionsparameter entweder als Zeiten oder Volumina anzugeben. Bei beiden Kenngrößen muss zwischen absoluten und relativen Werten unterschieden werden. So definiert man die relative Retentionszeit t_R' (Nettoretentionszeit) als Differenz zwischen der Gesamtretentionszeit t_R und der Durchflusszeit der mobilen Phase t_M (**Gleichung 1**):

$$t_R' = t_R - t_M$$

Gleichung 1: Definition der Retentionszeit.

t_R' : Nettoretentionszeit (relative Retentionszeit) [min]

t_R : Gesamtretentionszeit [min]

t_M : Durchflusszeit einer Inertsubstanz (Durchflusszeit der mobilen Phase) [min]

Abbildung 1 zeigt die graphische Darstellung der oben definierten Kenngrößen:

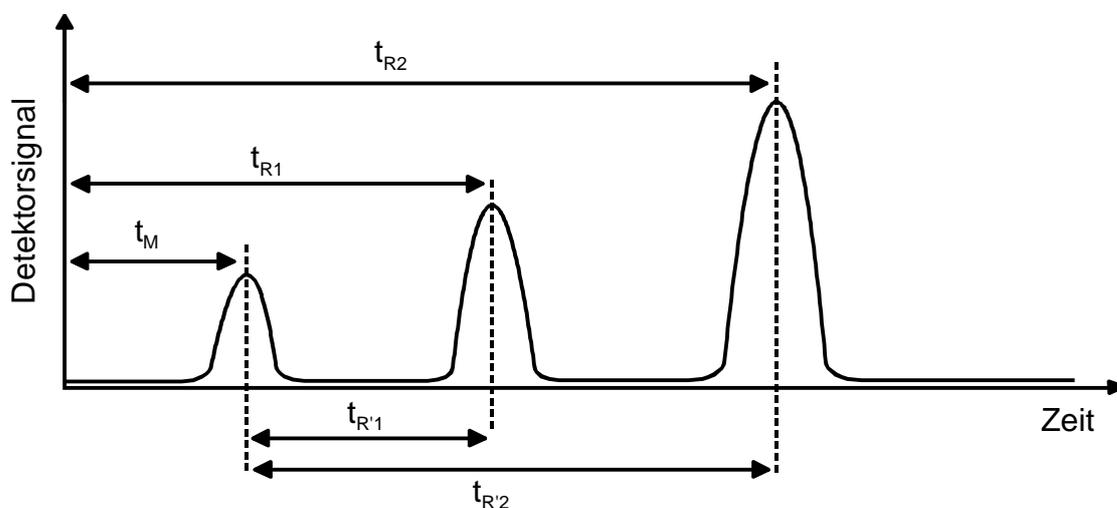


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Durchflusszeit t_M , der Nettoretentionszeit t_R' und der Gesamtretentionszeit t_R .

Zur Bestimmung der Durchflusszeit wird ein so genannter Inertmarker eingesetzt, der nicht mit der stationären Phase wechselwirkt und ohne Retention die Säule verlässt. In der Umkehrphasenchromatographie werden hierfür häufig Uracil oder Thioharnstoff eingesetzt.

Die Retentionszeit ist ein Maß dafür, wie stark ein Analyt mit der stationären Phase wechselwirkt: Je höher die Retentionszeit, desto stärker die Interaktion der Substanz mit der stationären Phase. Analog hierzu definiert sich das Retentionsvolumen (**Gleichung 2**) als:

$$V_R' = t_R' \cdot F = V_R - V_M$$

Gleichung 2: Definition des Retentionsvolumens.

V_R' : Nettoretentionsvolumen (relatives Retentionsvolumen) [min*ml]

t_R' : Nettoretentionszeit (relative Retentionszeit) [min]

F: Durchflussvolumen [ml]

V_M : Volumen der mobilen Phase [ml]

1.1.3 Retentionsfaktor

Den Retentionsfaktor k definiert man allgemein als Quotienten aus der Nettoretentionszeit t_R' und der Durchflusszeit t_M (**Gleichung 3**):

$$k = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_R} = \frac{V_R'}{V_M} = \frac{(V_R - V_M)}{V_M}$$

Gleichung 3: Definition des Retentionsfaktors k.

k: Retentionsfaktor

t_R' : Nettoretentionszeit (relative Retentionszeit) [min]

t_M : Durchflusszeit einer Inertsubstanz [min]

t_R : Gesamtretentionszeit [min]

V_R' : Nettoretentionsvolumen (relatives Retentionsvolumen) [min*ml]

V_R : Gesamtretentionsvolumen [min*ml]

V_M : Volumen der mobilen Phase [ml]

Hierbei beschreibt der Retentionsfaktor k allgemein die Zeit, die sich die Probensubstanz in der stationären Phase aufhält, bezogen auf die Aufenthaltszeit in der mobilen Phase. Der Retentionsfaktor kann durch Faktoren wie Temperatur, stationäre Phase, mobile Phase, volumetrische Flussrate, Lineargeschwindigkeit etc. beeinflusst werden, da er die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten in der Trennsäule beschreibt: Je kleiner der k-Wert, desto schneller eluiert die Substanz. Ideale k-Werte sollten je nach Trennproblem zwischen 2 und 5 liegen. Weiterhin muss bei k-Werten beachtet werden, ob es sich um isokratische oder Gradiententrennungen handelt: Bei isokratischen Trennungen erhält man konstante k-Werte, wohingegen sich der k-Wert im Gradientenmodus permanent ändert, da sich die Laufmittelzusammensetzung ebenso ändert.

1.1.4 Peakbreite

Eine zentrale Kenngröße in der Chromatographie ist die Peakbreite. Wichtig ist hierbei, bei welcher Peakhöhe man die Peakbreiten bestimmt. Zur Bestimmung der Peakbreiten gehen viele Theorien davon aus, dass der Peak die Form einer Gaußkurve besitzt, was aber in der Praxis nur selten der Fall ist. Faktoren wie Säulenüberladung, säulenexternes Totvolumen oder inadquates Packungsmaterial können zu asymmetrischen Peaks führen, was durch den Asymmetrie- bzw. Tailingfaktor T beschreiben lässt. *Bidlingmeyer et al.* [3] gehen in ihren Arbeiten beispielsweise davon aus, dass die Breite oberhalb der halben Peakhöhe vernachlässigbar wenig durch den Asymmetriefaktor beeinflusst wird. Auf der anderen Seite konnten *Pauls et al.* [4] in ihren Arbeiten zeigen, dass die Varianz eines asymmetrischen Peaks mehr als 50% vom wahren Wert abweichen kann, wenn man die Peakhalbwertsbreiten als Grundlage für die Berechnungen verwendet. Andere Theorien wie die von *Gilar et al.* [1] nehmen als Grundlage für ihre Berechnungen die Breite in 13.4% Peakhöhe ($= 4 \sigma$), um damit Peakkapazitäten von Biopolymeren zu bestimmen. Daher kommt es insgesamt eher auf die chromatographische Problemstellung an, ob man mit Peakhalbwerts-, Peakbasis- oder anderen Peakbreiten rechnen kann. In komplexen Peptidmischungen wie z. B. Proteinverdauen ist es oftmals schwer, die Peakbasisbreiten exakt zu bestimmen, weshalb hierfür häufig Peakhalbwertsbreiten verwendet werden. Ähnliches gilt für Trennungen von intakten Proteinen, bei denen die Peakbasisbreiten aufgrund von Verunreinigungen oder Isoformen relativ schwer genau zu bestimmen sind.

1.1.5 Peakkapazität

In unmittelbarem Zusammenhang mit den Peakbreiten steht die Peakkapazität. Hierunter versteht man eine chromatographische Kenngröße, die die Effizienz einer Trennsäule unter Gradientenelution beschreibt. Dabei wird die Peakkapazität definiert als theoretische Anzahl von Peaks, die für einen gegebenen Gradienten und eine gegebene Auflösung maximal getrennt werden können [5]. Klassischerweise wird die Peakkapazität wie folgt berechnet (**Gleichung 4**):

$$P_K = 1 + \frac{t_G}{w_{4\sigma}}$$

Gleichung 4: Klassische Definition der Peakkapazität.

P_K : Peakkapazität

t_G : Gradientendauer [min]

$w_{4\sigma}$: (durchschnittliche) Peakbreite bei 4σ (=13.4% Peakhöhe) in Zeiteinheiten [min]

Statt der Peakbreite in 13.4% Peakhöhe wird auch oftmals die Peakbasisbreite verwendet. Allgemein gilt hierbei: Je höher die Peakkapazität, desto mehr Analyten können in einem bestimmten Zeitfenster getrennt werden, was vor allem für komplexe Proben-Mischungen wie z. B. Proteinverdauung von äußerster Wichtigkeit ist.

1.1.6 Selektivität bzw. Trennfaktor

Der Trennfaktor α kann als Maß für das Vermögen eines Trennsystems, zwischen zwei verschiedenen Analyten unterscheiden zu können, angesehen werden und ist definiert als Quotient aus den Retentionsfaktoren bzw. Nettoretentionszeiten zweier Analyten (**Gleichung 5**):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'}$$

Gleichung 5: Definition der Selektivität bzw. des Trennfaktors.

α : Trennfaktor, Selektivität

k_1 : Retentionsfaktor von Analyt 1

k_2 : Retentionsfaktor von Analyt 2

t_{R1}' : Nettoretentionszeit von Analyt 1 [min]

t_{R2}' : Nettoretentionszeit von Analyt 2 [min]

1.1.7 Bodenzahl und Trennstufenhöhe

Um die Effizienz von Säulen und Säulenmaterialien bei isokratischen Trennungen zu charakterisieren, verwendet man normalerweise Bodenhöhen und Bodenzahlen (**Gleichung 6**). Die Anzahl der theoretischen Böden hängt unmittelbar mit der Bodenhöhe H zusammen und ist definiert als:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Gleichung 6: Definition der Bodenzahl N.

- N: Bodenzahl
- H: Trennstufenhöhe [mm]
- L: Säulenlänge [mm]
- t_R : Gesamtretentionszeit [min]
- w_b : Peakbasisbreite in Zeiteinheiten [min]
- w_h : Peakhalbwertsbreite in Zeiteinheiten [min]

Wie aus **Gleichung 6** hervorgeht, hängen Säulenlänge, Retentionszeiten und Peakbreiten direkt von der Anzahl der Böden ab. Durch Verlängerung der Säule kann die Bodenzahl ebenso erhöht werden wie durch geringere Peakbreiten oder längere Retentionszeiten. Die Anzahl der Böden gibt man entweder bezogen auf eine Säule oder allgemein als Bodenzahl pro Meter an, um einen besseren Vergleich mit anderen, verschieden langen Säulen zu ermöglichen. Auch die Bodenhöhe H kann als quantitatives Maß für die Effizienz einer chromatographischen Säule angesehen werden. Sie wird definiert als (**Gleichung 7**):

$$H = \frac{L}{16} \left(\frac{w_b}{t_R} \right)^2 = \frac{L}{8 \cdot \ln(2)} \left(\frac{w_h}{t_R} \right)^2$$

Gleichung 7: Definition der Bodenhöhe H.

- H: Trennstufenhöhe [mm]
- L: Länge der Säule [mm]
- t_R : Gesamtretentionszeit [min]
- w_b : Peakbasisbreite in Zeiteinheiten [min]
- w_h : Peakhalbwertsbreite in Zeiteinheiten [min]

1.1.8 Auflösung

Die Auflösung ist die eigentliche Zielgröße im Rahmen vieler chromatographischer Trennungen. Als generelle Richtwerte für chromatographische Trennungen gelten Werte von $R \geq 1.5$ für quantitative Auswertungen sowie $R \geq 1.0$ für semi-quantitative Analysen (**Abbildung 2**).

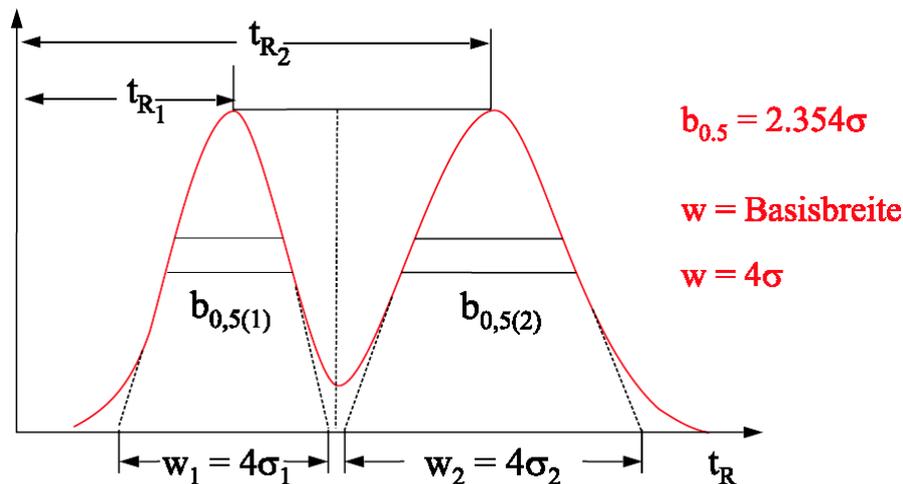


Abbildung 2: Graphische Darstellung der für die Berechnung der Auflösung benötigten Parameter.

Wichtig für Methodenentwicklungen ist es, einen geeigneten Kompromiss zwischen ausreichender Auflösung und akzeptabler Analysenzeit zu finden: Zu kleine Auflösungen ($R < 1.5$) sind zu gering für quantitative Analysen, wohingegen zu große Auflösungen insbesondere in der Hochdurchsatzanalytik eine unnötige Verlängerung der Analysenzeit ohne Informationsgewinn mit sich ziehen. Definiert ist die Auflösung als:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left[\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2} \right) \right]} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Gleichung 8: Definition der chromatographischen Auflösung R.

Wie **Gleichung 8** zu entnehmen ist, kann die Auflösung durch viele Parameter beeinflusst werden:

- Die Bodenzahl kann beispielsweise durch Verlängerung der Säule, Verwendung kleinerer Teilchen erhöht oder auch durch eine homogenere Säulenpackung erreicht werden.

- Durch Modifizierung und Variation der stationären bzw. auch mobilen Phase kann das Verhältnis der Retentionsfaktoren verändert werden, was ebenfalls einen Einfluss auf die Auflösung hat.
- Durch Variation der Laufmittelstärke oder die Verwendung anderer stationären Phasen kann die Auflösung ebenfalls beeinflusst werden.

1.1.9 Asymmetriefaktor

Abweichungen der realen Peakform von den idealen Gauß-Peaks werden durch den Asymmetriefaktor T beschrieben. Diese Abweichungen und Asymmetriephänomene können auf äußere Einflüsse zurückgeführt werden wie z. B. zu große säulenexterne Totvolumina, Säulenüberladung oder auch unerwünschte Sekundärwechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase. Man unterscheidet hierbei zwischen Tailing und Fronting, wobei der Asymmetriefaktor T definiert wird als Verhältnis der Peakbreiten vor bzw. nach dem gefälltten Lot vom Peakmaximum zur Basislinie (**Abbildung 3**):

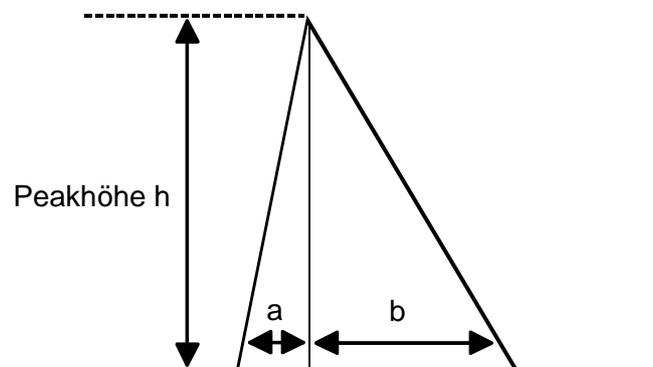


Abbildung 3: Definition des Asymmetriefaktors bei 10 % Peakhöhe.

Üblicherweise werden die Peakbreiten bei 10% oder auch bei 5% der Peakhöhe gemessen, wie es von der *United States Pharmacopeial Convention* (USP) empfohlen wird (**Gleichung 9**):

$$T_{USP} = \frac{a+b}{2a}$$

Gleichung 9: Bestimmung der Peaksymmetrie nach USP-Standard.

T_{USP} : Asymmetriefaktor nach Definition der *United States Pharmacopeial Convention*

a: Peakbreite vor dem Lot vom Peakmaximum auf die Basislinie [min]

b: Peakbreite hinter dem Lot vom Peakmaximum auf die Basislinie [min]

1.1.10 Bandenverbreiterung und die van-Deemter-Theorie

Effiziente chromatographische Trennungen beinhalten die Minimierung der Bandenverbreiterung der Peaks. Diese Bandenverbreiterung ist von mehreren Faktoren abhängig und wurde von *J. J. Van Deemter* im Jahr 1956 [2] durch die Van-Deemter-Gleichung beschrieben (**Gleichung 10**):

$$H = (2\lambda d_p) + (2\gamma D_M)/u + \left(\frac{\omega d_p^2}{D_M} \right) \cdot u + \left(\frac{c d_f^2}{D_S} \right) \cdot u$$

Gleichung 10: Van-Deemter-Gleichung.

H: Bodenhöhe [μm]

λ : Faktor für die statistische Unregelmäßigkeit der Packung

d_p : Teilchengröße [μm]

γ : Labyrinthfaktor der Porenkanäle

D_M : Diffusionskoeffizient des gelösten Analyten in der mobilen Phase [mm^2/s]

u: Lineargeschwindigkeit [mm/s]

ω, c : geometrische Faktoren

d_f : Filmdicke (Dicke der stationären Phase) [μm]

D_S : Diffusionskoeffizient des gelösten Analyten in der stationären Phase [mm^2/s]

Diese Gleichung kann zu einer vereinfachten Van-Deemter-Gleichung zusammengefasst werden, indem man die verschiedenen Summanden ordnet: Mit $(2\lambda d_p) = A$,

$(2\gamma D_M) = B$ und $\left(\frac{\omega d_p^2}{D_M}\right) + \left(\frac{cd_f^2}{D_s}\right) = C$ erhält man schließlich (**Gleichung 11**):

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Gleichung 11: Vereinfachte Van-Deemter-Gleichung.

- H: Bodenhöhe [μm]
- A: Streudiffusion (Eddy-Dispersion) [μm]
- B: Longitudinaldiffusion [$\mu\text{m mm/s}$]
- C: verzögerter Massentransfer [$\mu\text{m}/(\text{mm/s})$]
- u: Lineargeschwindigkeit [mm/s]

Abbildung 4 zeigt eine typische Van-Deemter-Kurve mit A-, B- und C-Term sowie der resultierenden Kurve $H = A + B/u + C \cdot u$:

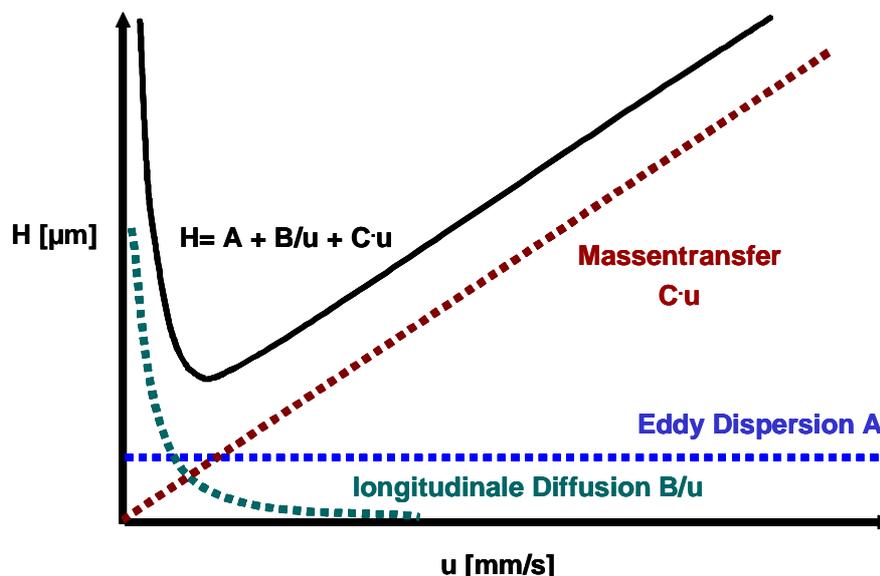


Abbildung 4: Klassische Van-Deemter-Kurve mit den drei für die Bandenverbreiterung relevanten Parameter Eddy Dispersion (Streudiffusion), Longitudinaldiffusion und Massentransfer.

Der A-Term (Eddy Diffusion) berücksichtigt die Tatsache, dass das Packungsbett in gepackten Säulen aufgrund der Inhomogenität der Teilchengrößen bzw. des

monolithischen Trennmediums unregelmäßig ist. Hieraus resultieren verschieden lange Wege, die ein Analytmolekül durch die Säule zurücklegen muss, was sich letztendlich in unerwünschter Bandenverbereiterung und dem damit verbundenen Verlust an Trenneffizienz äußert. Der A-Term kann möglichst klein gehalten werden, indem man ein homogenes Packungsbett und möglichst einheitliche Teilchengrößen bzw. ein möglichst homogenes monolithisches Trennmedium verwendet. Der B-Term der Van-Deemter-Gleichung berücksichtigt die Longitudinaldiffusion bedingt durch die Molekulardiffusion des Analyten während der Verweilzeit in der mobilen Phase. Aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen der Probezone und der reinen mobilen Phase kommt es zu einer Verdünnung der Probe, was zur Bandenverbreiterung führt. Der Anteil des B-Terms zur Bandenverbreiterung kann durch höhere Fließgeschwindigkeiten und der damit verbundenen kürzeren Verweilzeit reduziert werden. Der C-Term der Van-Deemter-Gleichung beschreibt den (verzögerten) Stoffaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase. Problematisch ist hierbei einerseits, dass die Moleküle derselben Spezies unterschiedlich weit in die stationäre Phase eintauchen und somit unterschiedlich lange Wege zurücklegen müssen. Andererseits müssen die Moleküle zur Einstellung des Gleichgewichts unterschiedliche lange Wege in der mobilen Phase zurücklegen. Im Vergleich zu gepackten Säulen haben monolithische Trennmedien den entscheidenden Vorteil, dass der Massentransfer durch konvektiven Fluss unterstützt wird und der diffusive Massentransfer auf relativ kurze Distanzen im Monolith-Skelett beschränkt ist.

1.2 (Ionenpaar-)Umkehrphasenchromatographie

In der Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC) erfolgt die chromatographische Trennung von eher apolaren Substanzen aufgrund von solvophoben Wechselwirkungen mit einer hydrophoben stationären Phase in einem polaren Medium. Als Phasenmaterialien verwendet man üblicherweise oberflächenmodifiziertes Kieselgel, welches mit hydrophoben Alkylketten (C_4 , C_8 , C_{18}) modifiziert wurde oder nativ hydrophobe Polymermaterialien wie Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymere. Die Elution der retardierten Analyten erfolgt durch Verwendung von polaren organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol, die dem schwachen Eluenten Wasser beigemischt werden. Durch Erhöhung des Organikanteils im Laufmittelgemisch wird die Desorption des Analyten

thermodynamisch begünstigt, wodurch die Elution des Analyten realisiert werden kann. Um den pH-Wert der Eluenten an die jeweiligen Trennprobleme anzupassen oder um beispielsweise bei der Trennung von Proteinen die Denaturierung zu erreichen, werden den Eluenten oftmals polare Säuren wie Phosphorsäure, Salzsäure oder Ameisensäure hinzugefügt. Hierbei ist allerdings auf die Detektionsmethode zu achten, da nicht alle organischen Säuren für die massenspektrometrische Detektion geeignet sind wie z. B. schwerflüchtige Säuren wie Schwefelsäure bzw. Phosphorsäure.

Verwendet man anstelle von polaren organischen Säuren andere Laufmitteladditive wie hydrophobe Säuren oder Basen, die längerkettige Alkylgruppen tragen, wie zum Beispiel Trifluoressigsäure oder Triethylammoniumacetat, liegt ein anderer chromatographischer Trennmodus vor, die Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie (IP-RP-HPLC). Hier erfolgt die Trennung der Analyten neben den solvophoben Wechselwirkungen auch aufgrund der Ladung: Die hydrophoben Gruppen der deprotonierten Säuren bzw. protonierten Basen (Amphiphile) adsorbieren an der apolaren stationären Phase, wodurch ein elektrisches Oberflächenpotential erzeugt wird [6]. Da die Konzentration der Ionenpaarbildner oftmals nicht hoch genug sind, um die stationäre Phase vollständig zu belegen, werden Peptide oder auch Proteine sowohl aufgrund elektrostatischer als auch solvophober Wechselwirkungen retardiert. [7]. **Abbildung 5** zeigt schematisch die solvophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen am Beispiel eines Peptids mit Trifluoressigsäure als Ionenpaarbildner. Sowohl RP- als auch IP-RP-HPLC sind die leistungsstärksten Trennmethoden in der Protein- und Peptidanalytik mit den besten Trenneffizienzen und höchsten Peakkapazitäten. Dies lässt sich unter anderem damit erklären, dass sich die Biomoleküle unter den denaturierenden Bedingungen (organische Lösungsmittel, starke Säuren oder Basen) entfalten und so keine Konformationsisomere mehr vorliegen. Außerdem werden durch das Auffalten der Biomoleküle Funktionalitäten im Molekül freigelegt, die im nativen Zustand nicht zugänglich sind und so am Trennmechanismus teilnehmen können. Darüber hinaus sind sowohl RP- als auch IP-RP-HPLC-Trennungen unter Verwendung von flüchtigen Laufmitteladditiven vollständig kompatibel mit der Massenspektrometrie.

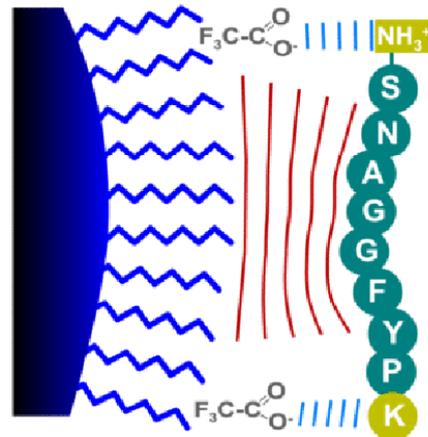


Abbildung 5: Schematische Darstellung des IP-RP-Mechanismus am Beispiel eines Peptids mit Trifluoressigsäure als Ionenpaarbildner mit solvophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen.

1.3 Micro/Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

1.3.1 Miniaturisierung in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Aufgrund der einfachen Handhabung und hohen Robustheit haben sich in der klassischen HPLC Säulen mit Innendurchmessern zwischen 2.0 und 4.6 mm in der Routineanalytik etabliert. Aber insbesondere in aktuellen Forschungsbereichen wie der Bioanalytik [8-11] sind miniaturisierte HPLC-Systeme unerlässlich. Einerseits stehen bei Proteomanalysen oder anderen Proben aus lebenden Organismen oftmals nur sehr geringe Probenmengen zu Verfügung; andererseits ist bei den in der Micro- und Nano-HPLC verwendeten Flussraten eine direkte Kopplung mit der Massenspektrometrie [12;13] ohne Split möglich. Die Anfänge der Miniaturisierung gehen bis in die 60er [14] und 70er Jahre zurück [15] und basieren auf der Verkleinerung der Säuleninnendurchmesser. Aber gemessen am aktuellen Stand der Technik stehen mittlerweile robuste Micro- und Nano-HPLC-Systeme zur Verfügung, obgleich hohe technische Anforderungen an Säulen, Pumpen, Injektionseinheiten und Detektoren gestellt werden müssen. Derzeit können pulsationsarme Flussraten im μl - bis nl -Bereich, präzise Gradientenabmischung und -formung sowie reproduzierbare Injektionsvolumina bis 20 nl ohne größere Probleme realisiert werden. Moderne Micro-HPLC-Systeme können Säuleninnendurchmesser bis 15 μm

handhaben [16-18]. Diese miniaturisierten HPLC-Systeme besitzen einige entscheidende Vorteile im Vergleich zu analytischen Systemen:

- Aus den üblichen Säulendimensionen in der Micro-HPLC resultiert ein reduzierter Verbrauch an stationärer und mobiler Phase.
- Aufgrund der geringen Flussraten besteht die Option zur splitlosen Kopplung mit der Massenspektrometrie [19].
- Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Systemen kann eine erhöhte Massenempfindlichkeit mit konzentrationsempfindlichen Detektoren realisiert werden.
- Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Systemen ist eine erhöhte Trenneffizienz möglich [20;21].

Die Verwendung von miniaturisierten Trennsystemen ist allerdings auch mit einigen Problemen verbunden: Die geringe Menge an stationärer Phase macht Kapillarsäulen äußerst anfällig für Volumen- und Massenüberladung der Säule, was mit der geringen Säulenbeladungskapazität einhergeht. Darüber hinaus wirken sich aufgrund der Verwendung äußerst kleiner Kapillarinne Durchmesser für die Verbindungen schon kleinste säulenexterne Totvolumina negativ auf die Trennleistung des Systems aus, und die Gefahr bzgl. verstopfter Kapillaren steigt.

Als Gehäuse für die miniaturisierten Trennsäulen haben sich amorphe Quarzkapillaren, die mit einem Polyimid-Coating überzogen sind, bewährt [22;23]. Einerseits zeichnen sich diese Kapillaren durch hohe Druckstabilität und einfache Handhabbarkeit aus; andererseits sind sie aufgrund der Polyimidschicht äußerst flexibel und eignen sich aufgrund ihrer relativ inerten Oberfläche für viele analytische Problemstellungen. Darüber hinaus sind die Quarzkapillaren in vielen Innen- und Außendurchmessern erhältlich und kostengünstig zu erwerben. **Abbildung 6** gibt einen kurzen Überblick über konventionelle Säulengrößen bis hin zu einer Kapillarsäule mit den Dimensionen einer Stecknadel:

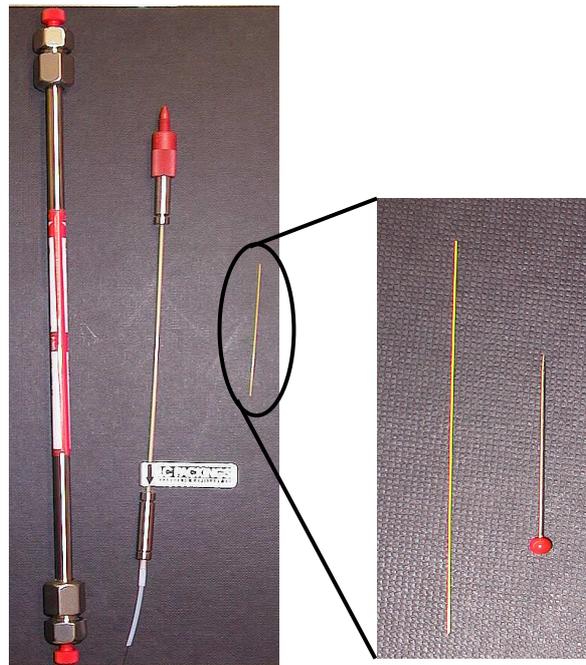


Abbildung 6: Vergleich einer konventionellen HPLC-Säule (links) mit miniaturisierten Säulen bis hin zu Kapillarsäulen in der Größe einer Stecknadel (rechts).

Generell können alle stationären Phasen, die auch in der konventionellen analytischen Hochleistungsflüssigchromatographie Verwendung finden, eingesetzt werden. Aber beim Packen der miniaturisierten Kapillarsäulen sind einige wichtige Faktoren zu beachten: Um das Packungsmaterial in der Kapillare zurückzuhalten, ist der Einsatz von kleinen Fritten an den Säulenenden unerlässlich. Das Einbauen dieser Fritten ist allerdings ein schlecht reproduzierbarer Syntheseschritt [24]; ferner können sie auch negative Effekte auf die Säulen-Performance haben: Adsorptionseffekte des Analyten an der Fritte und zusätzliche Dispersion in der Fritte können zu einer signifikanten Verschlechterung der Trenneffizienz führen [24]. Alternativen zur Verwendung von Fritten sind das Ausziehen der Kapillarenden, wodurch die Partikel durch den Keystone-Effekt in der Kapillare gehalten werden [25]. Aber auch diese Alternative zeichnet sich durch schlechte Reproduzierbarkeit aus. Dazu kommt die Tatsache, dass sich das Packen der Kapillarsäulen deutlich schwieriger gestaltet, als es bei konventionellen Säulen der Fall ist. Bei Kapillarsäulen verwendet man häufig das „Slurry“-Verfahren [26;27], bei dem die Partikel vor dem Packungsvorgang in einer Flüssigkeit suspendiert werden. Anschließend wird die Suspension unter Hochdruck in die Kapillare gespült. Aus diesen Gründen hat sich insbesondere im Bereich der Micro- und Nano-HPLC die Verwendung monolithischer Trennmedien hauptsächlich im Rahmen bioanalytischer Fragestellungen verbreitet, da hierbei auf Fritten verzichtet werden

kann, indem das monolithische Material kovalent mit der Kapillarrinnenwand verankert wird. Eine ausführliche Beschreibung der monolithischen Trennmedien findet sich in Abschnitt 2 dieses Kapitels.

Allgemein besitzen Microsäulen eine verbesserte Trennleistung im Vergleich zu herkömmlichen analytischen Säulen [20;21]: Zum einen ist wegen der geringen Säuleninnendurchmesser (500 bis 20 µm) eine homogenere Säulenpackung aufgrund der stabilisierenden Wirkung der Säulenwand über das gesamte Packungsbett möglich; zum anderen herrscht innerhalb der Säule eine geringere radiale Flussdispersion, was sich positiv auf die Trenneffizienz auswirkt. [20]

1.3.2 Instrumentelle Anforderungen an Micro-HPLC-Systeme und Downscaling

Ein typisches Micro- bzw. Nano-HPLC-System ist prinzipiell genauso wie eine konventionelle HPLC-Anlage aufgebaut und benötigt dementsprechend auch dieselben Komponenten: Gradientenpumpe, Injektor, Säulenofen und Detektor.

Jedoch müssen die miniaturisierten Systeme so konzipiert sein, dass jegliche säulenexterne Totvolumina minimiert wird, da sonst zusätzliche Bandenverbreiterungseffekte die Trenneffizienz verringern [28;29].

Daher müssen alle Volumina wie z. B. Injektor- Säulen- und Detektorvolumina durch den so genannten Downscaling-Faktor f angepasst werden (**Gleichung 12**):

$$f = \frac{d_{micro}^2}{d_{conv}^2}$$

Gleichung 12: Definition des Downscaling-Faktors f .

d_{micro} : Innendurchmesser der Microsäule [mm]

d_{conv} : Innendurchmesser der konventionellen Säule [mm]

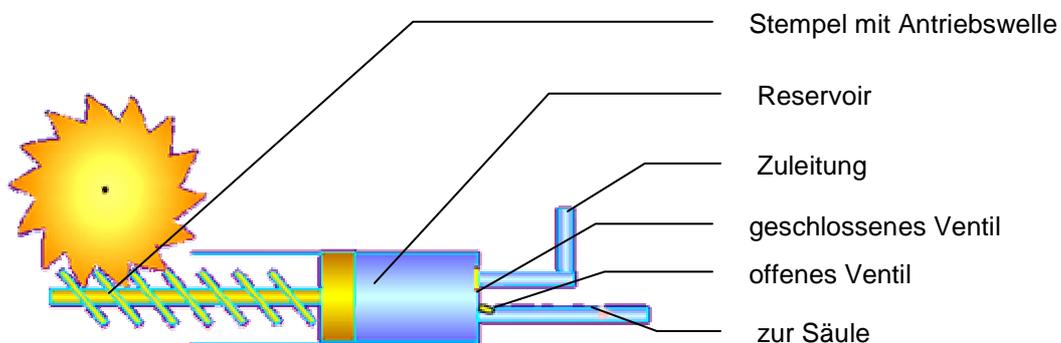
Tabelle 1 beinhaltet einige Beispiele, ausgehend von einer konventionellen 4.6 mm I.D. Säule bzgl. der Anpassung von Injektionsvolumen, Detektionsvolumen und Flussrate, was für eine optimale Performance wichtig ist [26;30-33]:

Tabelle 1: Parameteranpassung und Downscaling-Faktor für diverse Säulen-Innendurchmesser.

Innendurchmesser der Säule	Downscaling-Faktor f	Injektionsvolumen	Detektionsvolumen	Flussrate
4.6 mm	1	5 μ l	10 μ l	1 ml/min
1.0 mm	1/21	240 nl	75 nl	47 μ l/min
200 μ m	1/529	9.5 nl	19 nl	1.8 μ l/min
100 μ m	1/2116	2.4 nl	4.7 nl	470 nl/min
50 μ m	1/8464	0.6 nl	1.2 nl	120 nl/min

Wie aus **Tabelle 1** ersichtlich wird, müssen die für Micro- und Nano-Systeme verwendeten Pumpen konstante Flussraten im μ l/min- bzw. nl/min-Bereich pulsationsfrei fördern können. Darüber hinaus muss die Pumpe ein geringes Dwell-Volumen sowie eine exakte Gradientenformierung gewährleisten. Zur Realisierung dieser Vorgaben wurden mehrere technische Ansätze entwickelt

Die erste Variante beinhaltet die Verwendung von Micro-Spritzenpumpen [34] mit miniaturisierten Mischkammern, Ventilen und Pumpenköpfen. Diese Art von Pumpen zeichnet sich durch einen geringen Eluentenverbrauch sowie einer konstanten Flussrate unabhängig vom Druckabfall aus. Außerdem kann die Flussrate durch die Säule direkt eingestellt werden ohne die Verwendung eines Splitsystems. Nachteilig wirken sich dagegen die Probleme der Micro-Spritzenpumpen bei geringen Flüssen aus: Sowohl das Einstellen eines konstanten Flusses als auch die Effizienz der Gradientenmischung sind bei sehr kleinen Flussraten sind bei diesen Pumpentypen nur schwer zu realisieren. **Abbildung 7** zeigt den schematischen Aufbau und die Funktionsweise einer Spritzenpumpe:

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung einer Spritzenpumpe.

Eine weitere Methode zur Realisierung kleinster Flussraten besteht in der Verwendung von konventionellen Gradientenpumpen mit zusätzlichem Splitsystem. Hierbei wird der Primärfluss von der Pumpe mittels T-Stück und einer Restriktionskapillare (**Abbildung 8**) in einen geringeren Sekundärfluss gesplittet ^[33]. Dabei ist der Gegendruck, welcher durch die Restriktionskapillare erzeugt wird, laut dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz abhängig von der Länge und dem Innenradius der Kapillare, womit eine genaue Einstellung der Flussrate über das Splitverhältnis möglich ist.

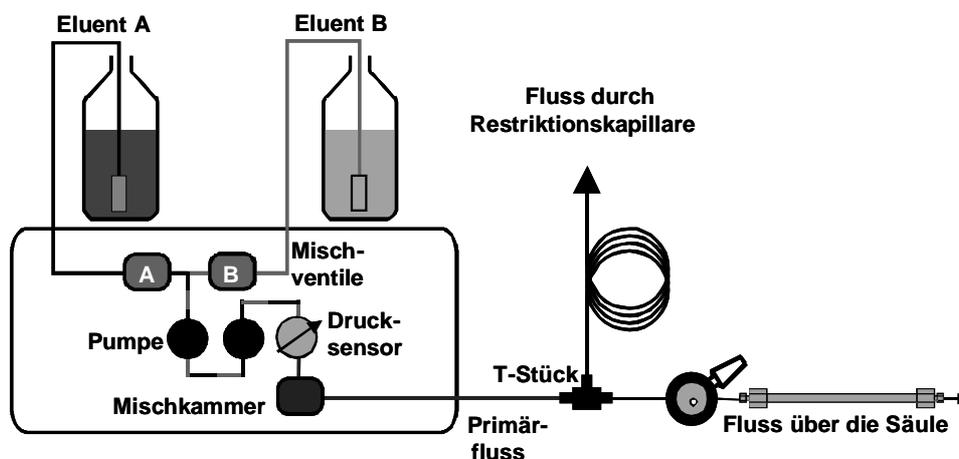


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage mit Splitsystem zur Generierung von kleinen Flussraten.

Diese Methode zur Generierung kleiner Flussraten hat allerdings einige Nachteile im Vergleich zu den miniaturisierten Pumpenmodulen: Zum einen hat man einen erhöhten Eluentenverbrauch, zum anderen hängt das Splitverhältnis direkt von der Säulenpermeabilität ab. Die Vorteile der Splitsysteme liegen darin, dass äußerst robuste und zuverlässige, konventionelle HPLC-Pumpen eingesetzt werden können, die sowohl eine exakte Gradientenabmischung als auch konstante Flüsse gewährleisten. Um Fluktuationen der Flussrate aufgrund von Säulenpermeabilitätsänderungen zu kompensieren, gibt es weitere Methoden und Ansätze, die von den prominentesten Herstellerfirmen bereits in ihrem HPLC-System eingesetzt werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um elektronisch regulierte Splitsysteme, wie sie von der Firma Agilent (Heilbronn, Deutschland), verwendet werden (**Abbildung 9**):

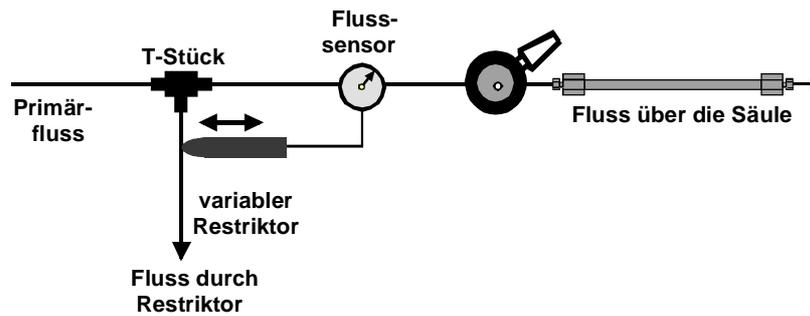


Abbildung 9: Elektronisch reguliertes Splitsystem mit Fluss-Sensor und variablem Restriktor.

Mit Hilfe des variablen Restriktors können Fluktuationen des Druckabfalls aufgrund von Säulenpermeabilitätsänderungen durch Änderung des Splitverhältnisses kompensiert werden. Die Aufgabe des vor die Säule installierten Flusssensors liegt darin, dass dort die Permeabilitätsänderungen der Säule registriert und anschließend an den variablen Restriktor weitergeleitet werden, der die Änderungen kompensieren kann. Eine andere Methode zur Kompensation von Säulenpermeabilitätsänderungen besteht in der Verwendung einer zweiten Restriktionskapillare, die vor der Trennsäule installiert wird (**Abbildung 10**):

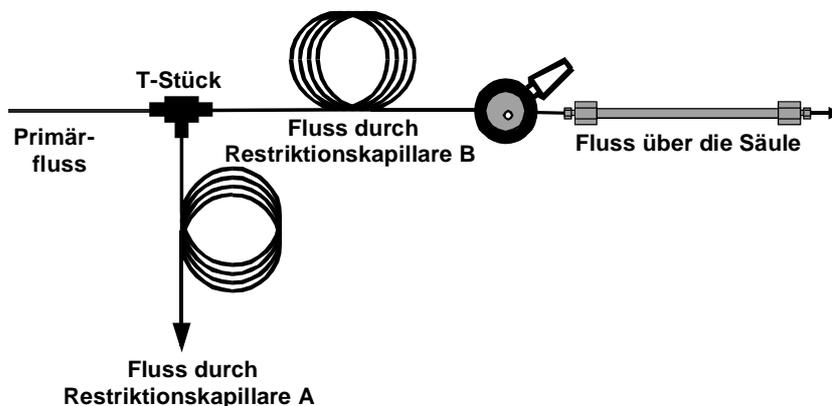


Abbildung 10: Splitsystem mit zwei Restriktionskapillaren (passives Splitsystem).

Durch die zweite Restriktionskapillare vor der Säule können, allerdings nur in begrenztem Maße, Änderungen der Säulenpermeabilität kompensiert werden und gewährleisten bis zu einem bestimmten zusätzlichen Druckabfall über die Säule ein konstantes Splitverhältnis. Diese Methode wurde bei den älteren „UltiMate“-Micro-HPLC-Systemen der Firma LC Packings – A Dionex Company (heute: Dionex Benelux, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Der Nachfolger dieses Systems, das „UltiMate 3000“-Nano-HPLC-System (Dionex Benelux, Niederlande), verwendet ein ebenfalls elektronisch reguliertes Splitsystem, das nach dem Prinzip einer Wheatstoneschen Brückenschaltung funktioniert.

Hierbei werden Säulenpermeabilitätsänderungen über eine Flussbrücke registriert und über einen variablen Restriktor kompensiert (**Abbildung 11**):

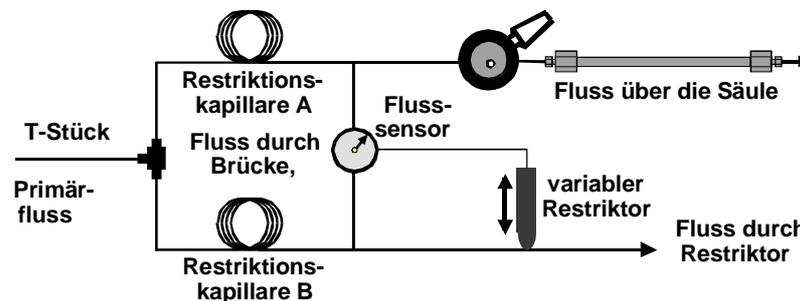


Abbildung 11: Laufmittelsplitting im „Ultimate 3000“-Nano-HPLC-System der Firma Dionex Benelux.

1.4 Detektionsmethoden für die Micro- und Nano-HPLC

1.4.1 UV-Detektion

In der Micro-HPLC werden neben der massenspektrometrischen Detektion vor allem auch Fluoreszenz- und UV-Detektion als häufigste Methoden eingesetzt. Damit die Möglichkeit für eine effiziente Detektion von schmalen Peakbanden gegeben ist, muss das Detektorzellvolumen gemäß dem Downscaling-Faktor angepasst werden, da zu große Detektorzellvolumina infolge des großen Totvolumens den Beitrag zur Bandenverbreiterung signifikant erhöhen. Als Faustregel gilt: Das Detektorzellvolumen sollte ein Zehntel des kleinsten Peakvolumens im Chromatogramm nicht überschreiten. Bei der UV-Detektion, die auf der Messung der Lichtabsorption der Probenkomponenten bei einer bestimmten Wellenlänge beruht, wird ein monochromatischer Lichtstrahl mittels Strahlenteiler in zwei gleiche Lichtstrahlen zerlegt. Einer der Lichtstrahlen trifft auf die Referenzphotodiode; der andere Strahl auf die Messphotodiode. Durch dieses Zweistrahl-Prinzip ist es möglich, Intensitätsunterschiede der Lichtquelle und damit auch das Rauschen zu minimieren. Das eigentliche Detektorsignal resultiert somit daraus, dass die Probenbestandteile und der reine Eluent unterschiedliche Lichtabsorptionen zeigen (**Abbildung 12**).

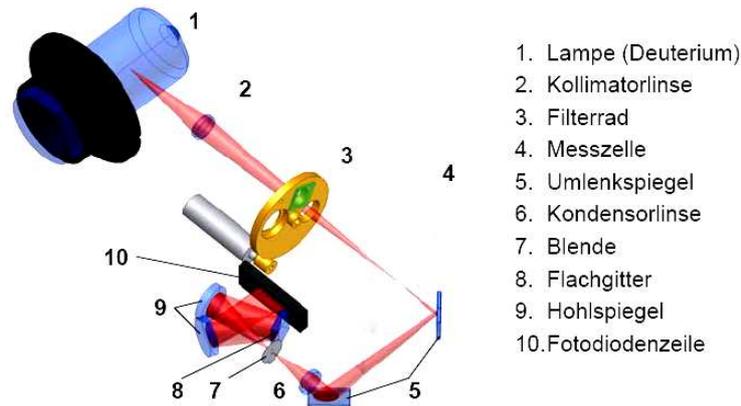


Abbildung 12: Schematische Darstellung und Funktionsweise eines UV/Vis-Detektors.

Voraussetzung zur UV-Detektion sind Probenmoleküle, die ein Chromophor besitzen und im UV/Vis-Bereich absorbieren (Doppelbindungen, aromatische Gruppen etc.). Eine weitere Herausforderung für die Micro-HPLC stellen die Flusszellen dar, die zur UV/Vis-Detektion benötigt werden. In der Vergangenheit verwendete man hierzu häufig amorphe Quarzkapillaren, bei denen ein UV/Vis-transparentes Detektorfenster durch Abätzen oder Abschmelzen der Polyimidschicht generiert wurde (**Abbildung 13A**). Die Messung der Absorption erfolgte dabei senkrecht zur Flussrichtung. Eine Vergrößerung des Lichtwegs erfolgte durch die Entwicklung von Bubble-Zellen [²⁴] (**Abbildung 13B**).

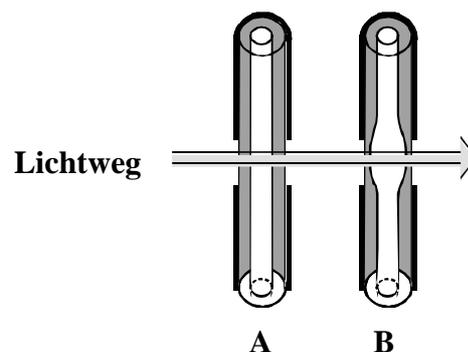


Abbildung 13: Kapillare mit UV/Vis-Fenster (A) und Bubble-Zelle (B).

Die Bubble-Zelle kann beispielsweise durch Verwendung von konzentrierter Flusssäure hergestellt werden. Problematisch hierbei ist allerdings der immer noch relativ kurze Lichtweg und die damit verbundene geringe Empfindlichkeit, wodurch neue Ansätze wie die Verwendung von Doppel-L- oder Z-Zellen entwickelt wurden

[³⁵], um den Lichtweg zu verlängern und damit die Empfindlichkeit zu steigern (**Abbildung 14**):

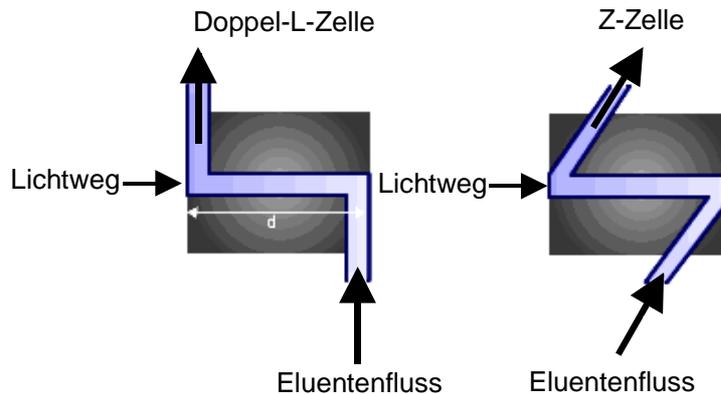


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Doppel-L- (links) und einer Z-Zelle (rechts).

Dieses Zelldesign wird erhalten, indem man einen größeren Teil der Polyimidschicht der Quarzkapillare ablöst und dann die Kapillare in Doppel-L- oder Z-Form biegt. Hierdurch lassen sich Lichtwege von 3-30 mm realisieren, was einer deutlich verbesserten Empfindlichkeit im Vergleich zur Bubble-Zelle entspricht. Als Alternative zur UV/Vis-Detektion kann die Fluoreszenzdetektion angesehen werden, die für die Micro-HPLC prädestiniert ist. Diese Detektionsmethode ist zwar deutlich empfindlicher als die UV/Vis-Detektion, aber nachteilig ist die Tatsache, dass nur fluoreszierende Moleküle damit erfasst werden können. Insbesondere im Bereich der Bioanalytik heißt dies, dass Proteine und Peptide häufig derivatisiert werden müssen, um mittels Fluoreszenzdetektion [³⁶] erfasst zu werden, da von nur wenigen Proteinen oder Peptiden nativ fluoresziert.

1.4.2 Massenspektrometrie

1.4.2.1 Einleitung

Eine weitere empfindliche und nachweisstarke physikalische Detektionsmethode, die in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer größere Bedeutung auch im Bereich der Bioanalytik gefunden hat, ist die Massenspektrometrie (MS), bei der Nachweisgrenzen bis zum Zeptomol-Bereich möglich sind [³⁷]. Darüber hinaus ergibt sich ein hoher Informationsgehalt aus den massenspektrometrischen Messungen, wobei neben den molekularen Massen zusätzliche Hinweise auf die Struktur der Analyten erhalten werden können. Die Verwendung von Massenspektrometern in der Bioanalytik war jedoch lange Zeit nur schlecht realisierbar, da keine adäquaten

Ionisationsmethoden für große und polare Biopolymere zur Verfügung standen. Abhilfe schafften hierbei die Ionisierungstechniken von den Arbeitsgruppen von *Hillenkamp* [38] und *Dole* [39]. *Hillenkamp et al.* entwickelten die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI), wohingegen *Dole et al.* das Prinzip der Elektrospray-Ionisation (ESI) einführten. Beide Ionisierungsmethoden zeichnen sich im Gegensatz zu den klassischen Methoden wie der Elektronenstoß-Ionisation (EI) vor allem durch ihre schonenden Ionisationstechniken aus, welche es normalerweise erlauben, die Probenmoleküle auch nach der Ionisierung noch als intakte, unfragmentierte Moleküle zu analysieren. Fragmentiert der Analyt zu stark, wird die direkte Identifizierung des Probenmoleküls erschwert, da das Signal des unfragmentierten Molekülions oft nur noch sehr schwach bzw. gar nicht mehr vorhanden ist. Ein Massenspektrometer besteht im Allgemeinen aus folgenden Teilen (**Abbildung 15**):

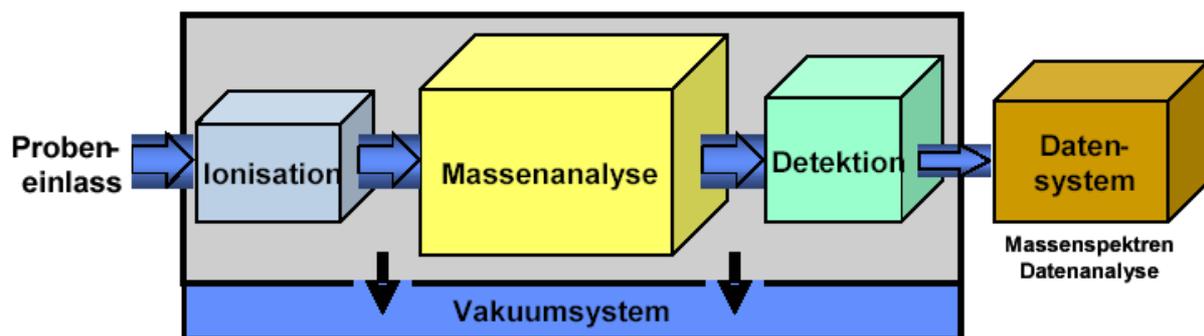


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers.

Da im Rahmen dieser Dissertation ausschließlich die Elektrospray-Ionisation verwendet wurde, wird in den folgenden Kapiteln hauptsächlich auf das Prinzip dieser Ionisationsmethode näher eingegangen.

1.4.2.2 Elektrospray-Ionisation

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation wurde bereits in den 70er Jahren von *Dole et al.* [39] beschrieben. Dabei gelang es *Dole*, freie gasförmige Ionen von hochmolekularen Substanzen zu erzeugen, die allerdings nur indirekt nachgewiesen werden konnten. Eine Weiterentwicklung hierzu stellten die Arbeiten von *Fenn et al.* dar, welche erstmals das Prinzip der Elektrospray-Ionisation mit einem Quadrupol-Massenanalysator zu koppeln [40]. Ab diesem Zeitpunkt hat sich die Elektrospray-

Massenspektrometrie immer weiter verbreitet und stellt in der heutigen Zeit eine der am häufigsten verwendeten Ionisationstechniken neben MALDI dar und wurde auch insbesondere im Bereich der Bioanalytik etabliert.

Das Prinzip der Elektrospray-Ionisation beruht auf der kontinuierlichen Verneblung der gelösten Probenmoleküle in einem elektrostatischen Feld, welches zwischen der Nadelspitze des Sprayers und der am Eingang des Massenspektrometers befindlichen Gegenelektrode durch Anlegen einer Potentialdifferenz (meist zwischen 1 und 5 kV) erzeugt wird (**Abbildung 16**). Durch diese Potentialdifferenz kommt es an der Nadel zur Elektrolyse der Lösung, was zur Ausbildung von Überschussladungen führt. Übertreffen die elektrostatische Anziehung der Gegenelektrode und die gegenseitige Abstoßung der gleichgeladenen Ionen die Oberflächenspannung der Analytlösung, bildet sich der so genannte Taylor-Konus (Taylor-Kegel) [41]. Aus diesem Konus tritt ein dünnes Flüssigkeitsfilament aus, das anschließend in geladene Tröpfchen zerfällt. Bei der Wanderung zur Gegenelektrode kommt zur sukzessiven Verdampfung des Lösungsmittels, was in einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche resultiert.

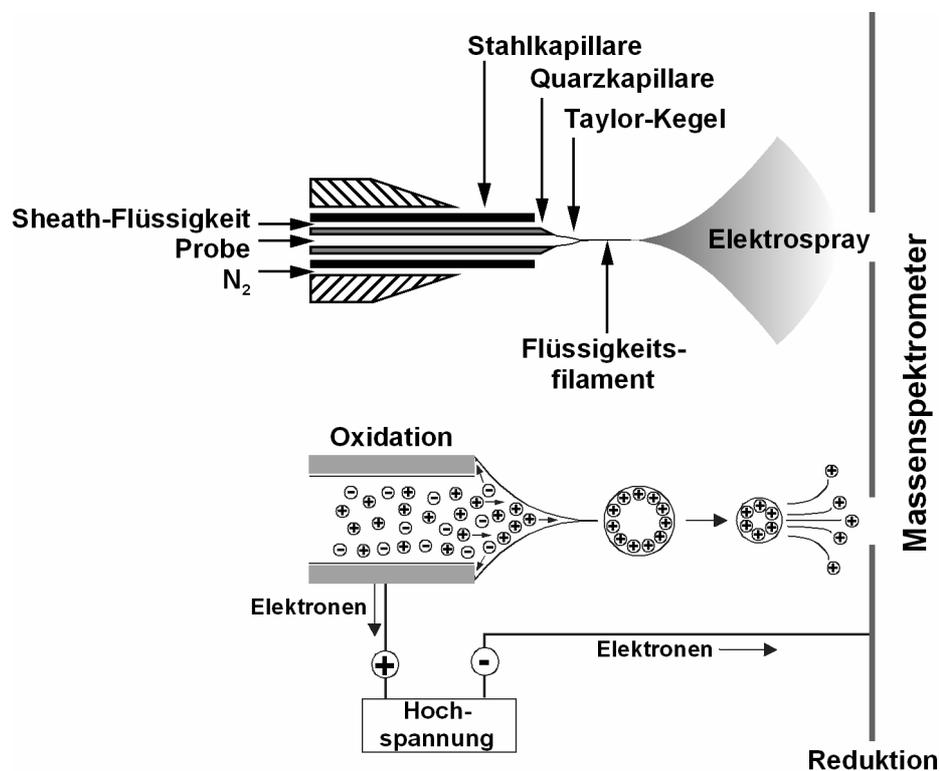


Abbildung 16: Prinzip der Elektrospray-Ionisationstechnik.

Ab einer gewissen Grenze, der so genannten Rayleigh-Grenze, dominiert schließlich die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung, und die Tropfen zerfallen in noch kleinere Tropfen ^[42]. Diesen Vorgang bezeichnet man als Coulomb-Explosionen ^[42] am Rayleigh-Limit. Gemäß der Rayleigh-Gleichung (**Gleichung 12**) ist die maximale Ladung eines sphärischen Flüssigkeitsteilchens abhängig von folgenden Parametern:

$$Q^2 = 8\pi\epsilon_0\gamma d^3$$

Gleichung 12: Rayleigh-Gleichung zur Beschreibung der maximalen Ladung eines sphärischen Flüssigkeitsteilchens.

- Q: maximale Ladung [C]
 ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit [C²/(J*m)]
 γ : Oberflächenspannung [Nm⁻¹]
 d: Durchmesser des sphärischen Partikels [m]

Diese Explosionen wiederholen sich mehrmals, bis nur noch sehr kleine Tröpfchen vorliegen. Aufgrund des angelegten elektrischen Feldes wird die aus der Kapillare strömende Flüssigkeit vernebelt, und die in der Lösung enthaltenen Probenmoleküle werden entsprechend der Polarität der Kapillarspitze mittels positiver oder negativer Überschussladung ionisiert. Abschließend erreichen die Ionen durch eine Öffnung in der Gegenelektrode den Massenanalysator, wo sie über ihr Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) selektiert werden. Die Bildung der gasförmigen Ionen kann hierbei mit zwei verschiedenen Modellen beschrieben werden:

- Das von *Dole et al.* eingeführte „Charged Residue“-Modell ^[39] geht davon aus, dass die Tröpfchen solange schrumpfen (bis auf eine Größe von 1 nm), bis nur noch ein einziges Ion in einem Tröpfchen vorhanden ist.
- Das Ionen-Evaporationsmodell hingegen ^[43] nimmt an, dass Ionen durch die Coulomb-Abstoßung aus der Oberfläche der Tröpfchen freigesetzt werden.

In der Praxis wird zur pneumatischen Unterstützung des Verneblungsprozesses der Flüssigkeit meist noch ein Gasstrom (z.B. Stickstoff) eingesetzt, der entweder in entgegengesetzter Richtung zum Spray fließt bzw. konzentrisch-gleichgerichtet ist.

1.4.2.3 Massenanalyse

Im Anschluss an die Ionisation werden die gasförmigen Analytionen über eine Ionenoptik, welche die Ionen fokussiert sowie Neutralteilchen abscheidet, in den Massenanalysator transportiert. Der Transport wird hierbei in der Ionenoptik über verschiedene Potentialdifferenzen realisiert: Durch immer kleiner werdende Potentialdifferenzen sowie stufenweise verstärktes Vakuum wird ein kontinuierlicher Ionenstrom in den Massenanalysator gewährleistet. Darüber hinaus werden die Potentialdifferenzen an einer Reihe von Multipolen und Linsen angelegt, um die kinetische Energie gleichartiger Ionen zu vereinheitlichen sowie die Geschwindigkeit der Ionen zu erniedrigen oder zu erhöhen. Die anschließende Massenanalyse kann auf mehrere Arten realisiert werden. Im Rahmen der ESI-Massenspektrometrie werden vor allem folgende Massenanalysatoren eingesetzt:

Tabelle 2: Übersicht über Massenanalysatoren.

Massen-analysator	Massen-genauigkeit	Massen-bereich	Empfindlichkeit	Auflösung	Kostenfaktor
Quadrupol	mittel	klein	mittel	mittel	vergleichsweise gering
Ionenfalle	hoch	variabel (mittel)	hoch	mittel	mittel
Flugzeit	hoch	variabel (mittel)	hoch	hoch	hoch
Orbitrap	hoch	klein	hoch	hoch	sehr hoch

Allen Massenanalysatoren gemeinsam ist die Selektion der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Dies kann je nach Bauweise auf vielfache Weise erfolgen, was in unterschiedlicher Leistung und unterschiedlichen Kosten resultiert. Quadrupol-Massenanalysatoren sind vergleichmäßig günstig, aber reichen in Bezug auf Empfindlichkeiten und Massengenauigkeiten nicht an komplexere Systeme wie Flugzeit-Massenspektrometer oder die neue Technik der Orbitrap (siehe **Kapitel 1.4.2.5**) heran. Es gibt noch eine Vielzahl an weiteren Massenanalysatoren wie z.B.

Sektorfeld- oder Fourier-Transformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometern, aber da im Rahmen dieser Dissertation ausschließlich Flugzeit-, Ionenfallen- und Orbitrap-Massenanalytoren verwendet wurden, werden nur diese in den nächsten Kapiteln erläutert.

1.4.2.4 Flugzeit-Massenspektrometrie

Die Flugzeit-Massenspektrometrie basiert auf der Messung der Zeit, welche die Ionen mit gleicher kinetischer Energie zur Überwindung einer definierten Strecke im feldfreien Hochvakuum benötigen. Dabei ist die Driftdauer proportional zu ihrem m/z-Verhältnis. Je größer die Ionen sind, desto mehr Zeit benötigen sie für die Strecke. Der Zusammenhang zwischen m/z-Verhältnis und Flugzeit ist hierbei durch folgende Gleichung gegeben (**Gleichung 13**):

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Gleichung 13: Mathematischer Zusammenhang zwischen m/z-Verhältnis und Flugzeit.

- z: Ladung [C]
- m: Masse des Ions [kg]
- U: Beschleunigungsspannung [V]
- L: Länge der Driftstrecke [m]
- t: Driftzeit [s]

Insgesamt werden alle Ionen gleicher Ladung auf dieselbe kinetische Energie beschleunigt. Der schematische Aufbau eines Flugzeit-Massenspektrometers kann **Abbildung 17** entnommen werden. Nach der Ionisierung der Probenmoleküle wird die kinetische Energie der Ionen am Beschleuniger durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf wenige keV angehoben. Dies ermöglicht den Übergang der Analytione von der Ionenoptik in das eigentliche Flugrohr. Die Ionen durchfliegen das Rohr, bis sie schließlich auf den Detektor auftreffen. Ionen mit unterschiedlichen m/z-Verhältnissen, aber gleicher kinetischer Energie besitzen unterschiedliche Geschwindigkeiten, wodurch Ionen mit kleinen m/z-Verhältnissen eine höhere Geschwindigkeit haben, demnach schneller die Flugstrecke durchqueren und damit zuerst detektiert werden. Wird wie in **Abbildung 17** ein Reflektor verwendet, ermöglicht dieser die Kompensation von Flugzeitvarianzen bei Ionen mit gleichem

m/z-Verhältnis: Wenn Ionen beispielsweise identische m/z-Werte besitzen, aber unterschiedlich stark angeregt wurden, resultiert dies in unterschiedlichen Flugzeiten. Dies kann durch den Reflektor kompensiert werden, da dort die Ionen unterschiedlich tief eindringen: Ionen mit höherer Energie dringen tiefer in das Reflektorfeld ein, wodurch sie eine längere Strecke zurücklegen wohingegen Ionen mit geringerer Energie eine kürzere Flugstrecke zurücklegen. Dies ermöglicht die zeitgleiche und energieunabhängige Detektion von Ionen mit gleichem m/z-Verhältnis. Flugzeit-Massenspektrometer arbeiten im Gegensatz zu vielen anderen Massenspektrometern nicht als Massenfilter, da alle Ionen in einem sehr kleinen Zeitfenster im Mikrosekunden-Bereich gemessen werden können. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Analytionen simultan beschleunigt werden, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Detektor ankommen. Dadurch werden sehr kurze Scanraten erreicht, da man nicht den gesamten Massenbereich scannen muss und die verschiedenen m/z-Verhältnisse nacheinander detektieren kann. Aktuell sind Massenbestimmungen mit Flugzeit-Massenspektrometern wie dem MaXis-ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) mit Genauigkeiten bis in den sub-ppm Bereich (600-800 ppb) realisierbar. Neben der kurzen Analysendauer und den hervorragenden Massengenauigkeiten besteht ein weiterer Vorteil der Flugzeit-Massenspektrometer darin, dass Auflösungen bis zu 60,000 möglich sind. Darüber hinaus decken Flugzeit-Massenspektrometer einen großen Massenbereich von etwa 50 bis 20,000 m/z ab.

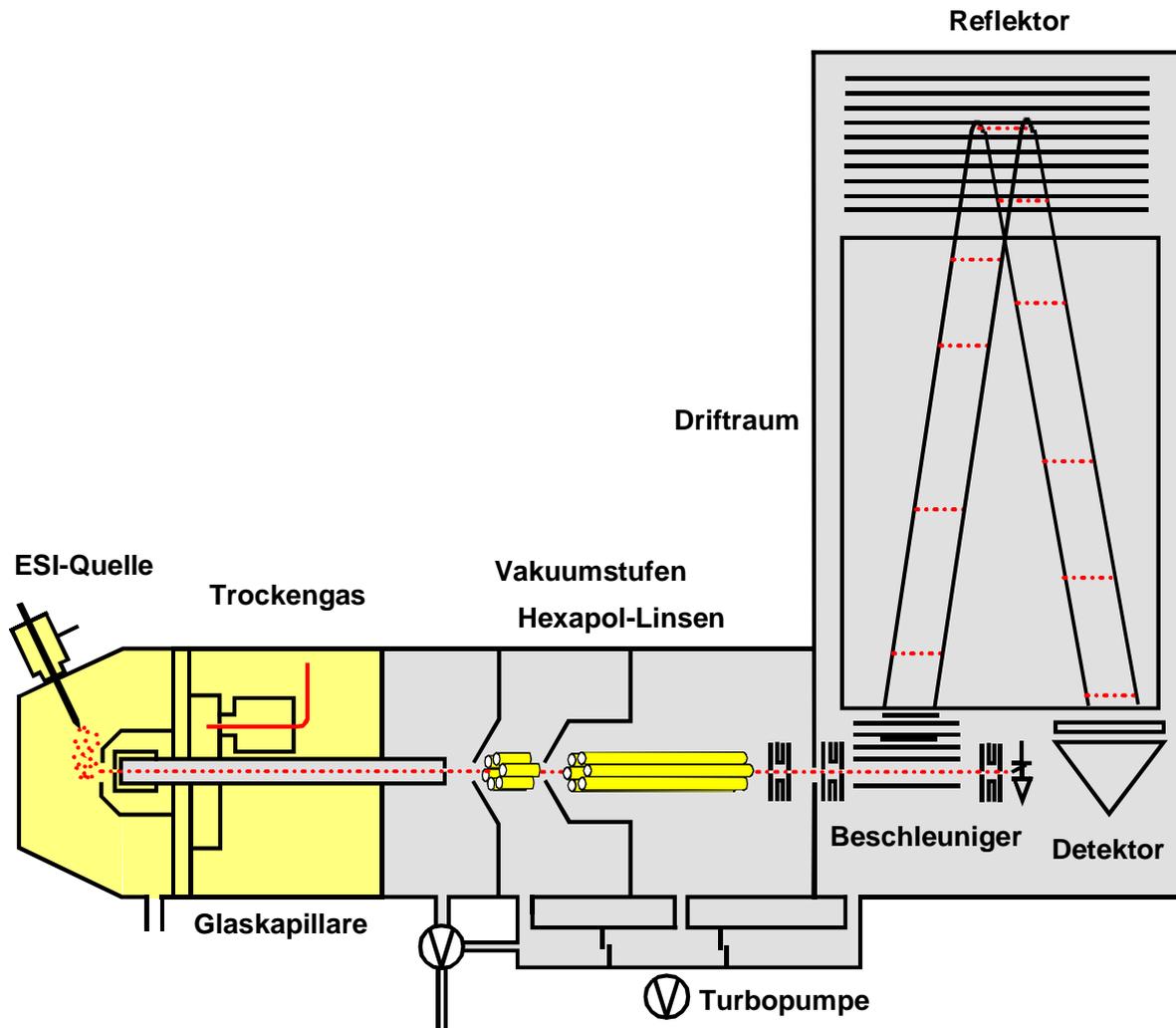


Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines Flugzeit-Massenspektrometers mit Reflektor.

Normalerweise ist ein Flugzeit-Massenspektrometer in mehrere Vakuumbereiche unterteilt: Im Bereich der Ionenquelle und der Glaskapillare herrscht Normaldruck. Danach wird die erste Vorvakuumstufe durch eine Vakuumpumpe am Ausgang der Glaskapillare generiert, wo ein Vakuum von 2-3 mbar herrscht. Die restlichen drei Vakuumstufen werden durch eine weitere Vakuumpumpe (Turbopumpe) erzeugt: Am ersten Hexapol herrscht ein Vakuum von ungefähr 10^{-2} mbar, am zweiten Hexapol wird ein Vakuum von ca. 10^{-4} mbar erreicht. Die letzte Vakuumstufe stellt das Flugrohr da, welches unter einem Druck von ca. 10^{-7} mbar steht.

1.4.2.5 Ionenfallen-Massenspektrometrie

Das Prinzip der Ionenfallen-Massenspektrometrie beruht auf dem Einfangen von Ionen mit Hilfe eines elektrischen Feldes, innerhalb dessen sich die generierten Ionen auf stabilen Bahnen bewegen. Wird eine Änderung des elektrischen Feldes

realisiert, können die Ionen selektiv nach ihrer Masse aus der Ionenfalle ejiziert und anschließend detektiert werden. Der Hauptunterschied zum Quadrupol-Massenanalysator, wo je nach angelegtem Potential nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Massenanalysator passieren, liegt darin, dass in der Ionenfalle erst alle Ionen eingefangen und erst im Anschluss selektiv nach ihrem m/z -Verhältnis aus der Ionenfalle zum Detektor ejiziert werden. Der typische Aufbau eines linearen Ionenfallen-Massenspektrometers ist in **Abbildung 18** dargestellt:

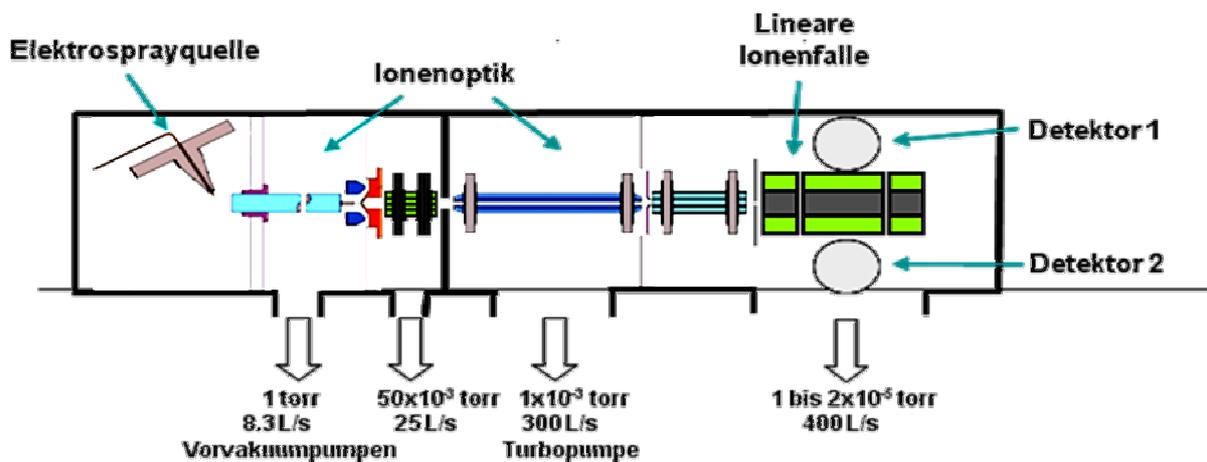


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines linearen Ionenfallen-Massenspektrometers mit ESI-Quelle.

Da an beiden Seiten der Ionenfalle Detektoren angebracht sind, kann die Detektion sowie die (simultan?) Darstellung aller ejizierter Ionen realisiert werden. Dies resultiert in einer signifikanten Steigerung der Empfindlichkeit im Vergleich zu älteren Geräten mit nur einem Detektor, bei denen 50 % der Ionen nicht detektiert werden aufgrund des Detektordesigns.

Unabhängig vom Ionenfallenmodell können die zur Etablierung stabiler Flugbahnen nötigen Spannungen durch die Mathieuschen Bewegungsgleichungen berechnet werden ^[44;45]

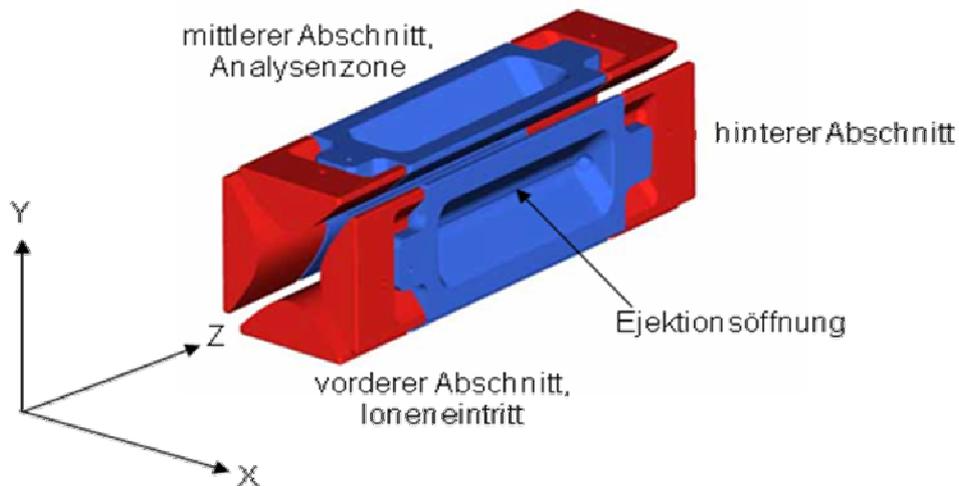


Abbildung 19: Aufbau der linearen Ionenfalle des LTQ-XL Massenanalysators.

Zur Ejektion wird eine in X-Richtung wirkende, definiert steigende Resonanzfrequenz angelegt. Hierdurch wird den Ionen kinetische Energie zugeführt und die Ionenflugbahn destabilisiert, wodurch sie die Ionenfalle durch die Ejektionsöffnungen verlassen können. Durch Anlegen eines Grundpotentials kann einer Bewegung in Y-Richtung entgegengewirkt werden (**Abbildung 19**). Zur Etablierung stabiler Flugbahnen sind gewisse Spannungswerte notwendig, die über die Mathieuschen Bewegungsgleichungen berechnet werden können [46]. In der Ionenfalle selbst wird die kinetische Energie der eingefangenen Ionen mittels Helium durch leichte, nicht-fragmentierende Stöße verlangsamt. Das Einfangen der Ionen benötigt pro Messzyklus eine definierte Injektionszeit, die häufig zwischen 0.1 und 100 ms beträgt. Hierbei ist die Injektionszeit der Ionen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da die Injektionszeit im Rahmen eines massenspektrometrischen Analysenzyklus einer Ionenfalle der zeitlich am längsten dauernde Schritt ist. Die analytische Zyklusdauer in einer Ionenfalle besteht prinzipiell aus mehreren Schritten (**Abbildung 20**):

- ACG
- Ionen-Injektion
- Isolierung und Aktivierung der Ionen in der Falle
- Scannen der Ionen (Massenanalyse)

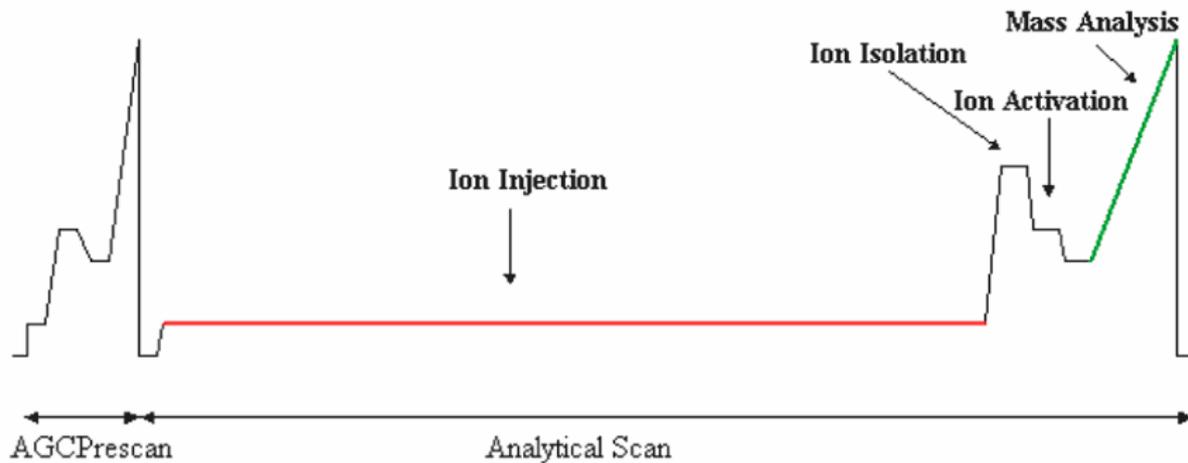


Abbildung 20: Typischer Analysenzyklus eines Ionenfallenmassenspektrometers; Bild entnommen aus Thermo Fisher Product Support Bulletin, PSB 119, Mass Spectrometry.

Durch Veränderung der entsprechenden Potentiale in der Ionenoptik wird die Ionenfalle „geschlossen“ und ein weiterer Transfer von Ionen entgegengewirkt. Dies hat eine definierte Füllung der Ionenfalle zur Folge, so dass es weder zu einer Überfüllung noch zu Ungenauigkeiten in der Detektion durch nachfolgende Ionen kommen kann.

1.4.2.6 Orbitrap-Massenanalysator

Eine neue Generation von Massenanalysatoren (**Abbildung 21**) stellt die sogenannte Orbitrap dar, die von Alexander Makarov ^[47] entwickelt wurde. Die Detektion der Ionen anhand ihres m/z -Verhältnisses erfolgt in der Orbitrap z.B. nicht wie beim Quadrupol-Massenanalysator über einen einfachen Quadrupol, sondern über eine spindelförmige Zentralelektrode, zu der die Analytionen radial-dezentral eingebracht werden.

Nach der Ionisierung mittels ESI ^[48] oder MALDI gelangen die Ionen nach der Transferoptik in die lineare Ionenfalle. Hier können selektiv bestimmte m/z -Verhältnisse isoliert und fragmentiert werden. Im nächsten Schritt werden die Ionen von der linearen Ionenfalle durch axiale Ejektion in die so genannte C-Trap weitergeleitet. Hier werden die Ionen wieder eingefangen und die kinetische Energie durch Kollision mit Stickstoff-Gas reduziert. Im nächsten Schritt erfolgt die Komprimierung der Ionenwolke durch elektrische Impulse, wodurch die Ionen bereit sind für die Injektion in die Orbitrap. Über Deflektoren, die sich zwischen C-Trap und Orbitrap befinden, wird die Ionenwolke radial-dezentral in die Orbitrap geleitet.

Treten die Ionen nun in die Orbitrap ein, erhöht sich die Spannung der Zentralelektrode, wodurch die Ionen auf diskreten Kreisbahnen um die spindelförmige Zentralelektrode kreisen und gleichzeitig entlang der Spindelachse mit einer bestimmten Frequenz oszillieren, die vom m/z -Verhältnis der entsprechenden Ionen abhängig ist. Hierbei wird der Bildstrom („image current“) auf der äußeren, in zwei Teile gegliederten Elektrode gemessen. Das Signal wird detektiert, verstärkt und über eine schnelle Fourier-Transformation („Fast Fourier Transformation“) in ein Frequenzspektrum umgewandelt, aus dem letztendlich ein Massenspektrum generiert wird.

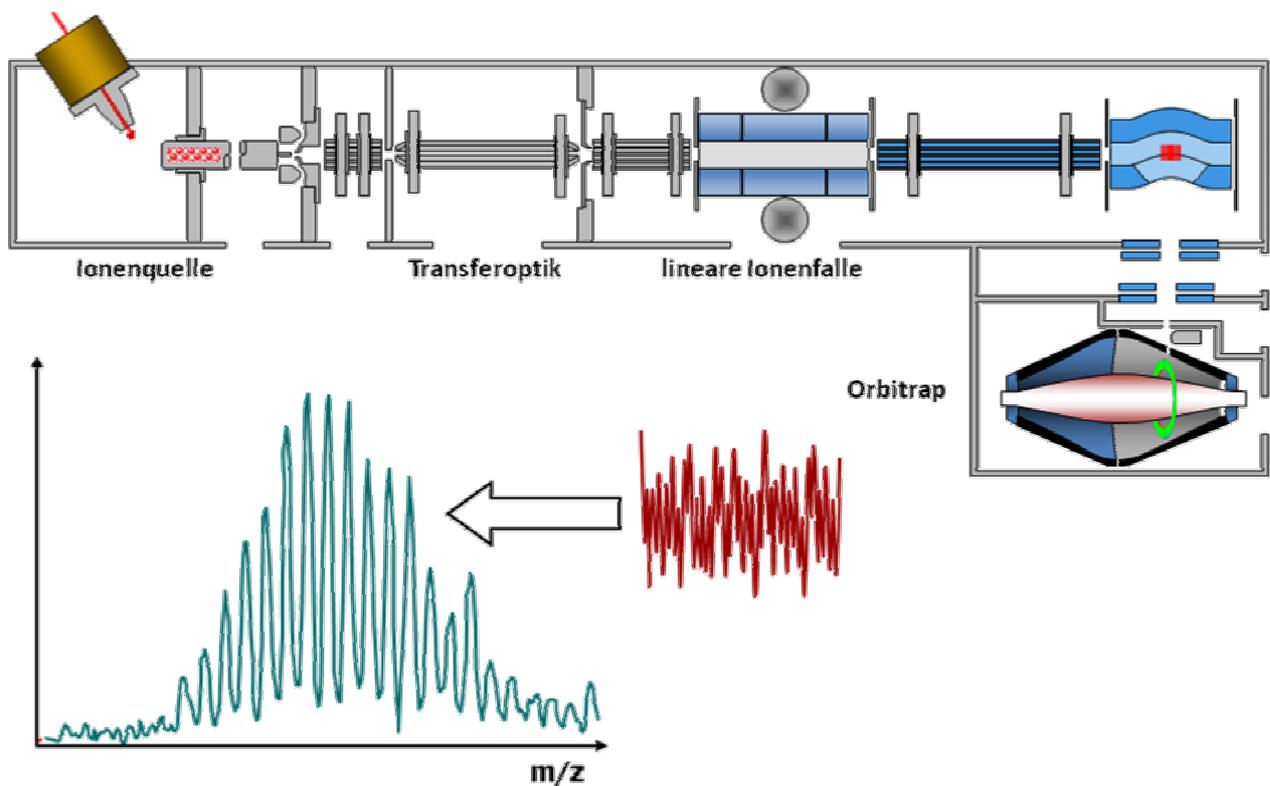


Abbildung 21: Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines LTQ-Orbitrap-Massenanalysators.

Mit dem Orbitrap-Massenanalysator sind Massengenauigkeiten im sub-ppm-Bereich realisierbar ohne externe Kalibrierung oder weitere Nachkalibrierungsschritte. Die maximale Auflösung beträgt 100,000, was die Isotopenauflösung von Proteinen bis ca. 50 kDa ermöglicht.

Nach der Ionisierung mittels ESI ^[48] oder MALDI gelangen die Ionen nach der Transferoptik in die lineare Ionenfalle. Hier können selektiv bestimmte m/z -Verhältnisse isoliert und fragmentiert werden. Im nächsten Schritt werden die Ionen von der linearen Ionenfalle durch axiale Ejektion in die so genannte C-Trap weitergeleitet. Hier werden die Ionen wieder eingefangen und die kinetische Energie

durch Kollision mit Stickstoff-Gas reduziert. Im nächsten Schritt erfolgt die Komprimierung der Ionenwolke durch elektrische Impulse, wodurch die Ionen bereit sind für die Injektion in die Orbitrap. Über Deflektoren, die sich zwischen C-Trap und Orbitrap befinden, wird die Ionenwolke radial-dezentral in die Orbitrap geleitet.

Treten die Ionen nun in die Orbitrap ein, erhöht sich die Spannung der Zentralelektrode, wodurch die Ionen auf diskreten Kreisbahnen um die spindelförmige Zentralelektrode kreisen und gleichzeitig entlang der Spindelachse mit einer bestimmten Frequenz oszillieren, die vom m/z -Verhältnis der entsprechenden Ionen abhängig ist. Hierbei wird der Bildstrom („image current“) auf der äußeren, in zwei Teile gegliederten Elektrode („Split Electrode“) gemessen. Das Signal wird detektiert, verstärkt und über eine schnelle Fourier-Transformation („Fast Fourier Transformation“) in ein Frequenzspektrum umgewandelt, aus dem letztendlich ein Massenspektrum generiert wird.

Die Problematik der Analyse intakter Proteine mittels Orbitrap-Massenspektrometrie

Die Verwendung des Orbitrap-Massenanalysators bietet eine Vielzahl an Vorteilen für die Analyse von biologischen Proben [⁴⁹]:

- hohe Auflösung (bis 100,000)
- hohe Massengenauigkeit
- hohe Empfindlichkeit und Nachweisstärke
- Zugänglichkeit zu einem großen Massenbereich

Generell ist die Analyse von kleineren Molekülen wie Metaboliten oder Peptiden robust und einfach realisierbar, wohingegen die Analyse von intakten Proteinen aufgrund ihrer Größe und den damit verbundenen Eigenschaften eine große Herausforderung darstellt. Daher sind einige essentielle Punkte bei der Analyse von intakten Proteinen zu beachten: Der Orbitrap-Massenanalysator ermöglicht hohe Auflösungen bis zu 100,000. Das Problem hierbei ist allerdings die Tatsache, dass die Scangeschwindigkeit mit zunehmender Auflösung signifikant abnimmt. Die Scanzeit für $R= 7,500$ beträgt 0.4 Sekunden, wohingegen die Scanzeit bei einer Auflösung von 100,000 bereits 2 Sekunden beträgt. Mit einer Auflösung von 100,000 kann die Isotopenauflösung für Proteine bis maximal 50 kDa erreicht werden.

Größere Proteine können nicht mehr isotopenaufgelöst werden; somit sollte bei Proteinen größer als 50 kDa die Auflösung auf 7,500 oder 15,000 reduziert werden, um kurze Scanzeiten und eine bessere Spektrenqualität zu erreichen.

Weitere Probleme stellen Dephasierungsphänomene der Ionenpakete dar. In der Gasphase kann es zu nicht-fragmentierenden Kollisionen kommen, wodurch es zur Dephasierung der Ionenpakete kommen kann. Bei der Oszillation der Ionenpakete um die Zentralelektrode kommen weitere Probleme hinzu: Auch hier kann es durch nicht-fragmentierende Kollisionen zu einer Reduzierung der radialen und axialen Amplitude während der Oszillation kommen, wodurch die Ionenpakete frühzeitig auf ihrer Kreisbahn kollabieren und die Detektion erschwert wird.

Verlieren die Proteine auf dem Weg in die Orbitrap soviel Energie, dass sie lediglich eine Kreisbahn nahe der Zentralelektrode (ca. 1-2 mm) erreichen [⁴⁹], wird der Dephasierungsprozess drastisch beschleunigt, was zu einer Verringerung bzw. auch Auslöschung der Signalintensität führen kann. Um diese Phänomene zu reduzieren, müssen einige wichtige Einstellungen am Gerät verändert werden:

- Nach dem Umschalten vom Standby- in den Operating-Modus sollte das Gerät vor der Kalibrierung bzw. ersten Proteinanalyse mindestens 90 min scannen, um die Systemstabilität zu maximieren. Hierbei muss keine Probe injiziert werden.
- Um Kollisionen der Proteine mit Restgasmolekülen in der Gasphase zu minimieren, sollte das Vakuum in der Orbitrap so hoch wie möglich sein. Dies kann durch mehrere „Bake-out“-Vorgänge hintereinander oder auch der Installation der „High Temperature Bake-out“-Option erreicht werden, was jedoch am verwendeten Gerät nicht installiert ist.
- Durch Ausschalten des HCD-Kollisionsgases kann das Vakuum ebenfalls verbessert werden.
- Da die Proteine auf ihrer Kreisbahn um die Zentralelektrode relativ schnell kollabieren, muss die Umwandlung des Signals mittels Fast Fourier Transformation (FFT) schneller erfolgen. Dies kann über den Toggle „FT Detection Delay“ erreicht werden, der auf „low“ gestellt werden muss. Bei der

Einstellung „FT Detection Delay: high“ wartet das Gerät eine gewisse Zeit, bis die Ionenpakete auf ihren Orbits kreisen, bevor die Fourier-Transformation des Signals in ein Massenspektrum erfolgt. Dies ist für Proteine allerdings zu lang, weswegen die Detektionsverzögerung auf ein Minimum reduziert werden sollte.

- Durch Einschalten der Quellenfragmentierung können mögliche Addukt-Ionen die die Spektrenqualität verringern, eliminiert werden. Standardwerte für die Quellenspannung sind hierfür generell 10-20 V; bei der Analyse von Antikörpern kann die Quellenspannung auf bis zu 50 V erhöht werden.
- Bei der Direktinfusion sollten möglichst viele Scans (10,000) gemittelt werden, da hierdurch die Spektrenqualität deutlich verbessert wird. Dieser Parameter kann für HPLC-MS-Setups nicht gewählt werden.
- Durch Wahl der Eluent-Additive (FA, TFA etc.) bei der chromatographischen Trennung kann die Spektrenqualität ebenfalls verbessert werden. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass die Eluent-Additive ebenfalls Einfluss auf die Trenneffizienz haben.
- Bei der Analyse größerer Proteine wie BSA, Transferrin oder Antikörpern empfiehlt es sich, die Spannung der Tube Lens auf ca. 240 V zu stellen. Hierdurch wird der Transfer höherer m/z-Verhältnisse begünstigt und darüber hinaus das Ausblenden von Addukt-Ionen, die die Spektrenqualität negativ beeinflussen, begünstigt.
- Zur Dekonvolution der Proteinspektren stehen zwei verschiedene Auswertesoftwaren zur Verfügung. Xtract und ProMass (beide von ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Bei Xtract handelt es sich um ein für hochaufgelöste Proteinspektren entwickeltes Dekonvolutions-Tool, das sowohl monoisotopische als auch mittlere Massen anzeigt. Das Programm ProMass ist bereits älter und wurde für das LTQ von Thermo entwickelt. Dies ermöglicht die Dekonvolution von Proteinspektren, deren m/z-Verhältnisse nicht mehr isotopenaufgelöst werden können.
- Der „Automatic Gain Control“- (ACG-)Wert der Orbitrap der unmittelbaren Einfluss auf die Füllzeiten des Massenanalysators hat, sollte für Proteine auf

1xE6 eingestellt werden (Standardwert 1xE5). Hierbei ist darauf zu achten, dass der Wert nicht zu hoch gewählt wird, da zu lange Füllzeiten zu einer Verschlechterung der Massengenauigkeit führen können.

1.4.2.7 Detektionsmöglichkeiten in der Massenspektrometrie

Die Detektion der ejizierten Ionen wird meistens mit Sekundärelektronenvervielfachern (SEVs) erreicht. Hierbei treffen die zu analysierenden Ionen auf eine ungeladene Oberfläche, wodurch Elektronen emittiert werden. Diese werden über weitere Teile der Oberfläche reflektiert und lösen dabei weitere Elektronen aus der Fläche heraus. Dies resultiert in einer exponentiellen Zunahme der detektierbaren Elektronen an der Anode. In Massenanalysatoren werden auch häufig so genannte Micro Channel Plates (= Mikrokanalplattenvervielfacher), welche aus einer Platte mit einer Vielzahl an zylinderförmigen Kanälen besteht. Diese sind mit einer halbleitenden Schicht ausgestattet und können Elektronen emittieren. Dadurch wirken sie als Sekundärelektronen-Emitter und –Vervielfacher. In der Orbitrap erfolgt die Detektion der Ionen mittels Bildstromdetektor (Image current detector).

2. Monolithische Trennmedien

2.1 Einleitung

In vielen analytischen Bereichen wie der Medizin, der Umweltanalytik oder der modernen Bioanalytik [8;16;50], welche auf die Entwicklung schneller und leistungsstarker Analysenmethoden angewiesen sind, hat sich die Hochleistungsflüssigchromatographie etabliert. Doch insbesondere bei bioanalytischen Fragestellungen, welche die Trennung komplexer Protein- oder Peptidgemische beinhaltet und oftmals nur geringe Probemengen vorhanden sind, sind vor allem miniaturisierte HPLC-Systeme unerlässlich. Doch die instrumentelle Miniaturisierung bringt eine Fülle von Problemen und Herausforderungen mit sich, welche vor allem die Entwicklung von modernen und effizienten stationären Phasen beinhaltet. Abgesehen von den bekannten Vorteilen besitzen gepackte Säulen für die Micro- und Nano-HPLC allerdings gewisse Einschränkungen und Nachteile: Der langsame diffusive Massentransfer sowie das Vorhandensein relativ großer Zwischenkornvolumina schränkt die Trenneffizienz dieser Säulen deutlich ein.

Darüber hinaus muss, wie bereits in **Kapitel 1.2.1** beschrieben, das Packungsmaterial durch Fritten oder Kapillarverjüngung in der Kapillare zurückgehalten werden, was einerseits die Reproduzierbarkeit und andererseits die Trenneffizienz erheblich einschränken kann. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von alternativen stationären Phasen für Micro- und Nano-HPLC-Systeme das Forschungsgebiet vieler wissenschaftlicher Arbeitsgruppen geworden. Ein relativ neuer Ansatz, der zwar bereits in den 60er und 70er Jahren in der Literatur beschrieben wird, aber dem erst gegen Anfang der 90er Jahre wieder verstärktes Interesse gewidmet wurde [51-54], sind die so genannten monolithischen Trennmedien. Darunter versteht man Trennmaterialien, die aus einem kontinuierlichen, porösen Material zusammengesetzt sind [55]. Das synthetisierte monolithische Material besitzt kein Zwischenkornvolumen, wie es bei gepackten Säulen der Fall ist, sondern lediglich interne Porosität, bestehend aus Micro- bzw. Mesoporen sowie Makroporen. Die Makroporen bilden die Durchflusskanäle im Trennmedium und sind verantwortlich für die Permeabilität des Trennmediums; Meso- und Microporen sollen garantieren, dass eine möglichst große Oberfläche für die chromatographische Interaktion zur Verfügung steht (**Abbildung 22**). Es gibt aber auch Konfigurationen, bei denen Micro- und Mesoporen bewusst vermieden werden. In diesem Fall spricht man von micropellikulären Monolithen, welche vor allem bei Trennungen von biologischen Makromolekülen zum Einsatz kommen. Insgesamt kann man monolithischen Trennmedien insgesamt in anorganische Polykondensate und organische Monolithen auf Polymerbasis unterteilen.

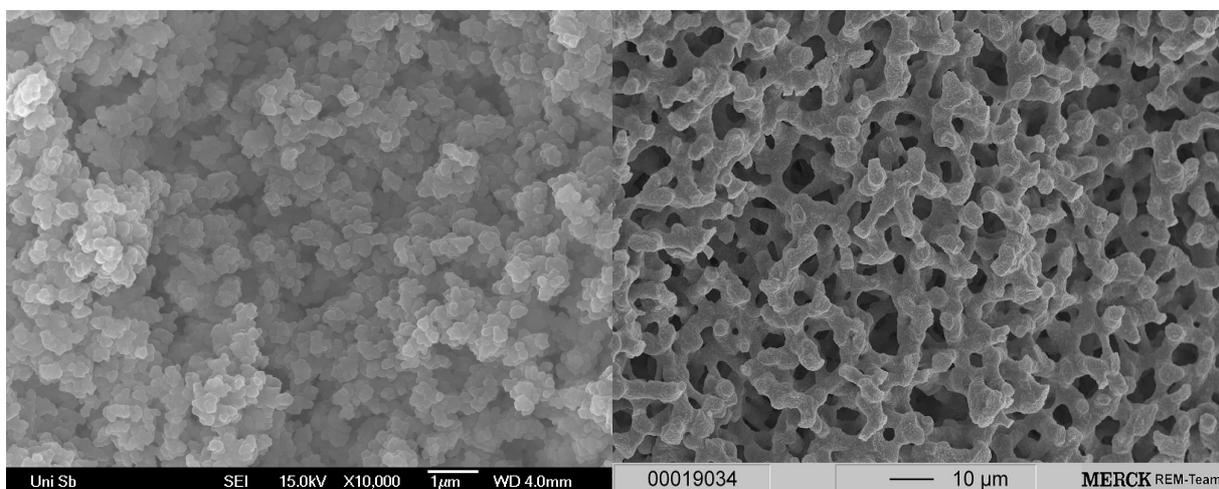


Abbildung 22: Vergleich der Phasenmorphologien: Polystyrol/Divinylbenzol-Monolith (links), Silica-Monolith „Chromolith“ von Merck (Darmstadt, Deutschland, Bild rechts stammt von der Webseite http://www.merck.es/servlet/PB/show/1291240_l3/Chromolith%20Structure.jpg).

Wie **Abbildung 22** zeigt, besitzen sowohl Polymer-basierte als auch Silica-Monolithen eine hoch poröse Struktur. Man erkennt deutlich die Unterschiede bzgl. der Morphologie: Während man beim Polymer-Monolith deutlich die einzelnen Globuli (= "Polymerkügelchen") erkennt, die während der Polymerisation agglomerieren, sieht man beim „Chromolith“ von Merck (Darmstadt, Deutschland) das Silica-Skelett, welches während der Polykondensationsreaktion entsteht. Der Hauptunterschied zwischen beiden Phasenmorphologien besteht darin, dass bei den Silica-Monolithen eine bimodale Porenverteilung vorliegt, bestehend aus Makro- sowie Meso/Microporen. Bei den Monolithen auf PS/DVB-Basis sind lediglich Makroporen zu erkennen. **Tabelle 3** beinhaltet die wichtigsten Vor- und Nachteile von gepackten Kapillarsäulen bzw. monolithischen Trennmedien für die Micro- und Nano-HPLC:

Tabelle 3: Vor- und Nachteile von gepackten Kapillarsäulen im Vergleich zu monolithischen Kapillarsäulen.

gepackte Kapillarsäulen	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> ➤ größere Auswahl an Materialien und Derivatisierungsmöglichkeiten ➤ größeres Spektrum an Anwendungsbeispielen realisierbar ➤ größere Breite an Selektivitäten ➤ verschiedenste chromatographische Modi realisierbar 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ geringere mechanische Stabilität ➤ geringere Trennleistung bei gleichen Säulendimensionen ➤ größerer Druckabfall der Säule ➤ längere Analysenzeiten ➤ Verwendung von Fritten zum Zurückhalten der Partikel notwendig
monolithische Trennsäulen	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> ➤ hohe mechanische Stabilität ➤ Unterstützung des Massentransfers zwischen mobiler und stationärer Phase durch konvektiven Fluss ➤ hohe Säulenpermeabilität und kurze Analysenzeiten ➤ effiziente Trennungen auch bei hohen Flussraten ➤ keine Fritten benötigt ➤ Packen der Säule entfällt 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Monolithen können trotz gleichen Synthesewegen unterschiedliche chromatographische Trenneigenschaften besitzen ➤ begrenzte Möglichkeiten zur Derivatisierung und damit beschränktes Einsatzgebiet ➤ deutlich weniger Phasen kommerziell verfügbar

Wie aus **Tabelle 3** hervorgeht, zeichnen sich monolithische Trennmedien insbesondere durch ihre hohe Permeabilität im Vergleich zu gepackten Kapillarsäulen aus, wodurch Monolithen bei hohen Flussraten betrieben werden können. Dies führt zu einer deutlichen Verkürzung der Analysenzeit. Weiterhin wird in Monolithen der Massentransfer durch konvektiven Fluss unterstützt, was bei gepackten Kapillarsäulen nicht der Fall ist. Dies führt zu einer signifikanten Verbesserung der Trennleistung der monolithischen Trennmedien.

Nachteile der Monolithen liegen allerdings vor allem im Bereich der Einsatzgebiete: Während gepackte Säulen bereits seit Jahrzehnten synthetisiert und optimiert werden, liegt eine Vielzahl an kommerziell verfügbaren Phasensystemen vor, wohingegen die Synthese und Entwicklung der Monolithen zwar nicht mehr in den Kinderschuhen steckt, aber noch intensiver Forschungsbedarf besteht, wie es *Frantisek Svec* und *Christian Huber* im Jahre 2006 [55] treffend formuliert haben: „*Monoliths are still teenagers.*“ Daher sind die Anwendungsgebiete monolithischer Trennmedien bislang ausschließlich auf einige wenige Gebiete der Analytik wie z. B. die Bioanalytik beschränkt, wohingegen sich gepackte Säulen durch ein deutlich breiteres Anwendungsspektrum auszeichnen. Vor allem im Bereich der Analytik kleinerer Moleküle gibt es bislang nur wenige Anwendungen für Monolithen auf Polymerbasis.

Monolithische Trennmedien auf Polymer-Basis

Als Alternative zu den Monolithen auf Silica-Basis können monolithische Polymere angesehen werden. In den frühen 90er Jahren waren es Arbeitsgruppen wie die von *Hjertén* und dessen Mitarbeitern, welche sich mit der Synthese von Polyacrylamid-Gelen beschäftigten [56;57] oder auch *Svec* und *Fréchet*, deren Forschungsgebiete unter anderem auch Copolymerisationen von Glycidylmethacrylat und Ethylendimethacrylat beinhalteten [54;54;58]. **Tabelle 4** gibt eine Übersicht über eine Vielzahl an Polymeren, und Einsatzgebieten.

Wie aus **Tabelle 4** hervorgeht, gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Monomeren, Porogenen und Polymerisationstechniken, doch die meisten Anwendungen dieser Monolithen zielen auf die Trennung oder Aufreinigung großer Biomoleküle ab wie Peptide, Proteine oder Nucleinsäuren. Nichtsdestotrotz sind diverse Monolithen auf Polymerbasis kommerziell erhältlich (**Tabelle 5**).

Tabelle 4: Verschiedene Typen von Polymer-Monolithen und deren Anwendungsgebiete bzw. Besonderheiten.

Monomere	Porogene	Inhalte + Anwendungen
Glycidylmethacrylat, Ethylendimethacrylat	Cyclohexanol, Dodecanol	Aminogruppen-Funktionalisierung mit Diethylamin, Diol-Funktionalisierung durch Epoxid-Hydrolyse [^{58,59}]
Methacrylamid, Piperazindiacrylamid (PDA), Vinylsulfonsäure, Acrylsäure	Ammoniumsulfat, Kaliumphosphat- Puffer	Chip- und Säulen-Technologie HPLC und Kapillarelektrochromatographie), Trennung von Proteinen und kleinerer Moleküle [⁶⁰]
Butylacrylat, N,N'-Methylenbisacrylamid	Ammoniumsulfat, Kaliumphosphat- Puffer	hydrophobe Interaktionschromatographie, Trennung von Proteinen [⁵⁷]
Glycidylmethacrylat, Trimethylpropantrimethacrylat	i-Octan, Toluol	Studien bzgl. der Phasenmorphologie [⁶¹]
Chlormethylstyrol, Divinylbenzol	Dodecanol, Toluol	Studien bzgl. der Phasenmorphologien unter Verwendung verschiedener Porogene [⁶²]
Styrol, Divinylbenzol	Dodecanol	Umkehrphasenchromatographie von Proteinen, Größensusschlusschromatographie [⁶²]
<i>cis</i> -Cycloocten (COE), Tris(cyclooct-4-enyl-1- oxy)methylsilan	2-Propanol, Toluol	Synthese der Monolithen via Ringöffnungsmetathese-Polymerisation (ROMP), Trennung von Proteinen [⁶³⁻⁶⁵]
Styrol, Divinylbenzol	Decanol, Tetrahydrofuran	Trennung von Oligonucleotiden und Vergleich mit partikulären C18-Säulen, Charakterisierung von physikalischen und chromatographischen Eigenschaften der Monolithen [66]

Tabelle 5: Ausschnitt kommerziell erhältlicher Monolithen auf Polymerbasis.

Typ	Phasenmaterial	Firma	Anwendungen und chromatographische Trennmodi
CIM [®] Technologie, z. B. „CIM [®] DEAE Disks“ (DEAE = Diethylaminoethyl-) (CIM [®] = Convective Interaction Media [®])	Glycidylmethacrylat, Ethylendimethacrylat,	BIA Separations Ljubljana, Slowenien	Kationen- bzw. Anionenaustauscher, Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern, Impfstoffen, Viren
ProSwift- und PepSwift -Technologie	Styrol, Divinylbenzol	Dionex Benelux, Amsterdam, Niederlande	Umkehrphasenchromatographie, Ionenaustauschchromatographie. Trennung von Proteinen und Peptiden
UNO S-1 (Sulfonsäure- Gruppen) UNO Q 1 (quartäre Aminfunktionalitäten)	Acrylsäure, N,N'- Methylenbisacrylsäure	Bio-Rad, Richmond, CA, USA	Ionenaustauschchromatographie
PS/DVB-Monolithen (150 x 4.6 mm bzw. 50 x 4.6 mm)	Styrol, Divinylbenzol	ISCO, Lincoln, NE, USA	Umkehrphasenchromatographie von Proteinen

2.2 Synthese von monolithischen Kapillarsäulen auf Polystyrol/Divinylbenzol-Basis

2.2.1 Silanisierung der Kapillarenwand

Vor der Synthese von Monolithen auf Polystyrol/Divinylbenzol-Basis muss dafür gesorgt werden, dass das monolithische Material im Innern der Kapillare fixiert wird. Man nutzt hierbei aus, dass das Innere der amorphen Quarzkapillare derivatisierbare Silanolgruppen besitzt. Hierzu verwendet man Methacrylsäure-[3-(trimethoxysilyl)propylester], um das poröse Polymer kovalent mit der Kapillarenwand mittels Vinyl-Silanisierung zu verankern. Dieses Methacrylester-Derivat kann einerseits durch nucleophile Substitution am Siliciumatom unter Abspaltung von Methanol leicht zur Reaktion gebracht werden. Andererseits trägt der Ester Doppelbindungen, die an der Polymerisation mit Styrol und Divinylbenzol beteiligt sind und so das Polymer kovalent fixieren. Diese Art der Verankerung hat einige entscheidende Vorteile:

- Aufgrund der hohen Stabilität der Silicium-Sauerstoff-Bindung wird der Monolith fest und kovalent mit der Kapillarenwand verankert, wodurch die mechanische Stabilität der Säule erhöht wird.
- Durch die Fixierung des Phasenmaterials kann im Gegensatz zu gepackten Säulen auf Fritten oder Kapillarverjüngungen verzichtet werden. Hierdurch entfällt ein schlecht reproduzierbarer sowie ein sich negativ auf die Trenneffizienz auswirkender Syntheseschritt.
- Je nach Quervernetzungsgrad neigen Polystyrol/Divinylbenzol-Monolithen abhängig nach verwendetem Laufmittel zum Quellen oder Schrumpfen. Durch die kovalente Fixierung kann die Bildung von Kanälen in Wandnähe vermieden werden.
- Bei der eigentlichen Synthese des Monolithen kommt es zum Schrumpfen des PS/DVB-Materials, wodurch Lücken zwischen Kapillare und Säulenmaterial entstehen können. Durch die kovalente Fixierung kann dem Schrumpfen entgegengewirkt werden.

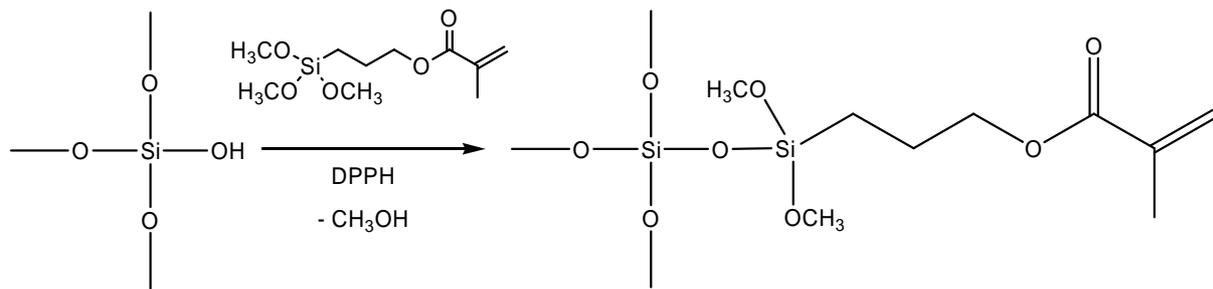


Abbildung 23: Silanisierungsprozess der Kapillarinnenwand einer amorphen Quarzkapillare.

Die schematische Reaktion ist in **Abbildung 23** gezeigt. Hierbei muss zu dem Reaktionsgemisch noch das 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal (DPPH) als Radikalfänger hinzugegeben werden, da Methacrylester-Derivate zur Polymerisation neigen (**Abbildung 24**).

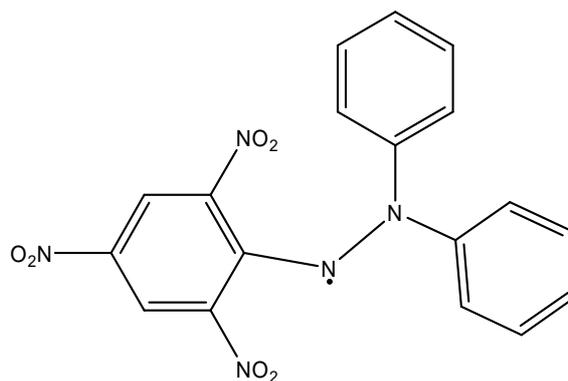


Abbildung 24: Struktur des 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikals (Goldschmidt-Radikal, DPPH).

2.2.2 Polymerisationstechnik und Synthesekomponenten

Die Herstellung der Polystyrol/Divinylbenzol-Monolithen basiert auf einer modifizierten heterogenen, thermisch induzierten Copolymerisation von Styrol und Divinylbenzol. Den Ausgangspunkt zur Synthese der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Monolithen stellen Styrol als Monomerbaustein und Divinylbenzol als Quervernetzer dar. Neben den beiden Monomerkomponenten benötigt man einen Radikalstarter, z. B. das häufig verwendete α,α' -Azobisisobutyronitril, welches thermisch fragmentiert wird und die Polymerisation initiiert. Diese drei Komponenten werden in einem definierten Verhältnis gemischt und als Monomergemisch bezeichnet. Darüber hinaus benötigt man ein Porogemisch, welches für die

Bildung eines porösen Monolithen unerlässlich ist. Dabei verwendet man üblicherweise eine Mischung aus einem Makro- und einem Microporogen. Das Makroporogen ist für die Bildung der Durchflusskanäle und die hohe Permeabilität der monolithischen Trennmedien verantwortlich, wohingegen das Microporogen die Aufgabe hat, eine möglichst große Oberfläche für die chromatographische Interaktion zu generieren. Die Porengröße hängt dabei von der Löslichkeit der während der Polymerisation entstehenden Oligomere im Porogemisch ab: Sind die Oligomere schlecht löslich in einem Porogen, kommt es zu einer frühen Phasenseparation der Polymerisationskeime; sind die Oligomere gut löslich, tritt eine spätere Phasenseparation auf, was Auswirkungen auf die Größe der Globuli und der Poren hat. Unter Porogenen versteht man allgemein Substanzen, die an der Polymerisation nicht teilnehmen, aber löslich oder zumindest mischbar mit den Monomeren sind. Klassische Makroporogene zur Synthese der Polystyrol/Divinylbenzol-Monolithen stellen Alkohole (1-Decanol, 1-Dodecanol etc.) oder auch Toluol dar. Als Microporogen verwendet man häufig Tetrahydrofuran, aber je nach Anwendungsgebiet kann man auch andere Substanzen wie Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff verwenden. Dabei läuft die Polymerisation insgesamt wie folgt ab: Durch Wärmezufuhr erfolgt im ersten Schritt der Reaktion die thermische Fragmentierung von α,α' -Azobisisobutyronitril unter Stickstoffabspaltung und Bildung der Cyanoisopropyl-Radikale, die als Polymerisationsinitiator dienen (**Abbildung 25**):

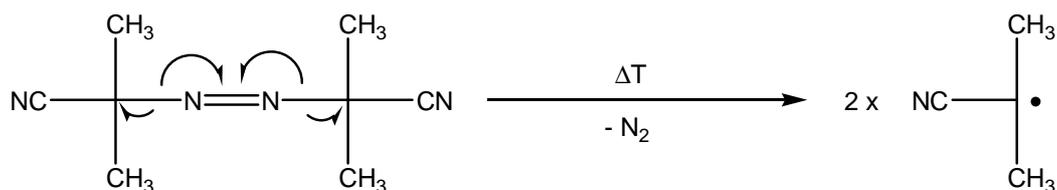


Abbildung 25: Thermischer Zerfall von α,α' -Azobisisobutyronitril unter Abspaltung von Stickstoff.

Im nächsten Reaktionsschritt addiert ein Cyanoisopropyl-Radikal an die Doppelbindung des Styrols unter Bildung eines weiteren Radikals (I) (**Abbildung 26**):

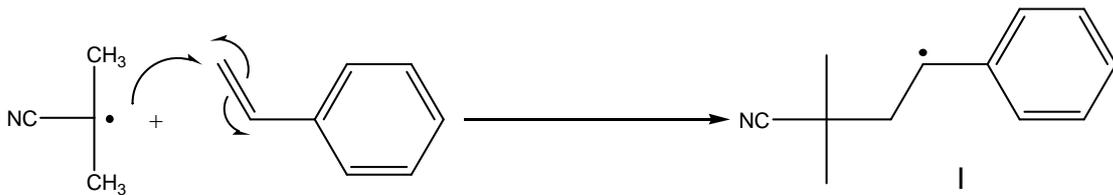


Abbildung 26: Addition eines Cyanoisopropylradikals an die Doppelbindung des Styrols.

Das neu gebildete Radikal (I) kann als weiterer Kettenfortpflanzungsschritt mit einem weiteren Styrolmolekül reagieren (**Abbildung 27**):

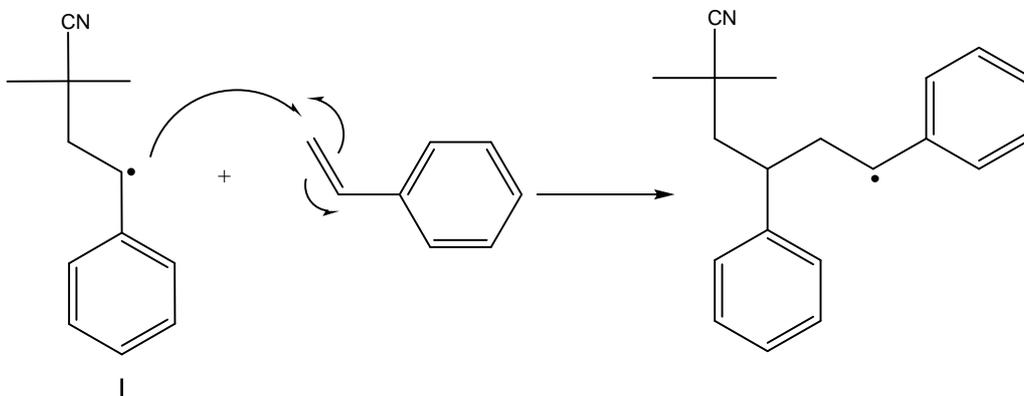


Abbildung 27: Kettenfortpflanzungsschritt bei der radikalischen Polymerisation.

Alternativ kann aber auch Radikal I mit einem Divinylbenzolmolekül reagieren und so die Quervernetzung einleiten unter Bildung von Radikal II (**Abbildung 28**):

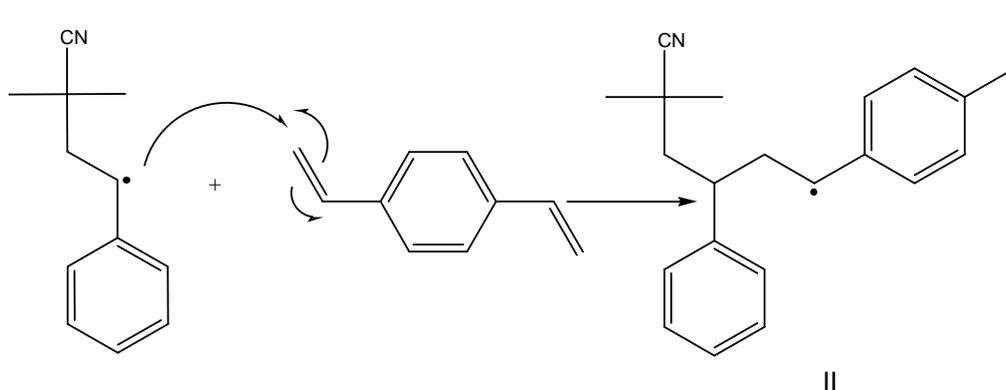


Abbildung 28: Initiation der Quervernetzungsreaktion.

Als letzter Schritt der radikalischen Polymerisation erfolgt der Kettenabbruch in Form von Disproportionierungsreaktionen oder auch Radikal-Rekombinationen. Wichtig für

den Verlauf der Reaktion ist es, dass die Monomere im Porogemisch löslich, aber die gebildeten Polymerstränge unlöslich sind. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der Polymerketten während der fortschreitenden Reaktion und zur Ausbildung der charakteristischen Globuli, die das Skelett des monolithischen Materials bilden.

2.2.3 Kontrolle der Phasenmorphologien bei der Synthese von Polystyrol-Divinylbenzol-Monolithen

Geht es um die Kontrolle der Phasenmorphologien, so sind hierbei vor allem Faktoren wie die Größe der Globuli und der Durchflussskanäle (Makroporen) wichtig, da sie einen signifikanten Einfluss auf Trenneffizienz und Permeabilität haben. Je nach Anwendungsgebiet und Eigenschaften der Moleküle, die später getrennt werden sollen, ist ein Kompromiss zwischen Trenneffizienz und Permeabilität notwendig.

Seidl et al. [67] beschreiben in ihren Arbeiten die Parameter, welche die Synthese von Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymeren beeinflussen. Zu Beginn der Polymerisation liegt ein homogenes Reaktionsgemisch vor. Während des Kettenwachstums kommt es zum Ausfällen der Ketten, sobald sie nicht mehr in den Porogenen löslich sind, sowie der Kettenagglomeration. Während hauptsächlich thermodynamische Faktoren die Aggregation und die Phasenseparation der Polymerketten steuern, kann man über die Polymerisationskinetik die Porengröße steuern. Die wichtigsten Faktoren zur Kontrolle der Porengröße bei Polystyrol/Divinylbenzol-Monolithen sind:

Konzentration des Monomers (Styrol) und des Quervernetzers (Divinylbenzol)

Die Konzentrationen an Styrol und Divinylbenzol haben einen signifikanten Einfluss auf das spätere monolithische Netzwerk und dessen chemische und physikalische Eigenschaften: Die Konzentration des Quervernetzers hat in erster Linie einen signifikanten Einfluss auf die Quelleigenschaften des Polymermaterials: Je höher die Quervernetzer-Konzentration, desto stärker verzweigt ist das gebildete Polymermaterial, wodurch die Quell-Anfälligkeit des Polymers herabgesetzt wird. Eine höhere Quervernetzer-Konzentration bedeutet aber auch gleichzeitig, dass zu Beginn der Polymerisation eine größere Anzahl an quervernetzten Teilchen vorliegt, was in einer früheren Phasenseparation resultiert. Aufgrund des höheren Vernetzungsgrades der

Ketten quellen diese Polymerkeime nur noch schwach, was den mittleren Porendurchmesser verkleinert.

Art und Konzentration der Inertkomponenten (Porogene)

Allgemein versteht man unter einer Inertsubstanz bzw. einem Porogen Verbindungen, die mit Monomer und Quervernetzer mischbar sind, aber im Verlauf der Polymerisation die gebildeten Ketten nicht mehr lösen können, so dass es zur Phasenseparation kommt. Bezüglich der Inertkomponenten bzw. Porogene ist folgende Differenzierung möglich, wie **Abbildung 29** zu entnehmen ist. Hierbei unterscheidet man zwischen hoch- und niedermolekularen Inertsubstanzen: Werden hochmolekulare Inertsubstanzen zur Polymerisationsmischung gegeben wie beispielsweise Polystyrol als nicht-quervernetzendes Polymer, reagiert der Quervernetzer nicht nur mit den während der Reaktion entstehenden Polymerketten, sondern auch mit dem hinzugefügten Polystyrol. Daraus resultiert eine frühere Phasenseparation bereits während des dreidimensionalen Vernetzungsvorgangs und damit die Bildung eines makroporösen Copolymers mit permanenter Porosität. Üblicherweise wird das zu Beginn der Reaktion zugegebene Polystyrol nach Fertigstellung des Monolithen durch Extraktion entfernt.

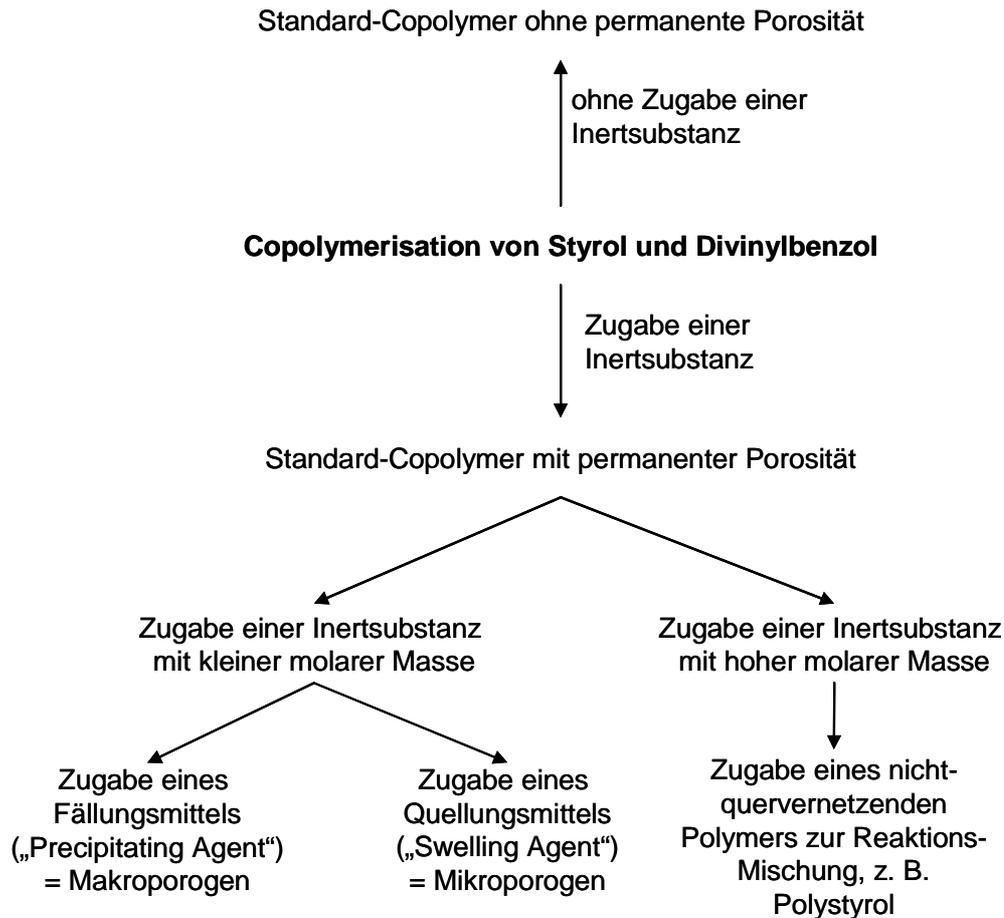


Abbildung 29: Klassifizierung der Inertkomponenten bei der Synthese von Polystyrol/Divinylbenzol-Monolithen.

Als Alternative hierzu existieren so genannte Fällungsmittel, welche löslich in Monomerkomponenten sind, aber das entstehende Polymer nicht (merklich) quellen lassen. Während der Phasenseparation erreicht der Quellvorgang ein Maximum, aber nimmt danach wieder ab, wodurch der Hauptanteil des Fällungsmittels in der flüssigen Phase verbleibt und damit kein Quellvorgang in den Polymerketten stattfindet. Zu den klassischen Fällungsmitteln zählen hauptsächlich Alkohole wie 1-Decanol, 1-Dodecanol oder auch flüssige Alkane. Die Alkohole werden aufgrund ihrer Polarität hierbei als starke Fällungsmittel angesehen, da die Polymerketten schlechter darin löslich sind und eine frühere Phasenseparation einsetzt, wodurch größere Poren entstehen. Daher bezeichnet man Fällungsmittel wie 1-Decanol auch als Makroporogene. Alternativ zu den Fällungsreagenzien verwendet man auch Quellungsmittel, die ebenfalls in den Monomeren löslich sind, aber die Polymerketten zum Quellen bringen. Für Monolithen auf Polystyrol/Divinylbenzol-Basis bieten sich aromatische Kohlenwasserstoffe wie Toluol bzw. Ethylbenzol, aber

auch halogenierte Alkane wie Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff an. Alternativ kann man auch cyclische Ether wie Tetrahydrofuran verwenden, in denen die Polymerketten relativ gut löslich sind und eine spätere Phasenseparation einsetzt, was in kleineren Poren resultiert. In der Praxis verwendet man allerdings meist eine Mischung aus Quellungs- und Fällungsreagenz, wodurch die Porengröße über einen großen Bereich variiert werden kann. Wie bereits beschrieben führt die Zugabe an Quellungsreagenzien (Microporogenen), in denen die Polymerstränge gut löslich sind, zu einer späten Phasenseparation. Hierdurch verbleibt das Quellungsreagenz länger in den Polymerisationskeimen, wodurch die lokale Monomerkonzentration dort gering bleibt. Als Resultat bleiben sowohl die gebildeten Partikel und dementsprechend auch die Poren kleiner. Bei Fällungsreagenzien (Makroporogenen) ist dies anders: Hier findet die Phasenseparation früher statt, wodurch das Polymer durch Einlagerung von Monomerbausteinen aufquillt und nur geringe Mengen an Porogen aufnehmen kann. Demnach findet die eigentliche Polymerisation hauptsächlich in den lokal begrenzten Polymerisationskeimen statt, was ein rasches Wachstum zur Folge hat und in größeren Globuli und damit auch größeren Poren resultiert infolge der größeren Lücken nach der Agglomeration zwischen den Globuli.

Art und Konzentration des Radikalstarters

Einen weiteren Einfluss auf die Phasenmorphologie hat die Art sowie die Konzentration des verwendeten Radikalstarters. Die Wahl des Radikalstarters hat in erster Linie Einfluss auf die minimal mögliche Polymerisationstemperatur, ab der der Radikalstarter fragmentiert und somit die Polymerisation initiiert. Ebenso wichtig wie die Wahl des Radikalstarters ist die eingesetzte Konzentration: Wird die Konzentration des Radikalstarters erhöht, entsteht zu Beginn der Polymerisation eine größere Anzahl an Polymerisationskeimen, die sich zu kleineren Globuli zusammenlagern. Dies resultiert in einer Verkleinerung der Porengröße.

Polymerisationstemperatur

Die Polymerisationstemperatur hängt in erster Linie vom verwendeten Radikalstarter ab, da die minimale Fragmentierungstemperatur des verwendeten Radikalstarters beachtet werden muss. Darüber hinaus ist die Temperatur ein wichtiger Parameter zum Fine-Tuning der gewünschten Phasenmorphologie und Porengröße. Eine

Erhöhung der Temperatur führt zu einer schnelleren Fragmentierung des Radikalstarters, wodurch eine hohe Zahl an Polymerisationskeimen zu Beginn der Reaktion entsteht. Dies führt zu kleineren Globuli und daher auch zu kleinen Porengrößen nach der Teilchenagglomeration. Niedrigere Temperaturen führen dagegen zu einer entsprechend kleineren Anzahl an Polymerisationskeimen, die zu größeren Globuli heranwachsen und damit die Größe der Poren erhöhen.

Polymerisationszeit

Zum Fine-Tuning der Phasenmorphologien kann auch die Polymerisationszeit verwendet werden: Wie *Fréchet et al.* [^{58;61;68}] untersuchten, entstehen zu Beginn der Polymerisation sehr große Poren, die allerdings mit fortschreitender Reaktion verschwinden und durch eine einheitliche Porenverteilung mit einem Maximum hin zu kleineren Porengrößen ersetzt werden. Nach 22 h stabilisiert sich die Phasenmorphologie, wodurch keine weiteren Änderungen bzgl. der Porengröße zu beobachten sind.

3. Substanzklassen und Realproben

3.1 Eigenschaften und Strukturen der Aminosäuren

Unter Aminosäuren versteht man im Allgemeinen kristalline, hochschmelzende aliphatische oder aromatische Carbonsäuren (oder seltener auch Sulfonsäuren), die mindestens eine Aminogruppe in α -, β - oder γ -Position beinhalten. Man kann die Aminosäuren dabei nach ihren Funktionalitäten oder auch ihrem Vorkommen in unterschiedliche Kategorien einordnen. Die Aminosäuren, die auch in natürlichen Proteinen vorkommen und somit die Proteinbausteine für Lebewesen und damit auch für den Menschen sind, bezeichnet man als proteinogene Aminosäuren. Hierbei kann man die Aminosäuren in die kanonischen und nicht-kanonischen proteinogenen Aminosäuren unterteilen. Die 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren sind in **Tabelle 6** zusammengefasst und werden durch Codons des genetischen Materials kodiert. Darüber hinaus existieren weitere, wenn auch seltenere nicht-kanonische Aminosäuren wie Selenocystein, das als 21. proteinogene Aminosäure im menschlichen Organismus nachgewiesen konnte. Eine 22. proteinogene Aminosäure, das Pyrrolysin, konnte im Jahre 2002 in Bakterien nachgewiesen werden [69]. Eine besondere Eigenschaft aller proteinogenen Aminosäuren, mit Ausnahme des Glycins, liegt in ihrer Chiralität: Sie tragen alle in α -Position zur Carbonylgruppe ein Asymmetriezentrum, wodurch eine Unterscheidung in D- und L-Aminosäuren (bzw. R- und S-) möglich ist. Der menschliche Organismus stellt dabei ausschließlich die L-Formen her. Darüber hinaus besitzen alle Aminosäuren einen amphoteren Charakter, weswegen sie sowohl in sauren als auch basischen Lösungsmitteln löslich sind. Im physiologischen pH-Bereich liegt eine Aminosäure hauptsächlich als inneres Salz (= Zwitterion) mit Betainstruktur vor (**Abbildung 30**):

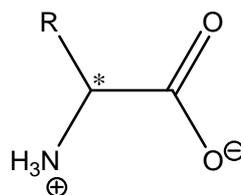
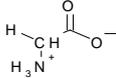
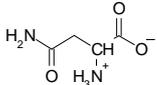
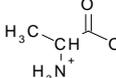
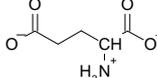
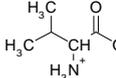
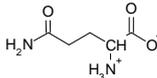
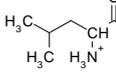
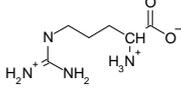
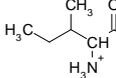
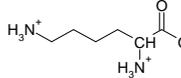
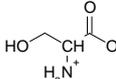
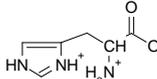
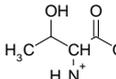
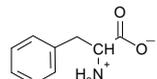
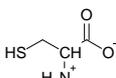
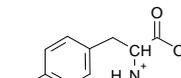
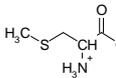
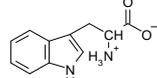
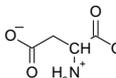
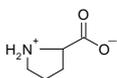


Abbildung 30: Betainstruktur von Aminosäuren (Zwitterion).

Tabelle 6: Übersicht über die 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren incl. Strukturformeln sowie Drei- und Ein-Buchstaben-Codices.

Glycin	Gly (G)		Asparagin	Asn (N)	
Alanin	Ala (A)		Glutaminsäure	Glu (E)	
Valin	Val (V)		Glutamin	Gln (Q)	
Leucin	Leu (L)		Arginin	Arg (R)	
Isoleucin	Ile (I)		Lysin	Lys (K)	
Serin	Ser (S)		Histidin	His (H)	
Threonin	Thr (T)		Phenylalanin	Phe (F)	
Cystein	Cys (C)		Tyrosin	Tyr (Y)	
Methionin	Met (M)		Tryptophan	Trp (W)	
Asparaginsäure	Asp (D)		Prolin	Pro (P)	

Die in **Tabelle 6** aufgeführten Aminosäuren sind die Bausteine für Proteine und Peptide, die in **Kapitel 3.2** beschrieben werden.

3.2 Eigenschaften und Aufbau der Proteine und Peptide

Proteine und Peptide können als lineare Polymere interpretiert werden, bei denen die α -Carbonylgruppen der Aminosäuren mit α -Aminogruppen der nächsten Aminosäure über eine Amidbindung verknüpft ist. Man bezeichnet die Amidbindung hierbei üblicherweise auch als Peptidbindung. Je nach Länge der Polypeptidkette unterscheidet man hierbei zwischen Peptiden und Proteinen. **Abbildung 31** zeigt den typischen Aufbau eines Pentapeptids:

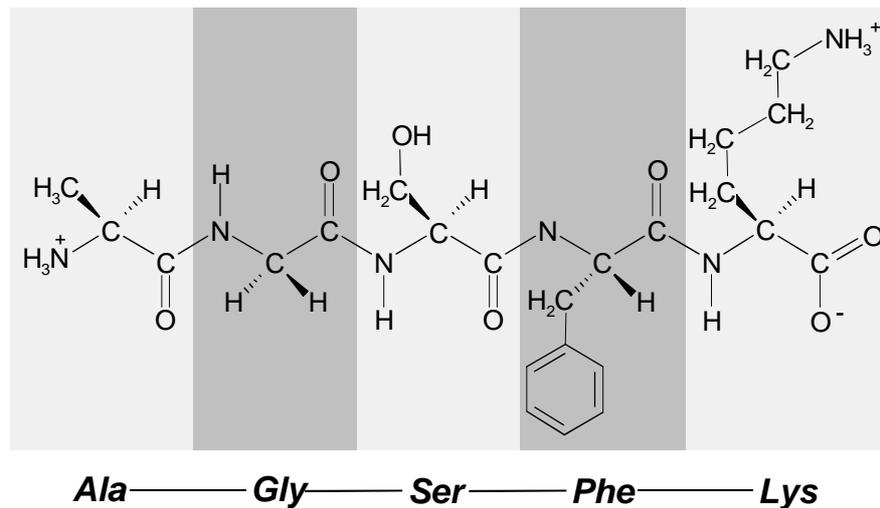


Abbildung 31: Aminosäuresequenz des Tetrapeptids Ala-Gly-Ser-Phe-Lys

Polypeptidketten mit bis zu 50 Aminosäuren bezeichnet man als Peptide, wohingegen Polypeptidketten mit über 50 Monomeren als Proteine bezeichnet werden. Dieser Nomenklatur liegt zugrunde, dass bei Aminosäurekettenlängen von kleiner als 50 oftmals keine Sekundärstruktur vorliegt, wie es typisch für Proteine ist. Polypeptide mit mehr als 50 Monomeren sind meist in der Lage, stabile dreidimensionale Strukturen zu bilden. Bei Proteinen kann man insgesamt vier verschiedene Strukturebenen unterscheiden: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Die Primärstruktur eines Proteins ist definiert als Abfolge der Aminosäuresequenzen in der Polypeptidkette, wohingegen die Sekundärstruktur die räumliche Anordnung der Polypeptidkette beschreibt. Die Sekundärstrukturen sind hierbei darauf zurückzuführen, dass die relativ starre und planare trans-Konfiguration der Amidbindungen in bevorzugten räumlichen Strukturen resultiert. Typische Beispiele für Sekundärstrukturen, die in der Natur vorkommen, sind hierbei die so genannte α -Helix und das β -Faltblatt (**Abbildung 32**). Die α -Helix besteht hierbei aus einer gewundenen Stabstruktur, die durch Wasserstoffbrücken zwischen CO- und NH-Funktionalitäten der Polypeptidkette entstehen. Beim β -Faltblatt dagegen liegen mehrere nahezu völlig ausgestreckte Polypeptidketten vor, bei denen die Struktur durch Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Strängen stabilisiert wird. Weitere, jedoch seltenere Sekundärstrukturen sind beispielsweise β -Haarnadelkurven bzw. auch Ω -Schleifen. Die Tertiärstruktur eines Proteins beschreibt allgemein die gesamte Anordnung der Polypeptidkette und beschreibt damit die der Sekundärstruktur übergeordnete räumliche Gestalt des Proteins.

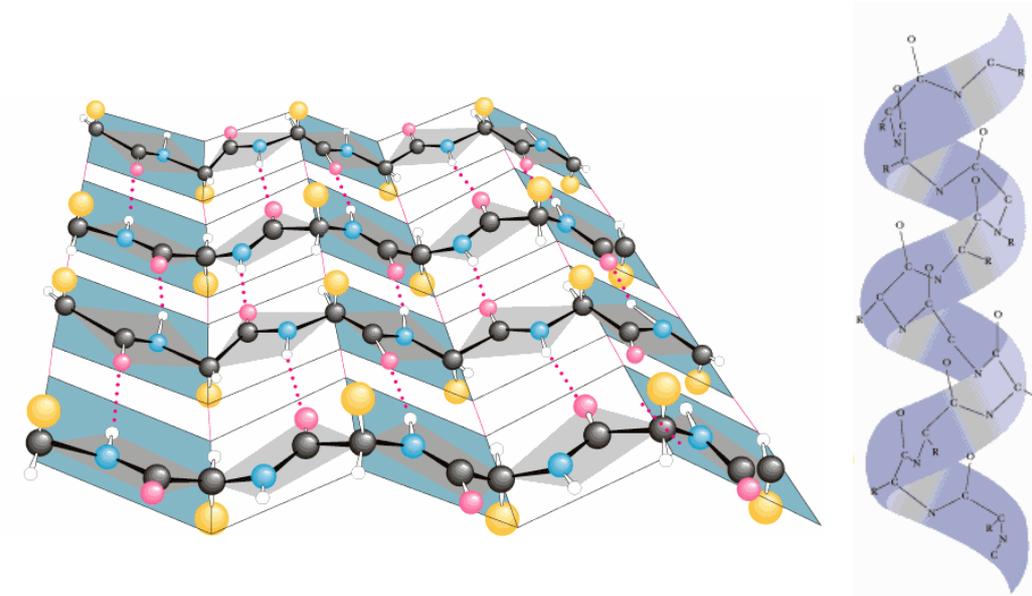


Abbildung 32: β -Faltblattstruktur (links) und α -Helix (rechts) als typische Beispiele für Sekundärstrukturen von Proteinen.

Diese Gesamtanordnung ist abhängig von Faktoren wie Funktionalität, Verteilung und Anordnung der Seitenketten der Aminosäuren, wodurch beispielsweise Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Ferner haben prosthetische Gruppen ebenfalls einen Einfluss auf die Tertiärstruktur. Darunter versteht man Molekülstrukturen, die an das Protein gebunden sind, aber nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind. Ein Beispiel hierfür wäre die aus einem Porphyrin-Ring aufgebaute Häm-Gruppe des Hämoglobins. Die Quartärstruktur eines Proteins beschreibt die geometrische Struktur, wenn sich mehrere Proteine zu einem Komplex zusammenlagern, wie es beispielsweise bei Immunglobulinen der Fall ist. Aber auch durch Zusammenlagerung mehrerer Polypeptidketten bei Proteinen, die aus mehr als einer zusammenhängenden Peptidkette bestehen, kann eine Quartärstruktur resultieren. Zur chromatographischen Analyse von Proteinen sowie Peptiden steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (**Tabelle 7**). Hierbei kann man sich diverse Proteineigenschaften wie Ladung, Metallaffinität, isoelektrischer Punkt, molekulare Größe oder auch die biologische Affinität zunutze machen.

Tabelle 7: Methoden zur flüssigchromatographischen Trennung von Proteinen.

Trennmethode	Abkürzung	Trennprinzip
interaktive Methoden		
Ionenaustausch-Chromatographie	IEC	elektrostatische Wechselwirkungen
Normalphasen-Chromatographie	NPC	polare Wechselwirkungen
Umkehrphasen-Chromatographie	RPC	solvophobe Wechselwirkungen
Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie	IP-RPC	elektrostatische + solvophobe Wechselwirkungen
Affinitäts-Chromatographie	AC	biospezifische Wechselwirkungen
Metallaffinitäts-Chromatographie	IMAC	Komplexbildung
Chromatofokussierung	CF	unterschiedliche isoelektrische Punkte der Proteine
nicht-interaktive Methoden		
Größenausschluss-Chromatographie	SEC	Unterschiede in der Molekülgröße

3.3 Struktur und Bedeutung der Parabene

Parabene gehören zur Substanzklasse der para-Hydroxybenzoesäurealkylester und besitzen insbesondere fungizide, bakterizide bzw. antimikrobielle Eigenschaften und werden dementsprechend vor allem in Kosmetikprodukten, Pharmazeutika, Textilien oder auch Lebensmitteln als Konservierungsmittel eingesetzt [70-72]. Auch wenn Parabene eine geringfügige akute Toxizität besitzen, so stieg innerhalb der letzten Jahre die Besorgnis über Folgen der Langzeitexposition: Einerseits besitzen Parabene ein allergieverursachendes Potential, wodurch es zu Erkrankungen wie Asthma, Hautreizungen oder anderen allergischen Reaktionen kommen kann. Andererseits schreibt man Paraben eine dem Hormon Östrogen ähnliche Wirkung zu und haben demnach Einfluss auf das Hormonsystem von Lebewesen. *Harvey et al.* zeigten darüber hinaus im Jahre 1995, dass Östrogen einen Einfluss auf die Auftretenshäufigkeit von Brustkrebs hat [73]. Im Zusammenhang mit der östrogen-analogen Wirkung der Parabene stehen möglicherweise degenerative Erkrankungen

wie Brust- oder auch Hauttumore. Diverse Studien wie z. B. von *Dabre et al.* konnten erhöhte Parabenkonzentrationen in Brusttumoren nachweisen [74]. Falls Parabene intakt durch den Körper aufgenommen werden, besteht die Gefahr der Bioakkumulation im Fettgewebe. Normalerweise werden Parabene relativ schnell zu para-Hydroxybenzoesäure gespalten, weiter metabolisiert und über den Urin ausgeschieden. Vor allem bei oraler Aufnahme, z. B. über Lebensmittel, läuft dieser Metabolisierungsprozess äußerst schnell ab. Bei der Aufnahme der Parabene über die Haut, z. B. durch Kosmetika wie Crèmes oder Deodorants, könnte es in Kombination mit den oftmals in Kosmetika enthaltenen Substanzen, die das Einziehen der Crèmes in die Haut beschleunigen, zur Akkumulation der Parabene im Fettgewebe kommen. Allerdings muss hierbei noch bestätigt werden, ob die in den Produkten enthaltenen Parabene bei Langzeitanwendungen intakt in das Fettgewebe eingelagert werden können angesichts der geringen Paraben-Konzentrationen in den Produkten. Die allgemeine Struktur der Parabene ist in **Abbildung 32** dargestellt:

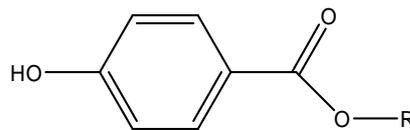


Abbildung 32: Allgemeine Struktur der Parabene.

3.4 Einteilung, Struktur und Bedeutung der Antibiotika

Unter Antibiotika versteht man allgemein pharmakologisch aktive Stoffe mit bakteriostatischer, bakteriolytischer bzw. bakterizider Wirkung, die natürliche Stoffwechselprodukte von Bakterien oder Pilzen sind. Antibiotisch wirksame Substanzen umfassen eine Vielzahl von Stoffklassen und können in diverse Kategorien eingeordnet werden [75] (**Tabelle 8**):

Tabelle 8: Übersicht über 11 verschiedene Antibiotika-Klassen inklusive Einführungsjahr, Wirkungsort und Beispielen.

Substanzklasse	Einführungsjahr	Target	Beispiel
Sulfonamide (synthetisch)	1935	Folsäuresynthese	Prontosil
β -Lactame	1940	Zellwandbiosynthese	Penicillin G
Polyketide	1949	Proteinbiosynthese	Tetracyclin
Phenylpropanoide	1949	Proteinbiosynthese	Chloramphenicol
Aminoglycoside	1950	Proteinbiosynthese	Tobramycin
Makrolide	1952	Proteinbiosynthese	Erythromycin A
Glycopeptide	1958	Zellwand	Vancomycin
Chinolone (synthetisch)	1962	DNA-Replikation	Ciprofloxacin
Streptogramine	1962	Proteinbiosynthese	Pristinamycin (I _a + II _a)
Oxazolidinone (synthetisch)	2000	Proteinbiosynthese	Linezolid
Lipopeptide	2003	bakterielle Membran	Daptomycin

Wie aus **Tabelle 8** hervorgeht, gibt es äußerst unterschiedliche antibiotisch wirksame Substanzklassen, welche die klassischen β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin G, aber auch neue Generationen von Antibiotika wie z. B. Lipopeptide oder Oxazolidinone umfassen. Aufgrund der strukturellen Vielfalt der Antibiotika und den dementsprechend auch unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (Polarität, Hydrophobizität, Persistenz etc.) ist die Antibiotika-Analytik ein anspruchsvolles Gebiet der Wissenschaft. Die Substanzklasse der Aminoglycoside beinhaltet stark polare polykationische Verbindungen und kann entsprechend als stark hydrophil eingestuft werden, wohingegen die β -Lactame nur schlecht in Wasser löslich sind. Innerhalb der eher hydrophoben Tetracycline kann die Wasserlöslichkeit gesteigert werden, indem die Hydrochloride der entsprechenden Tetracycline verwendet. Die eigentliche umweltanalytische Relevanz ergibt sich auch den Anwendungsgebieten und der relativ hohen chemischen Persistenz vieler Antibiotika: Aufgrund der Vielzahl an Antibiotika-Therapien weltweit gelangen die Substanzen über die Exkremente in das Grundwasser und andere Umweltkompartimente. Eines der Hauptprobleme hierbei sind Bakterien, welche die Möglichkeit haben, Resistenzen gegen die oftmals nur in geringen Konzentrationen vorhandenen Antibiotika (z. B. in Abwässern) zu entwickeln. Wird ein Lebewesen mit diesen Bakterien infiziert, so werden bestimmte Antibiotika wirkungslos, wodurch die Entwicklung neuer Antibiotika oder anderer Alternativen (beispielsweise Bakteriophagen) notwendig wird. Aufgrund der oftmals

nur geringen Konzentration der Antibiotika in Abwässern ist die Analytik und die Quantifizierung eine Herausforderung: Die strukturelle Vielfalt und oftmals nur geringe Wasserlöslichkeit der Antibiotika erfordert in den meisten Fällen eine Probenanreicherung in Form der Festphasenextraktion [76] unter Beachtung des pH-Wertes, da viele Antibiotika zu den Amphiphilen bzw. Ampholyten zählen.

3.5 Eigenschaften und Bedeutung der

Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüse (lateinisch *Glandula thyroidea*) ist eine Hormondrüse bei Wirbeltieren, die sich bei Säugetieren unterhalb des Kehlkopfes befindet. Ihren Namen hat sie aufgrund ihrer schildartigen Lage unterhalb des Schildknorpels vor der Luftröhre. Die Schilddrüse und damit auch die dort gebildeten Schilddrüsenhormone Tetraiodthyronin (T4, Levothyroxin) und Triiodthyronin (T3, Liothyronin) [77-79] besitzen wichtige Funktionen im menschlichen Organismus: Sie sind unter anderem für die Entwicklung von Neugeborenen verantwortlich, einschließlich des Gehirns, der Knochen und anderem Körpergewebe. Darüber hinaus sind sie wichtig für die Aufrechterhaltung der Gehirnfunktionen, der Stoffwechselfvorgänge sowie der Körpertemperatur bei Kindern und Erwachsenen [78]. Ist die Funktionsweise der Schilddrüse und damit auch die Hormonproduktion gestört, z. B. durch Hypothyreose oder ist eine Thyreoidektomie aufgrund maligner Entartungen notwendig, ist die anschließende medikamentöse Therapie mit Levothyroxin unerlässlich. Bei der Synthese von Levothyroxin muss strikt auf die internationalen Richtlinien der *EMEA* (European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelagentur) oder auch der *FDA* (Food and Drug Administration, Arzneimittelzulassungsbehörde der USA) geachtet werden. Dies beinhaltet dementsprechend auch die Reinheitskontrolle der Synthesestufen und des Endprodukts während der Synthese und bei der Lagerung [78]. **Tabelle 9** beinhaltet eine Übersicht über Strukturen und eine Auswahl an potentiellen Nebenprodukten bzw. Abbauprodukten bei der Schilddrüsenhormonsynthese:

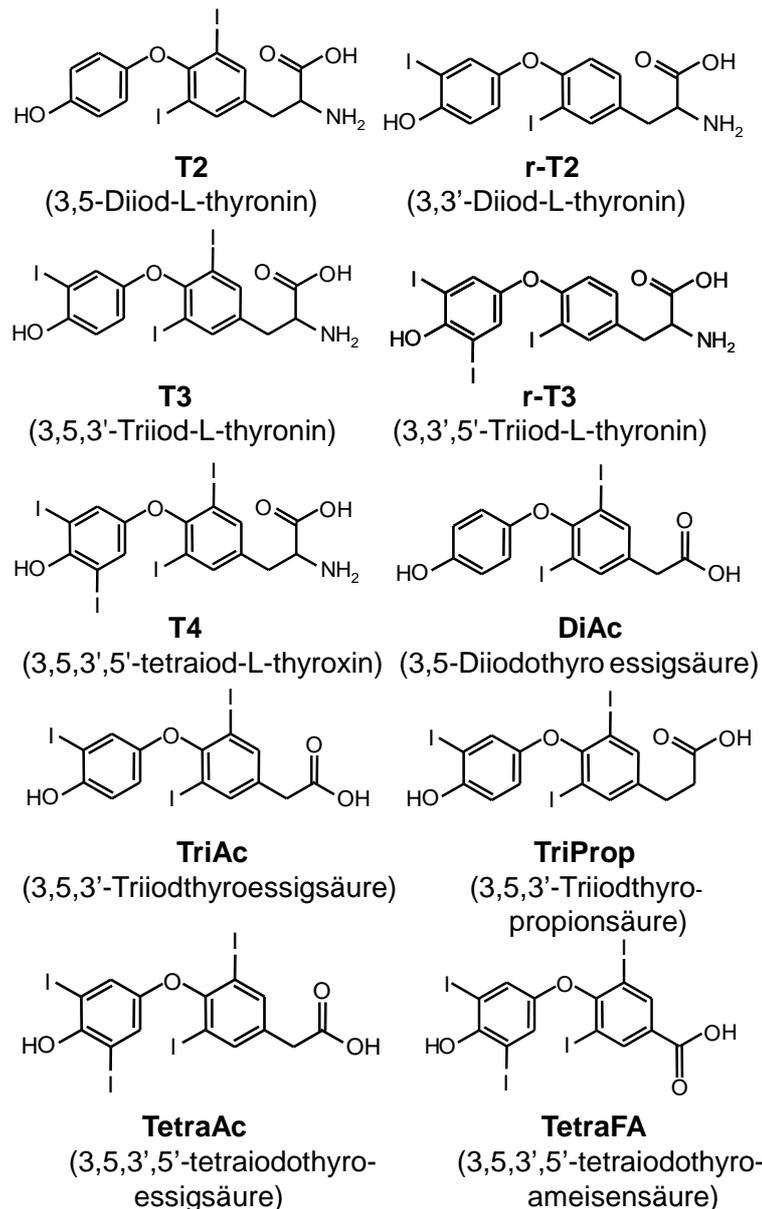


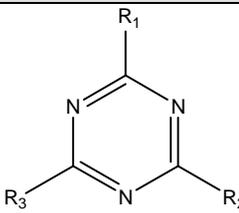
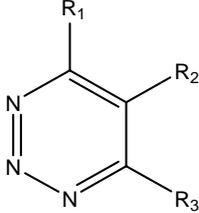
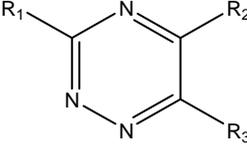
Tabelle 9: Strukturen einiger Schilddrüsenhormone und mögliche Nebenprodukte bei der Synthese von Levothyroxin.

Wie aus **Tabelle 9** hervorgeht, können bei der Schilddrüsenhormonsynthese bzw. deren Lagerung diverse Nebenprodukte entstehen je nach Anzahl der Iodatome und deren Position. Hieraus resultieren unter anderem die Isomere T3 und r-T3 sowie T2 und r-T2. Darüber hinaus sind auch weitere Abspaltungsreaktionen möglich wie etwa die Entfernung der Amin-Gruppe oder diverser Alkyl-Gruppen. Die hier aufgeführten Verbindungen stellen allerdings lediglich einen geringen Prozentsatz an potentiellen Neben- und Abbauprodukten dar.

3.6 Struktur und Bedeutung der Triazine

Triazine [⁸⁰⁻⁸³] bestehen aus einem Benzolring, bei dem drei Kohlenstoffatome durch Stickstoffatome substituiert sind. Davon abgeleitet sind prinzipiell drei konstitutionsisomere Heterocyklen, die sich je nach der Position der Stickstoffatome in asymmetrische, vicinale und symmetrische Triazine unterteilen lassen (**Tabelle 10**):

Tabelle 10: Grundgerüst der symmetrischen, vicinalen und unsymmetrischen Triazine.

Grundkörper des Konstitutionsisomers	Struktur	Triazin-Klasse
1,3,5-Triazin		symmetrische Triazine
1,2,3-Triazin		vicinale Triazine
1,2,4-Triazin		unsymmetrische Triazine

Besonders im Bereich der Umweltanalytik sind die symmetrischen Triazine von Bedeutung, da sie als Herbizide in der Landwirtschaft eingesetzt werden. Hierdurch besteht die grundlegende Gefahr, dass größere Mengen an Triazinen ins Grundwasser gelangen. Triazine wirken auf den Menschen zwar nur bedingt akut toxisch, aber trotzdem sind Haut- oder Augenreizungen möglich. Abgesehen davon sind Triazine hochgradig toxisch für Wasserorganismen und besitzen aufgrund ihrer hohen chemischen Persistenz ein grundwassergefährdendes Potential.

Tabelle 11 gibt eine Übersicht über gängige Triazin-Herbizide und deren Strukturen, die insgesamt relativ ähnlich aufgebaut sind und sich lediglich in der Art ihrer Substituenten (Halogene, (nicht-)substituierte Amino-Gruppen, Thio-Ester etc.) unterscheiden.

Tabelle 11: Übersicht über gängige Triazin-Herbizide inklusive Strukturen.

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃
Ametryn	-S-CH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
Atraton	-O-CH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
Atrazin	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂
Desisopropylatrazin	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH ₂
Prometon	-O-CH ₃	-NH-CH(CH ₃) ₂	-NH-CH(CH ₃) ₂
Terbutylazin	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C(CH ₃) ₃
Simazin	-Cl	-NH-C ₂ H ₅	-NH-C ₂ H ₅
Terbutryn	-S-CH ₃	-NH-C ₂ H ₅	-NH-CH(CH ₃) ₂

Aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit liegen sie im Grundwasser oftmals nur in geringen Konzentrationen vor, weswegen oftmals eine Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion vorgeschaltet werden muss ^[84;85], um adäquate Quantifizierungen durchführen zu können.

Kapitel I

PS/DVB-Monolithen: micro-HPLC-
basierte Anwendungen zur
Trennung kleiner Moleküle

I. PS/DVB-Monolithen: Anwendungen für die Trennung von kleinen Molekülen

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Qualität und Vielfalt von monolithischen Trennmedien aufgrund der verbesserten Syntheseprotokolle kontinuierlich verbessert, so dass mittlerweile eine Vielzahl an Säulenmaterialien und Säulenformaten erhältlich ist [86;87]. Monolithische Disks [88;89], Micro-/Nano-Kapillarsäulen [90-92], Chip-Systeme [93;94], Ionenaustauscher [92], Durchfluss-Reaktoren [95;96] sowie analytische und präparative Säulen [97] decken ein breites Anwendungsspektrum ab [98]. Monolithische Trennmedien zeichnen sich generell durch mehrere Vorteile im Gegensatz zu micropartikulären Trennmedien aus: Hohe Säulenpermeabilitäten und hohe Flussraten in Verbindung mit einem durch Konvektion unterstützten Massentransfer haben einen positiven Einfluss sowohl auf Trenneffizienz als auch auf Produktivität [99]. Nachteilig wirken sich die geringeren Beladungskapazitäten sowie oftmals schlechtere Retention aufgrund des geringeren Phasenverhältnisses aus. Nichtsdestotrotz besitzen insbesondere organische Monolithen den entscheidenden Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Materialien auf Kieselgel-Basis über den gesamten pH-Bereich stabil sind [100].

Monolithische Trennmedien können generell in zwei Kategorien unterteilt werden: Anorganische Kieselgel-Monolithen, die hauptsächlich durch Sol-Gel-Prozesse [101-106] synthetisiert werden sowie organische Monolithen, die mittels verschiedener (Co-)Polymerisationstechniken produziert werden. Üblicherweise werden Kieselgel-Monolithen hauptsächlich für schnelle und effiziente Trennungen kleiner Moleküle oder auch Peptiden verwendet [107-109], wohingegen organische Monolithen hauptsächlich im Bereich der Bioanalytik zur Trennung von Makromolekülen wie Peptiden, Proteinen oder Nukleinsäuren eingesetzt werden [9;110]. Für die Synthese organischer Monolithen steht eine Vielzahl an Basismaterialien und Polymerisationstechniken zu Verfügung, z.B. quervernetzte Polymethacrylate [111;111], Polyacrylamide [112;113] oder Polystyrole [114;115] stellen die am häufigsten verwendeten Materialien dar. Monolithische Trennmedien auf Styrol-Basis entstehen durch radikalisch oder thermisch induzierte Co-Polymerisation von Styrol und

Divinylbenzol unter Verwendung eines Radikalstarters und eines Porogengemisches. Die Art und Menge der Porogene hat hierbei einen entscheidenden Einfluss auf die Porengröße und Phasenmorphologie [59;67;116]. Die Löslichkeit der Polymerketten in den Porogenen bestimmt hierbei die Größe der Globuli („Polymerkügelchen“) und Poren: Eine frühe Phasenseparation führt dabei zu größeren Partikeln und Poren. Die Menge an Quervernetzer hat einen entscheidenden Einfluss auf die Quelleigenschaften des Monolithen. Das „Fine-Tuning“ der Monolithen kann über die Menge an Radikalstarter sowie Polymerisationszeit und –temperatur gesteuert werden [58;68;117]. Während Monolithen auf Kieselgel-Basis typischerweise eine bimodale Porenverteilung mit Meso- und Makroporen besitzen, die sie prädestiniert für die Trennung von kleinen Molekülen, zeichnen sich Monolithen auf Polymerbasis entweder lediglich durch große Makroporen oder eine relative breite Porenverteilung mit relativ wenigen Mesoporen bis hin zu einer Vielzahl an Makroporen aus [118]. Dies führt dazu, dass die Trennung von kleinen Molekülen auf diesen Monolithen nur sehr schwer bzw. gar nicht realisiert werden kann. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Optimierung der Phasenmorphologien von monolithischen PS/DVB-Kapillarsäulen, um diese Art von Monolithen auch für Trennungen kleiner Moleküle verwenden zu können.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet. Die Polyimid-beschichteten amorphen Quarz-Kapillaren stammten von PolyMicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA).

Methanol (gradient grade) wurde von Acros (Geel, Belgien) bezogen. Divinylbenzol (zur Synthese, stabilisiert mit 4-tert-Butylbrenzcatechin, Gehalt an Isomeren: 65%) wurde von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Styrol (puriss., 99.5%), DMF (puriss.), α,α' -Azobisisobutyronitril (pulum), Dichlormethan ($\geq 99.5\%$) und 1-Decanol, (pulum, 95%) wurden bei der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) eingekauft. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal (Goldschmidt-Radikal) (95% freies Radikal), Methacrylsäure-[3-(trimethoxysilyl)-propylester] (98%), Tetrahydrofuran (99.9%, ohne Stabilisator, wasserfrei) und Acetonitril („gradient grade“) wurden von Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben. Divinylbenzol und Styrol wurden vor dem

Gebrauch destilliert, um den Polymerisationsstabilisator 4-tert-Butylbrenzcatechin abzutrennen.

Alle verwendeten Dansyl-Aminosäuren wurden von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) als Hydrochlorid, Cyclohexylammonium- oder Piperidin-Salze bezogen. Der Peptidstandard P2693 (Bradykinin-Fragment 1-5, Vasopressin (Acetat-Salz), Methionin-Enkephalin (Acetat-Salz), Leucin-Enkephalin (Acetathydrat), Oxytocin (Acetathydrate), Bradykinin (Acetat-Salz), LHRH Decapeptid, Bombesin (Acetathydrat) und Substanz P (Acetathydrat) stammt von Sigma (St. Louis, MO, USA) ebenso wie die Proteine Ribonuclease A (Rind), Cytochrom C (Pferdeherz), Insulin (human, E. coli expressed), Lysozym (Hühnereiweiß), α -Lactalbumin (Rindermilch), Myoglobin (Pferd), β -Lactoglobulin A (Rindermilch) und β -Lactoglobulin B (Rindermilch). Hämoglobin (Rind) wurde bei Serva (Heidelberg, Germany). Das Spurr-Harz (Spurr Embedding Kit, hard type) sowie die Size 00 BEEM Embedding Capsules wurden bei Polysciences, Inc. (Warrington, PA, USA) bestellt. 3,5-Diiodo-L-thyronin, 3,5,3'-Triiodo-L-thyronin, 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-thyronin, 3,5-Diiodothyroessigsäure, 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure, 3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure und 3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure wurden von Peptido GmbH (Bexbach, Germany). 3,3'-Diiodo-L-thyronin wurde von der Firma Formula GmbH (Berlin, Germany) synthetisiert, 3,3',5'-Triiodo-L-thyronin und 3,5,3'-Triiodothyro-propionsäure stammen von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Oxacillin (Natriumsalz), Penicillin G und Cefotaxim (Natriumsalz) wurden von Fluka (Buchs, Switzerland) bezogen. Norfloxacin, Ciprofloxacin und Vancomycin wurden bei Sigma (St. Louis, MO, USA) bestellt.

2.2 HPLC-Systeme

2.2.1 HPLC-Apparatur mit Hochdruckgradientensystem

Die Micro/Nano-HPLC-Apparatur mit Hochdruckgradientensystem bestand aus einer Hochdruckgradientensteereinheit (HPLC Central Processor, Bischoff Analysetechnik, Leonberg, Deutschland), welche zwei Laufmittelpumpen „HPLC Compact“ der Firma Bischoff Analysetechnik (Leonberg, Deutschland) steuerte. Das Niederdruckgradientensystem bestand aus einer Komplettapparatur der Smartline-Produktlinie (Firma Knauer, Berlin, Deutschland) und aus einem UV-Detektor („Smartline UV Detector 2500“), dem „Smartline Manager 5000“ mit integriertem Entgaser und einer Pumpe („Smartline Pump 1,000“,

Niederdruckgradientensystem) mit integrierter Mischkammer. Darüber hinaus beinhaltete die Apparatur einen Mini-Thermostat (Eigenbau) sowie einen UV-Detektor (UltiMate UV/VIS-Detektor der Firma LC-Packings – A Dionex Company, Amsterdam, Niederlande), kombiniert mit Durchflusszellen ($V = 3$ nl, Lichtweg: 10 mm, Kapillar-I.D. $20 \mu\text{m}$) von LC Packings – A Dionex Company, Amsterdam, Niederlande. Zur online-Laufmittelentgasung wurde zwischen Laufmittelvorrat und den Pumpen ein Entgaser von Knauer (Berlin, Deutschland) zwischengeschaltet. Beide Laufmittelströme wurden über ein T-Stück (Firma Valco, Schenkon, Schweiz) in eine Mischkammer (Firma Lee, Westbrook, CT) geführt; der anschließende Split erfolgte über ein weiteres T-Stück (Firma Valco, Schenkon, Schweiz). Der selbstgebaute Säulenofen besteht aus einem Kunststoffgehäuse mit einem extern steuerbaren Heizelement sowie einem Ventilator zur gleichmäßigen Erwärmung des Ofeninnenraumes. Der Probengeber (4-Wege-Rotationsinjektor) stammt von der Firma Valco (Schenkon, Schweiz) und ist direkt mit der Trennsäule verbunden.

2.2.2 HPLC-Apparatur mit Niederdruckgradientensystem

Das Niederdruckgradientensystem bestand aus einer Komplettapparatur der Smartline-Produktlinie (Firma Knauer, Berlin, Deutschland) und aus einem UV-Detektor („Smartline UV Detector 2500“), dem „Smartline Manager 5000“ mit integriertem Entgaser und einer Pumpe („Smartline Pump 1,000“, Niederdruckgradientensystem) mit integrierter Mischkammer. Zur Laufmittelentgasung wurde zwischen Laufmittelvorrat und den Pumpen ein Entgaser von Knauer (Berlin, Deutschland) zwischengeschaltet. Der selbstgebaute Säulenofen bestand aus einem Kunststoffgehäuse mit einem extern steuerbaren Heizelement sowie einem Ventilator zur gleichmäßigen Erwärmung des Ofeninnenraumes. Der Probengeber (4-Wege-Rotationsinjektor) stammte von der Firma Valco (Schenkon, Schweiz) und war direkt mit der Trennsäule verbunden.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop wurden am Leibniz-Institut für neue Materialien (INM, Saarbrücken, Deutschland) an einem Gerät der Marke „JEOL SEM 7000F“ (Firma JEOL Ltd., Tokyo, Japan) aufgenommen.

2.4 Silanisierung der Kapillaren

Zur Silanisierung der Kapillarenwand wurden sechs Meter einer amorphen Quarz-Kapillare mit 200 µm oder 100 µm I.D. und 360 µm O.D. zuerst mit 2 ml Methanol, danach mit 2 ml H₂O gespült und im Anschluss mit 2 ml 1 M NaOH befüllt. Die Kapillare wurde an beiden Enden mittels Silikon-Septum verschlossen und für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Danach spülte man die Kapillare erst mit 2 ml destilliertem Wasser, dann mit 2 ml MeOH und blies die Kapillare im Stickstoffstrom trocken. In einem 10-ml-Becherglas wurden daraufhin 5 ml DMF und 1 mg DPPH vermischt und 15 min bei Raumtemperatur mittels Argon entgast. Zu 1 ml dieser Mischung fügte man 1 ml Methacrylsäure-[3-(trimethoxysilyl)-propylester] hinzu, befüllte die Kapillare mit dem Gemisch und verschloss beide Kapillarenden mittels Silikon-Septum. Die Kapillare wurde anschließend für 18 h bei 120 °C gelagert, danach mit je 2 ml DMF, 2 ml MeOH und 2 ml Dichlormethan gespült und eine Stunde bei 90 °C getrocknet.

2.5 Synthese der monolithischen Kapillarsäulen

In einem 5-ml-Becherglas wurden die jeweils gravimetrisch abgemessenen Mengen an Porogen- und Monomergemisch miteinander vermennt und 15 min bei Raumtemperatur mittels Argon entgast. Anschließend wurden die silanisierten amorphen Quarz-Kapillaren mit dem Polymerisationsgemisch befüllt und verschlossen. Danach erfolgte die Polymerisation bei 70 °C in einer thermostatisierten Glasapparatur über einen Zeitraum von 24 h. Zuletzt wurden die monolithischen Trennsäulen über Nacht mit reinem Acetonitril gespült und mittels Kapillarschneider auf die gewünschte Länge zurechtgeschnitten.

2.6 Synthese von Bleimethacrylat

In einen 100-ml-Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Thermometer wurden 10 mg Hydrochinon und 7.715 g Methacrylsäure gegeben. Die Mischung wurde anschließend auf 100-104 °C erhitzt. Danach fügte man 5.0 g Blei(II)-Oxid (12 h getrocknet bei 120 °C) in kleinen Portionen hinzu, bis es sich vollständig löste. Das Synthesegemisch wurde 4 h unter Rückfluss bei 100-104 °C erhitzt; danach wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz mit Cyclohexan versetzt, um das gewünschte Produkt (farbloses Pulver) auszufällen. Nach Vakuumfiltration und 6-fachem

Waschen mit Cyclohexan wurde das Produkt im Luftstrom getrocknet. Man erhielt das Produkt in Form eines farblosen Feststoffs in Ausbeuten von über 95%.

2.7 Synthese des modifizierten Spurr-Harzes

In einen 50-ml-Einhalskolben füllte man 2.5 g Vinylcycloheandioxid (VCD) und justiert den Kolben in einem thermostatisierten Ultraschallbad (45 °C). Im Anschluss fügte man 180 mg Bleimethacrylat hinzu und legte ein Vakuum von mindestens 40 mbar an. Die Reaktionsmischung wurde 60 min entgast. Anschließend wurden die restlichen Komponenten des Spurr-Embedding-Kits hinzugefügt (Spurr-Resin, Hard-Type, 1.0 g D.E.R. 736, 6.5 g NSA, 0.1 g DMAE. Hatten sich alle Komponenten gelöst, wurde die Mischung entgast und das modifizierte Spurr-Resin in eine PEEK-Kapillare (1 m x 750 µm) gefüllt und über eine 30 cm x 750 µm PEEK-Kapillare mit eine HPLC-Pumpe (Knauer, Berlin, Deutschland) verbunden. Das freie Ende der mit dem Spurr-Kit befüllten Kapillare wurde über ein Union mit dem auszuharzenden Monolithen verbunden. Unter Verwendung von Wasser als Förderungsflüssigkeit wurde das Harz durch den Monolithen gepumpt (5-faches Säulenvolumen). Danach wurde der Monolith von beiden Seiten mittels Silikonsepten verschlossen und für 24 h bei 70 °C ausgeharzt. Nach dem Ausharzen wurde die Polyimidschicht des Kapillarmonolithen mittels heißer konzentrierter Schwefelsäure entfernt. Im Anschluss wurde der Monolith für 3 Stunden in Flusssäure getaucht, um die amorphe Quarzkapillare aufzulösen. Daraufhin wurde eine BEEM Embedding-Kapsel (Größe 00) mit konventionellem Spurr-Harz (hard type) befüllt und der Monolith senkrecht in die Kapsel gesetzt. Nach 24 h Ausharzen bei 70 °C konnte der eingebettete Monolith mittels Microtom geschnitten werden und war fertig für die weiteren TEM-Aufnahmen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Physikalische und chromatographische Charakterisierung der PS/DVB-Monolithen

3.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

3.1.1.1 Klassisches Polymerisationsgemisch für Biopolymere

Zur Charakterisierung der Phasenmorphologien im Hinblick auf die radiale Homogenität eignet sich die Rasterelektronenmikroskopie (REM), bei der allerdings nur ein kleiner Bereich des Monolithen dargestellt werden kann. **Abbildung 33** beschreibt die Zusammensetzung des Synthesegemisches für PS/DVB-Monolithen, die für die Trennung von Biopolymeren optimiert wurde.

Zusammensetzung des Synthesegemisches für den Monolithen mit Standardgemisch

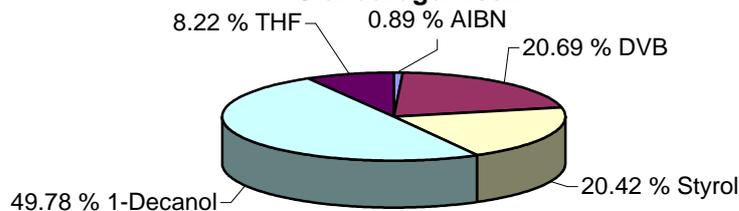


Abbildung 33: Zusammensetzung des Synthesegemisches für die Trennung von Biopolymeren (Angaben in Gewichtsprozent).

Betrachtet man die Morphologien aus verschiedenen Batches, erkennt man die gute Reproduzierbarkeit der Morphologien (**Abbildung 35**), die Globuli in der Größenordnung von 200-800 nm liefern. **Abbildung 34** enthält REM-Aufnahmen von drei verschiedenen Batches aus einer Zeitspanne von einem Jahr und von unterschiedlichen Personen. In allen Batches sind ähnliche Morphologien zu erkennen, wobei sich hier hauptsächlich die Größe der Globuli voneinander unterscheiden. Diese REM-Aufnahmen verdeutlichen die Schwierigkeit der reproduzierbaren Synthese von monolithischen Kapillarsäulen. Die vergleichsweise schlechtere Qualität der REM-Aufnahme von **Abbildung 34A** lässt sich durch elektrische Aufladungseffekte erklären, da diese Probe nicht wie Probe B und C mit Kohlenstoff bedampft wurde. Die hier gezeigten REM-Aufnahmen dienen lediglich dem visuellen Vergleich eines Ausschnitts der Morphologien.

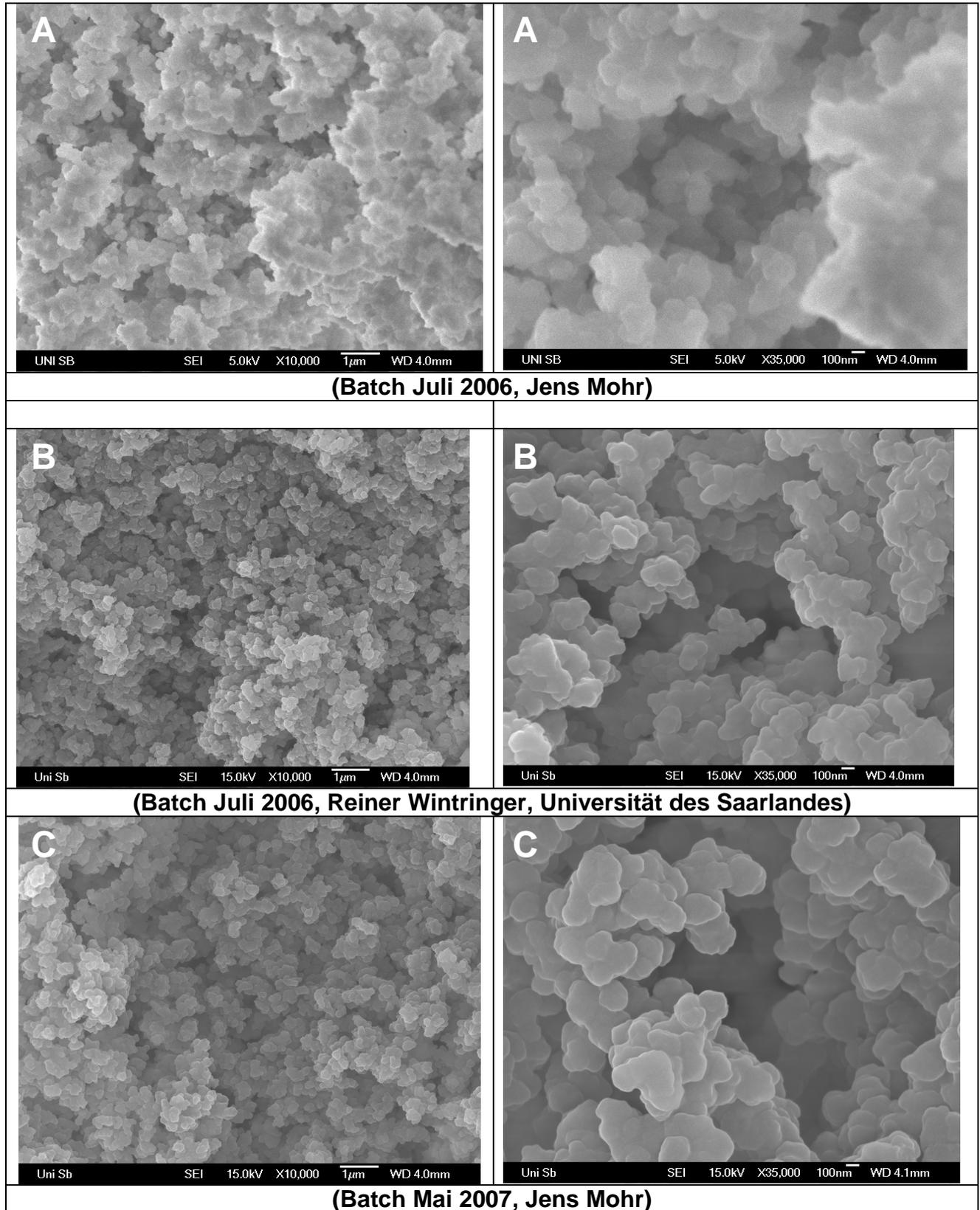
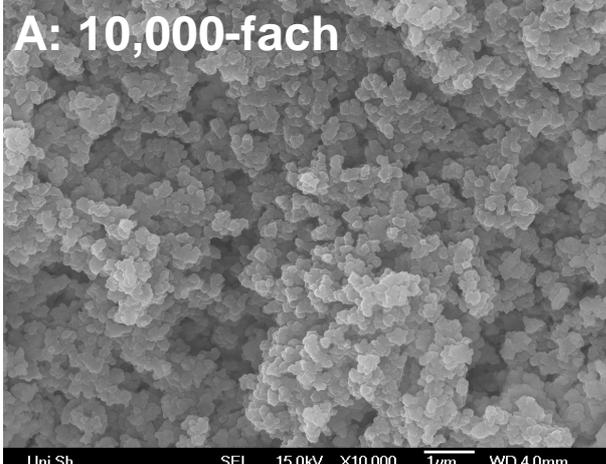
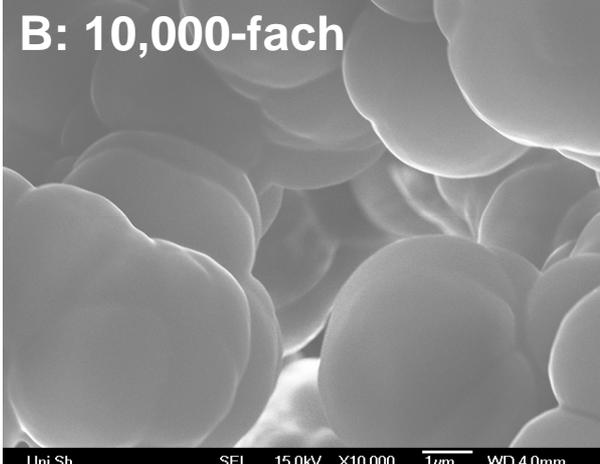


Abbildung 34: REM-Aufnahmen von 3 verschiedenen Monolithen aus verschiedenen Batches: A: Batch Juli 2006 (Monolith synthetisiert von Jens Mohr); B: Batch Juli 2006 (Monolith synthetisiert von Reiner Wintringer), Universität des Saarlandes; C: Batch Mai 2007 (Monolith synthetisiert von Jens Mohr); 10,000-fach bzw 35,000-fach vergrößert.

3.1.1.2 Chloroform als Porogen

Um die Phasenmorphologien für die Trennung kleiner Moleküle zu optimieren, wurde das häufig benutzte Microporogen Tetrahydrofuran (THF) durch Chloroform ersetzt und mittels REM-Aufnahmen überprüft, welchen Einfluss der Porogenwechsel auf die Phasenmorphologie des Monolithen hat. Wie **Abbildung 35** zu entnehmen ist, hat der Porogenwechsel einen erheblichen Einfluss auf die Größe der Poren und Globuli: Mit Chloroform erreichen die Globuli eine Größe von mehreren Mikrometern, was der mehr als 20-fachen Größe der Globuli mit THF entspricht. Auch die Größe der Makroporen (→ Durchflusskanäle) ist beim Chloroformansatz um das mehr als 30-fache erhöht. Hiermit lassen sich einige Charakteristika dieser Monolithen erklären:

- Die Größe der Makroporen erklärt die extrem hohe Permeabilität der Chloroform-Monolithen (Gegendruck ca. 50 bar für einen 300 x 0.2 mm I.D. Monolithen bei einer Flussrate von 4.5 µl/min; Laufmittel: Wasser + 0.050% TFA).
- Durch die Größe der Globuli ist die für die chromatographische Interaktion zur Verfügung stehende Oberfläche nicht groß genug für effiziente Trennungen.

Klassischer Monolith für Biopolymere	Chloroform als Porogen
Styrol: 20.42% Divinylbenzol: 20.69% AIBN: 0.89% 1-Decanol: 49.78% THF: 8.22%	Styrol: 20.42% Divinylbenzol: 20.69% AIBN: 0.89% 1-Decanol: 49.78% Chloroform: 8.22%
	

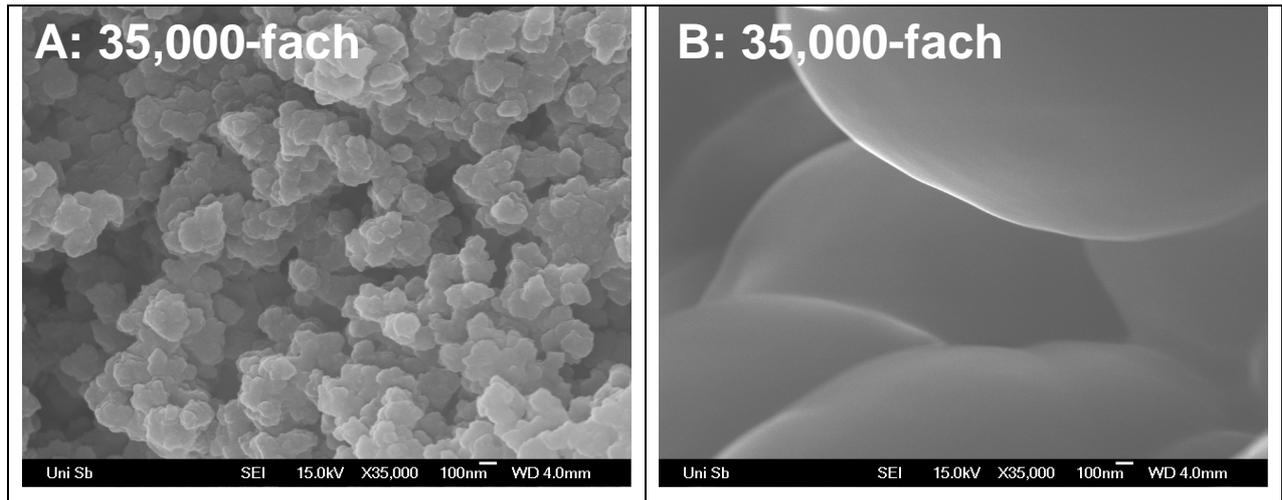


Abbildung 35: Vergleich zwischen THF (A) und Chloroform (B) als Porogen in 10,000- und 35,000-facher Vergrößerung.

3.1.1.3 Erhöhter THF-Gehalt im Porogengemisch

Ein weiterer Ausgangspunkt zur Optimierung der Trenneffizienz stellt die Erhöhung des THF-Anteils im Porogengemisch dar, wie es bereits in meiner Diplomarbeit (2007, Universität des Saarlandes) beschrieben wurde. Im Rahmen dieser Dissertation wird die in der Diplomarbeit beschriebene Mischung (**Abbildung 36**) näher charakterisiert und stellt die Basis für weitere wichtige chromatographische und physikalische Charakterisierungen dar.

Zusammensetzung des Synthesegemisches für Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil

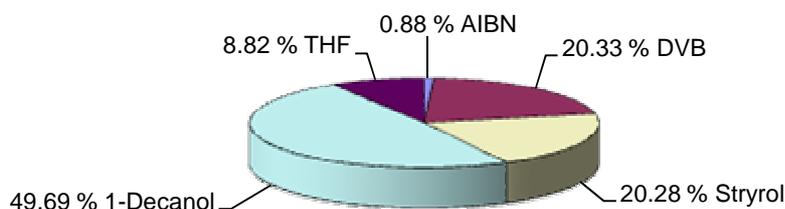


Abbildung 36: Zusammensetzung des Synthesegemisches für Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil (Angaben sind in Massenprozent).

Wie **Abbildung 37** zu entnehmen ist, hat die Porogenmenge einen signifikanten Einfluss auf die Phasenmorphologie. Durch Erhöhung des THF-Anteils von 8.22% im klassischen Gemisch für Biopolymertrennungen auf 8.82% auf Kosten der

Monomerkomponenten hat sich die Größe der Globuli und Makroporen deutlich verändert: Die Phasenmorphologie des klassischen Gemisches ergibt sehr kleine Globuli in Kombination mit kleinen Makroporen, wohingegen der Ansatz mit erhöhtem THF-Anteil deutlich größere Globuli und Makroporen liefert (**Abbildung 37**). Theoretisch sollte eine Erhöhung des THF-Anteils aufgrund der besseren Löslichkeit der Polymerketten im Porogemisch zu kleinen Globuli und einer größeren Oberfläche des monolithischen Skeletts führen, was den experimentellen Ergebnissen widerspricht. In diesem Fall lieferte der erhöhte THF-Anteil im Porogemisch größere Globuli und größere Makroporen in Kombination mit einem deutlich erniedrigten Säulengegendruck. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Totalporosität des monolithischen Polymers erhöht ist; z.B. durch die Tatsache, dass die Porogenmenge auf Kosten der Monomere erhöht wurde, wodurch weniger Material für die Ausbildung des Monolithen vorhanden ist. Dies kann unter anderem zu einer Erniedrigung des Säulengegendrucks führen. Das unerwartete Ergebnis von größeren Globuli kann auf die Koaleszenz kleinerer Globuli während der Polymerisation zurückgeführt werden.

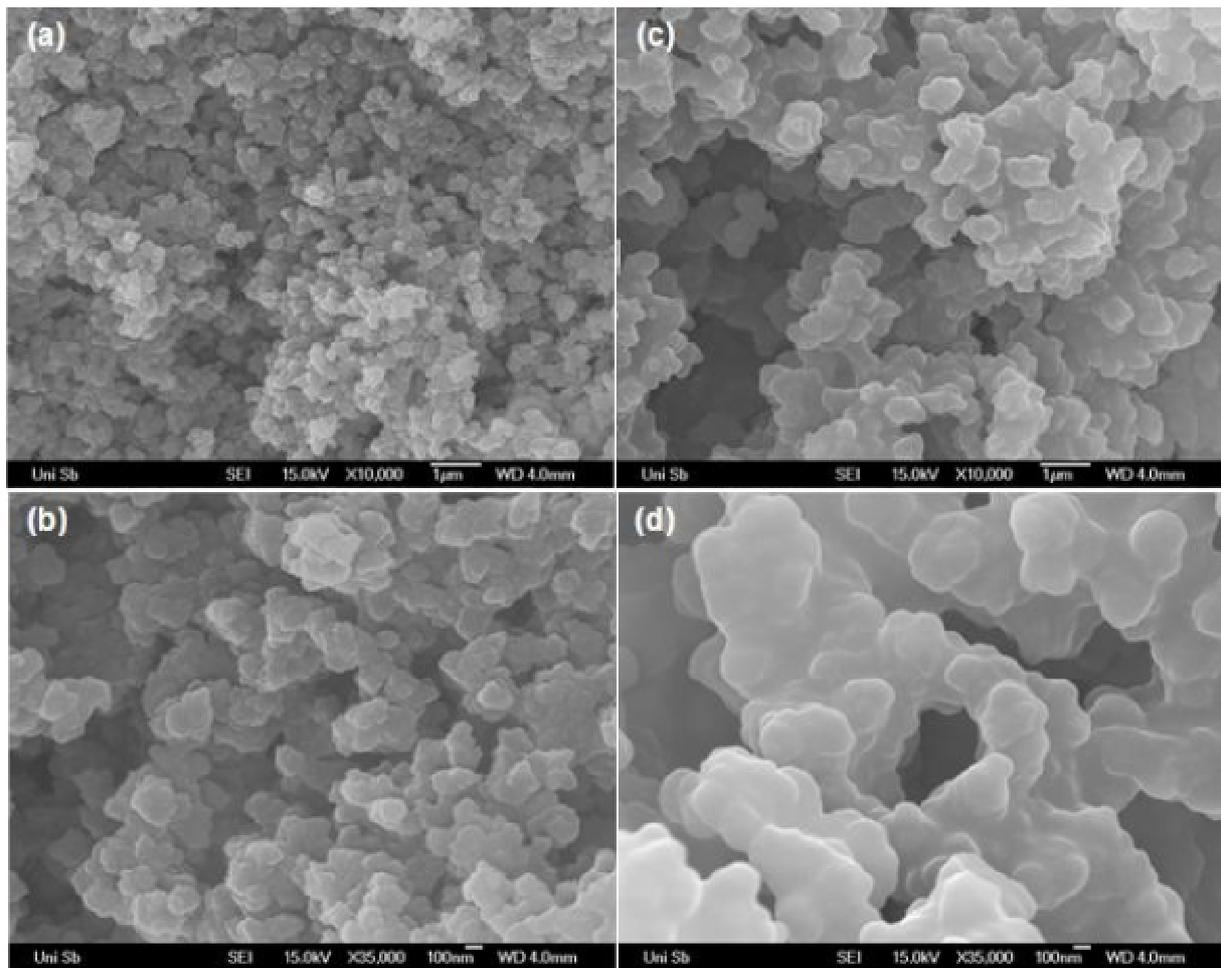


Abbildung 37: REM-Aufnahmen von PS/DVB-Monolithen mit klassischem Gemisch für Biopolymertrennungen (a,b) und der modifizierten Polymerisationsmischung mit erhöhtem Anteil an THF (c,d).

Wie in **Abbildung 38** illustriert, ist die Reproduzierbarkeit der Phasenmorphologie aus verschiedenen Batches durch den optischen Vergleich der Phasenmorphologien im Hinblick auf Homogenität, Größe der Globuli (500-1000 nm) und Größe der Makroporen akzeptabel. Allerdings ist hierbei darauf zu achten, dass hier lediglich nur ein kleiner Teil des Monolithen gezeigt wird, weswegen hierdurch rein deskriptive Beobachtungen zur Illustration verwendet werden müssen. Dieser rein optische Vergleich dient lediglich dem visuellen Vergleich der Morphologien; die spätere Charakterisierung der Monolithen erfolgt über Fluss/Kurven und die chromatographische Trenneffizienz und Reproduzierbarkeit der Analysen. Nichtsdestotrotz geben die REM-Aufnahmen einen guten visuellen Überblick über die Phasenmorphologien.

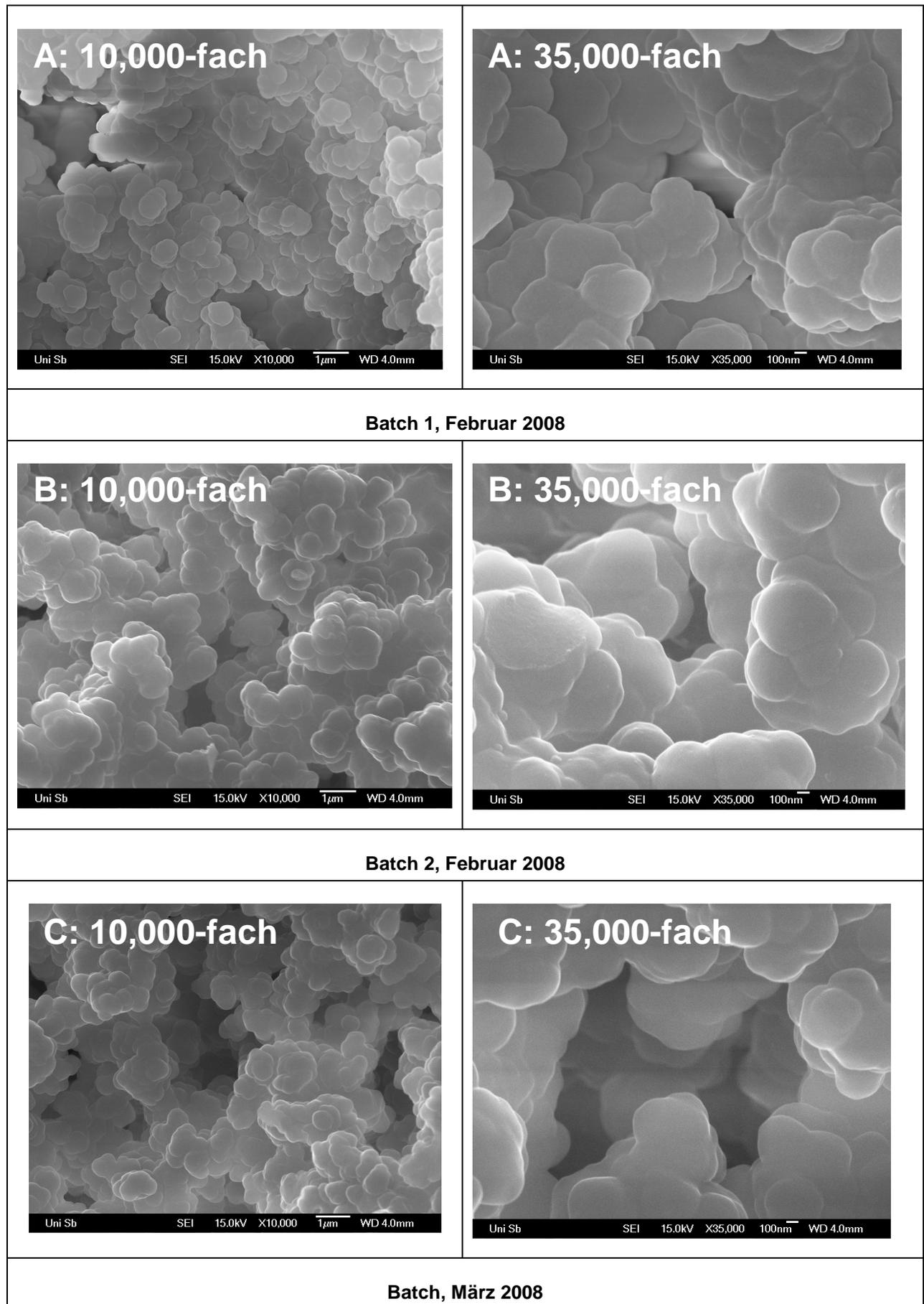


Abbildung 38: Morphologien der Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil aus 3 verschiedenen Batches.

3.1.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Neben dem Rasterelektronenmikroskop besteht auch die Möglichkeit der Charakterisierung der Phasenmorphologie mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Bei den Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop erhält man sehr gute Einblicke in die radiale Homogenität des Monolithen sowie Einheitlichkeit und Größe der Globuli. Was hierbei zu kurz kommt, ist die genaue Größe und Tiefe der Makroporen. Daher wurde ein neuer Ansatz gewählt, bei dem die Monolithen mit einem Kontrastpolymer (mit Bleimethacrylat modifiziertes Spurr-Harz) befüllt werden, um ein Negativ des Porenusters erstellen zu können. Wichtig hierbei für das TEM ist die Tatsache, dass das Kontrastpolymer elektronenreicher wie das PS/DVB-Material sein muss und keine Luftblasen zurückbleiben dürfen. Nach dem Ausharzen wird die Quarzschicht des Kapillarmonolithen entfernt und der Monolith in herkömmliches Spurr-Harz eingebettet. Danach wird der Monolith mittels Microtom in 20-50 nm dicke Scheiben geschnitten und mittels TEM untersucht.

Wie in **Abbildung 39** dargestellt, funktionierte das Einfüllen und Ausharzen des Monolithen. Bei diesen Bildern handelt es sich um REM-Aufnahmen, die belegen, dass das verwendete Harz zum vollständigen Ausfüllen der Poren des Monolithen geeignet ist. Dies erkennt man deutlich an den Stellen, wo das PS/DVB-Material durch den Schneidvorgang herausgebrochen ist und das Negativ der Poren deutlich erkennbar ist. Problematisch war allerdings das Schneiden der Scheiben mittels Microtom, bei dem das PS/DVB-Material zerbrechen kann bzw. wie in **Abbildung 39A** im oberen Bildabschnitt zu sehen ist, können Luftblasen und nicht ausgeharzte Stellen die Qualität der Aufnahmen verschlechtern. Dies wird insbesondere dann problematisch, wenn versucht wird, sukzessiv mehrere Scheiben hintereinander zu schneiden, um hieraus ähnlich wie bei einer Computertomographie ein dreidimensionales Bild zu erschaffen.

Nichtsdestotrotz erkennt man deutlich die Phasenmorphologie des Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil, die eine Größe der Globuli von ca. 1 μm zeigt, was für Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil einen charakteristischer Wert darstellt. Darüber hinaus erhält man wichtige Hinweise auf die Ausmaße der Makroporen: Man erkennt deutlich, dass mehr als 50% des Monolithen lediglich aus Durchflusskanälen bestehen, was die enorme Permeabilität der modifizierten Monolithen (200-240 bar für einen 300 x 0.2 mm I.D. Monolithen bei einem Fluss von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Eluent: Wasser + 0.050% TFA) erklärt.

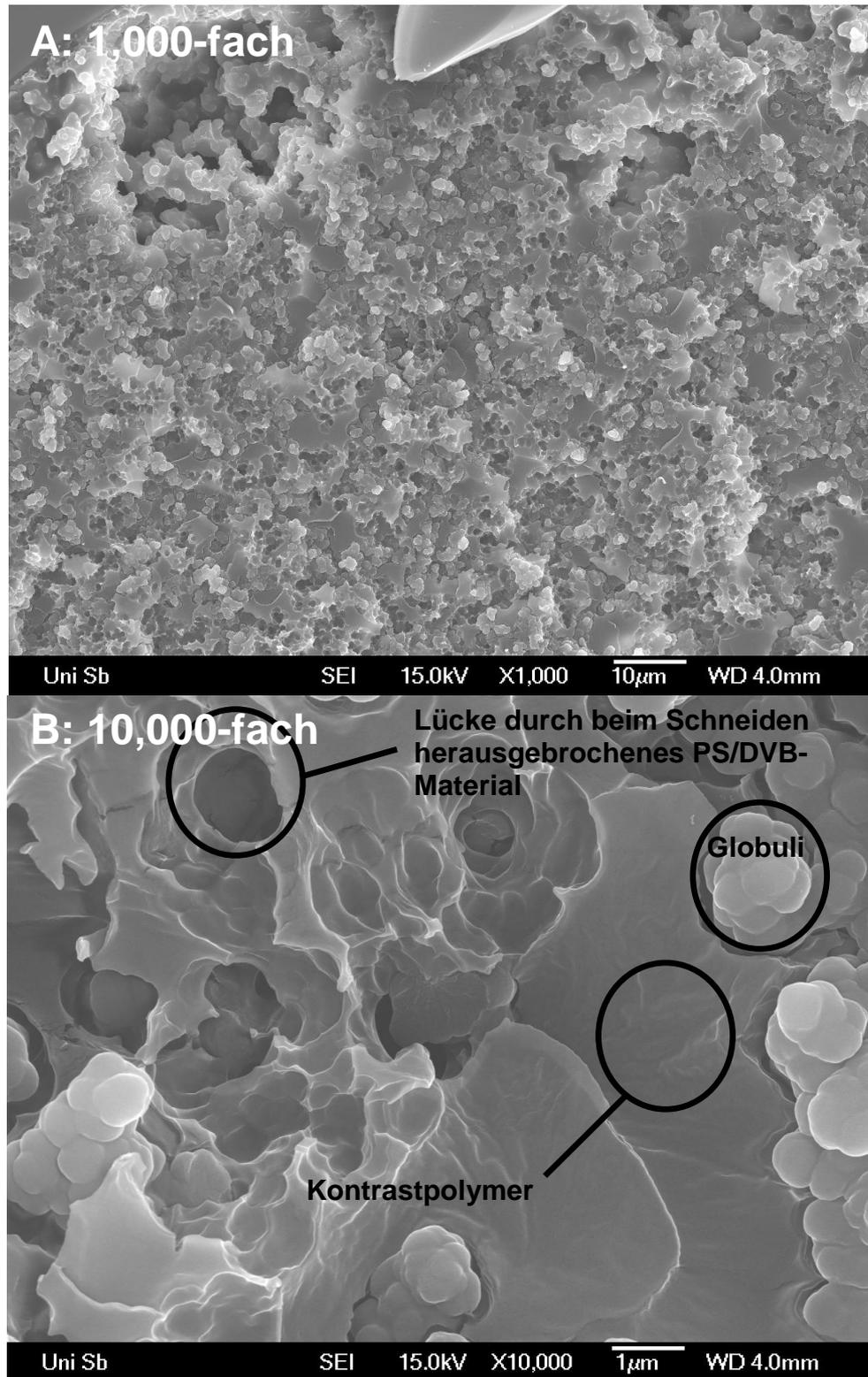


Abbildung 39: Ausgeharzter PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil im Porogemisch und anschließende REM-Untersuchung (Scheibendicke 50 nm), A: 1,000-fache Vergrößerung, B: 10,000-fache Vergrößerung.

3.1.3 Mechanische Stabilität und Quellverhalten der Monolithen

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Phasenmaterialien für die HPLC liegt in ihrer mechanischen Stabilität und Quellanfälligkeit, wenn es sich um Polymere handelt.

Zur genauen Charakterisierung dieser Parameter empfehlen sich Fluss/Druck-Kurven, bei denen man den Druckabfall bei mehreren Flüssen und verschiedenen gängigen Laufmitteln bis zum maximal möglichen Druck aufnimmt. Kann ein linearer Zusammenhang zwischen den Werten für ein Laufmittel gefunden werden, wird das Material nicht komprimiert und besitzt eine hohe mechanische Stabilität, die für HPLC-Anwendungen in den gängigen Druckbereichen (bis 400 bzw. aktuell bis über 1000 bar). Weichen die Messwerte signifikant von einer Geraden ab, spricht dies für eine mechanische Verformung des Materials.

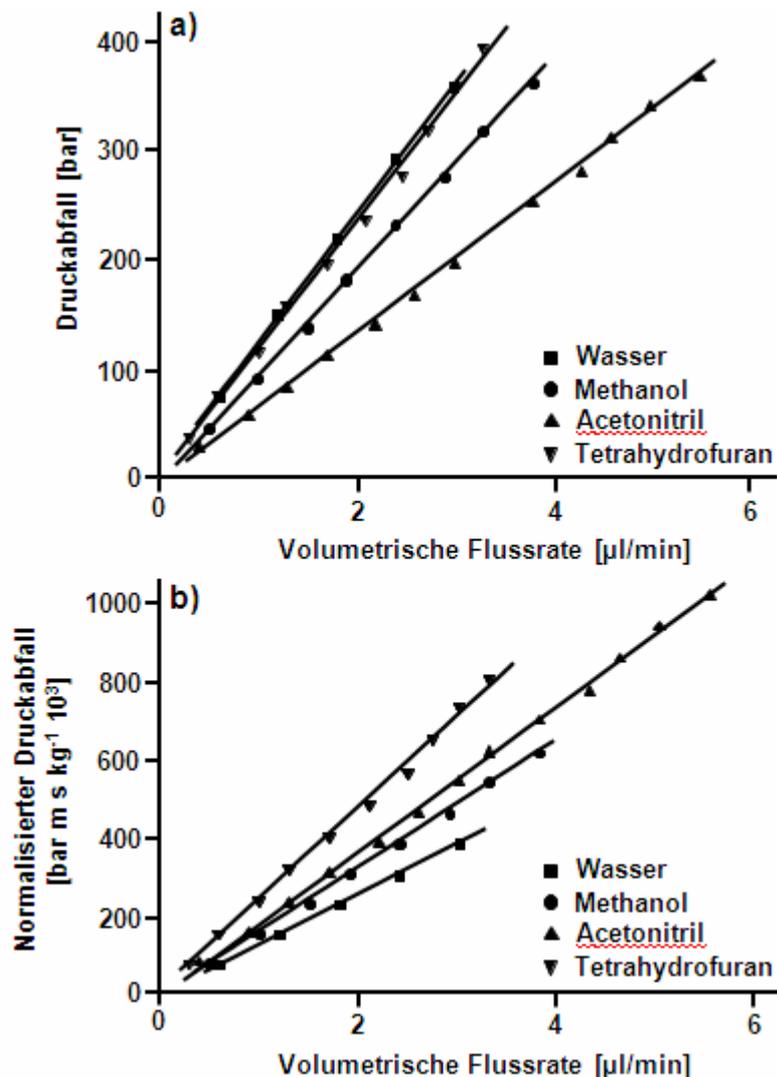


Abbildung 40: Fluss/Druck-Kurve (a) und auf Viskosität normalisierter Druckabfall, aufgetragen gegen die volumetrische Flussrate (b) eines Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil unter der Verwendung mehrerer Laufmittel. Säule: PS/DVB-Monolith, 300 x 0.2 mm I.D., Eluenten: (■) Wasser, (●) Methanol, (▲) Acetonitril, (▼) Tetrahydrofuran; Temperatur, 20 °C.

Praktisch alle porösen organischen Polymere neigen zu signifikantem Quellen, Folglich ändert sich der Gegendruck der Säule permanent bei Laufmittelgradienten, wodurch das Polymer deformiert werden kann. Um die mechanische Stabilität von Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil zu testen, wurde der Säulengegendruck bei 20 °C bis zum maximal realisierbaren Druck (400 bar, Limit des verwendeten HPLC-Systems) bei Flussraten von 0 bis 6 µl/min unter Verwendung der gängigsten HPLC-Eluenten (Wasser, Methanol, Acetonitril und THF) gemessen (**Abbildung 40**). Man erkennt deutlich den linearen Zusammenhang zwischen volumetrischer Flussrate und Gegendruck der Säule mit Regressionsfaktoren von 0.9990 oder besser. Die Ausnahme bildet hierbei THF (R= 0.9975). Die Verwendung von Acetonitril, welches die geringste Viskosität der verwendeten Eluenten besitzt, führte zu den kleinsten Gegendrücken der Säule, z.B. 132 bar bei einer Flussrate von 2.0 µl/min. Der höchste Druckabfall wurde mit Wasser detektiert (240 bar bei 2.0 µl/min). Theoretisch sollte der Druckabfall in direktem Zusammenhang mit der Viskosität der verwendeten Eluenten einhergehen. Demensprechend lag der Gegendruck des Monolithen unter Verwendung von Methanol zwischen den Werten von Acetonitril und Wasser (190 bar bei 2.0 µl/min), da Methanol viskoser als Acetonitril ist, aber keine so hohe Viskosität wie Wasser besitzt. Die Ausnahme hierbei stellte THF dar, welches einen ähnlichen Gegendruck wie Wasser lieferte (233 bar bei 2.0 µl/min), aber eine Viskosität besitzt, die zwischen der von Acetonitril und Methanol liegt. Demnach liegt der Grund für den hohen Gegendruck in den Quelleigenschaften des PS/DVB-Copolymers: Durch die Verwendung von THF quillt das Polymer, wodurch die Poren kleiner und der Gegendruck der Säule größer wird. Da der Gegendruck von THF aber immer noch geringer als der von Wasser ist, kann man die Monolithen aufgrund des moderaten Quellverhaltens problemlos mit THF als Laufmittel betreiben. Normalisiert man den Druck auf die Laufmittelviskosität (**Abbildung 42b**), erkennt man, dass die Druck/Viskositäts-Verhältnisse im Einklang mit den Solventpolaritäten sind: Mit abnehmender Solventpolarität nimmt das Quellverhalten des Polymers leicht zu. Nichtsdestotrotz können die modifizierten Monolithen (300 x 0.2 mm I.D.) ohne Probleme mit allen getesteten Laufmitteln bis zu Flussraten von 2.8 µl/min bei Raumtemperatur ohne den gängigen Maximaldruck von 400 bar einer herkömmlichen HPLC-Apparatur zu überschreiten, betrieben werden. Erhöht man die Temperatur, sind deutlich höhere Flussraten realisierbar.

3.1.4 Van-Deemter-Kurve für Dansyl-Asparagin

Die Trenneffizienz der modifizierten PS/DVB-Monolithen wurde zuerst mittels einer Van-Deemter-Kurve für Dansyl-Asparagin als Beispiel eines kleinen Moleküls bestimmt [2]. Das Experiment beinhaltete die Injektion von Dansyl-L-Asparagin (500 pg/μl) auf einen 300 x 0.2 mm I.D. Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil mit isokratischer Elution bei verschiedenen Lineargeschwindigkeiten zwischen 0.09 und 3.21 mm/s. Im Anschluss wurden die jeweiligen Bodenhöhen berechnet und gegen die Lineargeschwindigkeit aufgetragen [2]. Die aufgenommenen Daten wurden mittels der vereinfachten Van-Deemter-Gleichung gefittet (**Abbildung 41**), um die jeweiligen Beiträge der Eddy-Dispersion (A), der Longitudinaldiffusion (B) und dem Massentransfer (C) zur Bandenverbreiterung zu bestimmen.

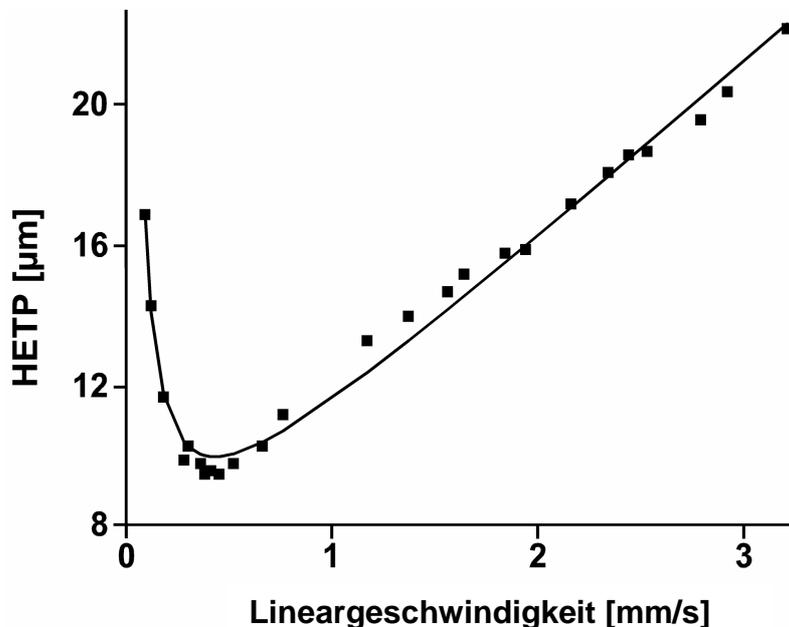


Abbildung 41: Van-Deemter-Kurve für Dansyl-L-Asparagin: Säule: PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, 300 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, 5% Acetonitril in 0.050% wässriger TFA, Lineargeschwindigkeiten: 0.09 – 3.21 mm s⁻¹, Temperatur 50 °C; UV-Detektion, 220 nm; 500 nL von 500 pg μL⁻¹ Dansyl-Asparagin.

Die berechneten Werte ergaben eine minimale Bodenhöhe von 9.9 μm bei einer Lineargeschwindigkeit von 0.41 mm/s, was einer volumetrischen Flussrate von 0.59 μl/min entspricht. Legt man der minimalen Bodenhöhe die Faustregel von Halasz [119] zugrunde, welche besagt, dass der H-Wert einer gut gepackten Säulen ungefähr dem 3-fachen Partikeldurchmesser entspricht, lässt sich für den Monolithen ein virtueller Teilchendurchmesser berechnen, der $9.9 \mu\text{m}/3 = 3.3 \mu\text{m}$ beträgt. Somit entspricht die Trenneffizienz des Monolithen einer vergleichbaren Säule, die mit 3.3

µm Teilchen gepackt ist. Aus der minimalen Bodenhöhe von 9.9 µm lässt sich eine Bodenzahl von über 30,000 für die Säule bestimmen, was einer Bodenzahl von über 100,000 pro Meter entspricht und die hohe Trenneffizienz bei gleichzeitig hoher Permeabilität des Monolithen für Dansyl-Asparagin hervorhebt. Die berechneten Werte für den A-, B- und C-Term sind in **Tabelle 12** zusammengefasst und wurden mit den Werten eines Oligonucleotids auf einem klassischen Monolithen verglichen. *Oberacher et al.* [114] berechneten für das Oligonucleotid (dT)₁₆ eine minimale Bodenhöhe von 8.6 µm bei einer Lineargeschwindigkeit von 0.71 mm/s, was einer volumetrischen Flussrate von 0.97 µl/min entspricht. Hieraus ergaben sich generell vergleichbare Trenneffizienzen mit ähnlichen Werten, zum Beispiel betrug die Longitudinaldiffusion in beiden Fällen ungefähr 0.9 µm mm s⁻¹. Die Eddy-Dispersion war mit einem Wert von 5.49 µm für Dansyl-Asparagin etwas schlechter, wohingegen der Wert für den Massentransfer (5.13 µm mm⁻¹ s⁻¹) für Dansyl-Asparagin 16% kleiner war. Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass Oligonucleotide und Dansyl-Aminosäuren deutlich unterschiedliche Diffusionskoeffizienzen besitzen.

Tabelle 12: Vergleich der Eddy-Dispersion, Longitudinaldiffusion und dem Massentransfer zwischen einem Oligonucleotid (dT)₁₆ auf einem 55 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolithen und Dansyl-L-Asparagin auf einem 300 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolithen

Säulentyp	Substanz	Eddy-Dispersion, A [µm]	Longitudinaldiffusion, B [µm mm s ⁻¹]	Massentransfer, C [µm mm ⁻¹ s ⁻¹]
300 x 0.20 mm I.D. Monolith	Dansyl-L-Asparagin	5.49	0.95	5.13
55 x 0.2 mm I.D. Monolith	(dT) ₁₆	3.0	0.9	6.1

Somit zeigt die Van-Deemter-Kurve deutlich, dass es möglich ist, kleine Moleküle mit einer ähnlichen Effizienz wie bei Biopolymeren auf monolithischen PS/DVB-Phasen zu trennen.

3.2 Trennung von Parabenen

Als Beispiel für die Trennung von kleinen Molekülen auf PS/DVB-Monolithen sollen in diesem Kapitel die Parabene diskutiert werden, welche in der Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt werden [120;121]. Wie bereits in meiner Diplomarbeit untersucht, verbessert sich die Trenneffizienz für Parabene unter Verwendung des modifizierten Polymerisationsgemisches mit erhöhtem THF-Anteil deutlich. Speziell für Parabentrennungen wurde eine weitere Polymerisationsmischung mit erhöhtem Decanol-Anteil untersucht (**Tabelle 13**), doch auch diese Mischung brachte keine weitere Verbesserung der Trenneffizienz

Tabelle 13: Übersicht über die getesteten Polymerisationsmischungen für Parabene.

Säule	Menge [Massenprozent]
60 x 0.2 mm I.D. (Standardpolymerisationsmischung, optimiert für die Trennung von Biopolymeren) (siehe auch Diplomarbeit Jens Mohr)	0.89% AIBN 20.69% Divinylbenzol 20.42% Styrol 49.78% 1-Decanol 8.22% THF
150 x 0.2 mm I.D. (erhöhter THF-Anteil zur Trennung kleiner Moleküle) (siehe auch Diplomarbeit Jens Mohr)	0.89% AIBN 20.82% Divinylbenzol 20.55% Styrol 48.95% 1-Decanol 8.79% THF
300 x 0.2 mm I.D. (erhöhter Macroporogen-Anteil)	0.87% AIBN 20.13% Divinylbenzol 20.09% Styrol 50.54% 1-Decanol 8.37% THF

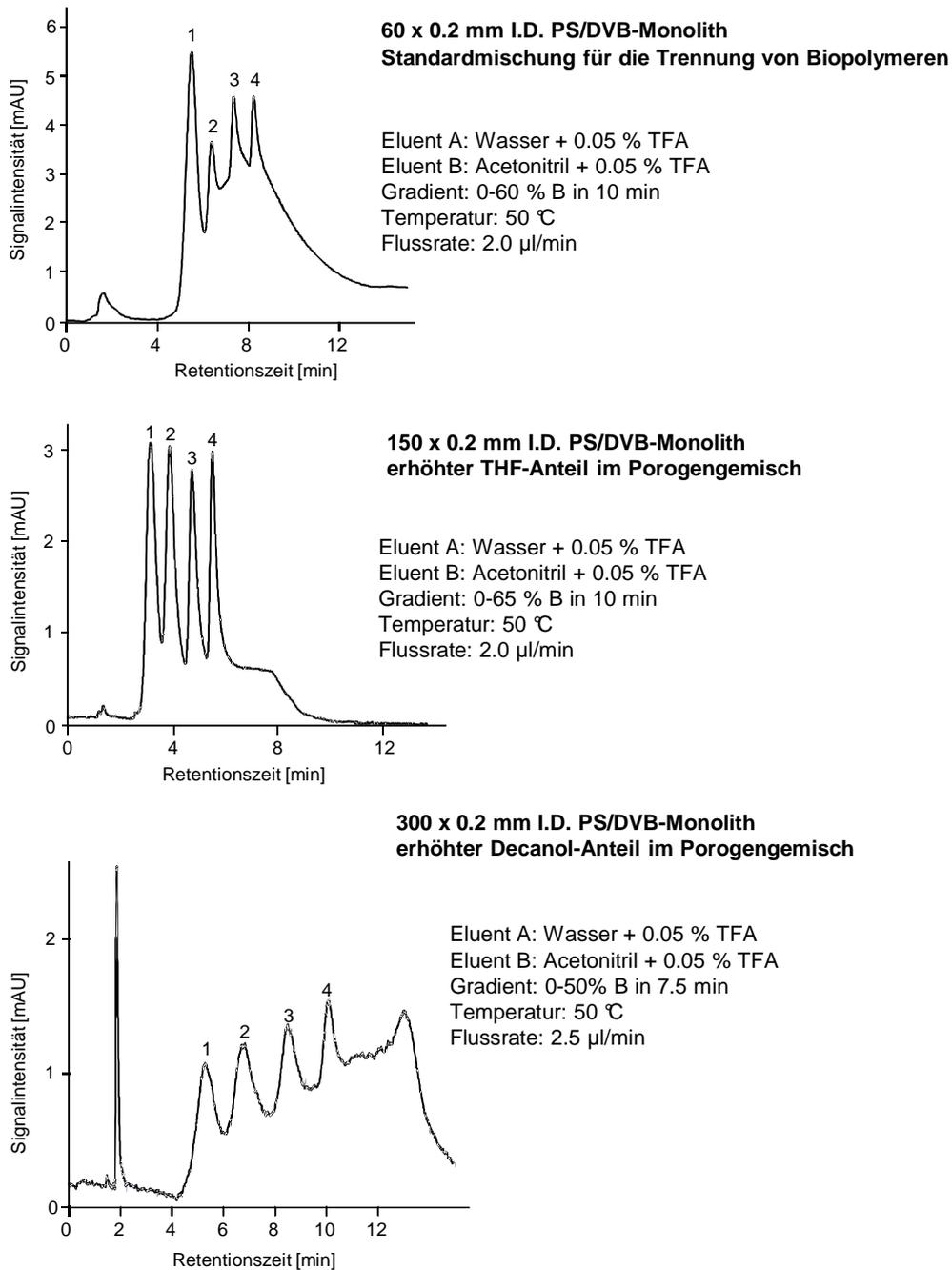


Abbildung 42: Trennung von Methylparaben (1), Ethylparaben (2), Propylparaben (3) und Butylparaben (4) auf drei verschiedenen Monolithen.

Wie **Abbildung 42** und **Tabelle 14** zu entnehmen ist, zeigt der konventionelle Monolith die schlechteste Trenneffizienz für Parabene, da in diesem Falle alle Komponenten nur angetrennt sind. Durch Verwendung der Polymerisationsmischung mit erhöhtem THF-Anteil kann die Trenneffizienz deutlich verbessert werden, was sich in besserer Auflösung trotz steilerem Gradienten zeigt. Die Verwendung des Polymerisationsgemisches mit erhöhtem Decanol-Anteil brachte keine weitere Verbesserung der Trenneffizienz.

Tabelle 14: Peakhalbwertsbreiten und Asymmetriefaktoren bzgl. der Parabentrennungen auf drei verschiedenen Monolithen.

	60 x 0.2 mm I.D. (Standardmischung für Biopolymere)	150 x 0.2 mm I.D. (erhöhter THF- Anteil)	300 x 0.2 mm I.D. (erhöhter Decanol- Anteil)
w _h (Methylparaben) [min]	0.500	0.370	0.656
w _h (Ethylparaben) [min]	n.a.	0.330	0.668
w _h (Propylparaben) [min]	n.a.	0.290	0.564
w _h (Butylparaben) [min]	n.a.	0.250	0.397
T (Methylparaben)	0.97	1.09	1.02
T (Ethylparaben)	n.a.	1.53	1.03
T (Propylparaben)	n.a.	1.62	1.21
T (Butylparaben)	n.a.	2.17	1.28
Konzentration der Parabenmischung: je 5 ppm pro Paraben Eluent A: Wasser + 0.050% TFA Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA UV-Detektion bei 254 nm			

Auffällig bei allen Trennungen unter Verwendung verschiedener Gradienten und Monolithen ist die Tatsache, dass die Peaks durchgehend eine sehr gute Symmetrie besitzen mit Asymmetriefaktoren zwischen 1 und 1.6. Im Gegensatz dazu sind die Peakhalbwertsbreiten in allen Fällen deutlich größer als 20 Sekunden selbst für kurze Gradienten von 10 min oder weniger, was auf die schlechte Trenneffizienz der Säulen zurückzuführen ist. Dabei wird allerdings deutlich, dass die Verwendung modifizierter Polymersationsmischungen deutlich bessere Ergebnisse liefert als die Standardmischung für die Trennung von Biopolymeren. Bei der Trennung auf dem 60 x 02. mm I.D. Monolithen eluieren die Peaks in einem Zeitfenster von 5 min mit

einer Peakhalbwertsbreite von 0.5 min; bei der Trennung auf dem 150 x 0.2 mm Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil erfolgte die Elution der Parabene innerhalb von ca. 4 min bei einer durchschnittlichen Peakhalbwertsbreite von 0.32 min. Auf dem 300 x 0.2 mm Monolithen mit erhöhtem Decanol-Anteil eluierten die Peaks in einem Zeifenster von 5 min mit Peakhalbwertsbreiten von durchschnittlich 0.57 min.

3.3 Trennung von Triazinen

Eine weitere Substanzklasse mit Praxisrelevanz stellen die Triazine dar, die aufgrund ihrer Toxizität und Verwendung als Herbizide vor allem in der Umweltanalytik untersucht werden. Ein Problem hierbei ist die schlechte Wasserlöslichkeit, wodurch sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen und oftmals vor der eigentlichen Analyse angereichert werden müssen, z. B. mittels Festphasenextraktion. **Abbildung 43** zeigt eine Beispieltrennung von Atraton und Terbutryn. Unter Verwendung eines 7.5-min-Gradienten konnten beide Triazine mit Peakhalbwertsbreiten von 0.073 min für Atraton und 0.063 min für Terbutryn mit ausreichender Auflösung ($t_R(\text{Atraton}) = 2.67 \text{ min}$, $t_R(\text{Terbutryn}) = 3.59 \text{ min}$, $\Delta t_R = 0.92 \text{ min}$) getrennt werden, was für eine hohe Trenneffizienz spricht. Die Asymmetriefaktoren variieren zwischen 2.47 für Atraton und 1.05 für Terbutryn, was ein ambivalentes Ergebnis darstellt. Nichtsdestotrotz zeigt diese schnelle und einfache Trennung der Triazine das Potential von PS/DVB-Monolithen für die Trennung von kleinen Molekülen wie Triazinen.

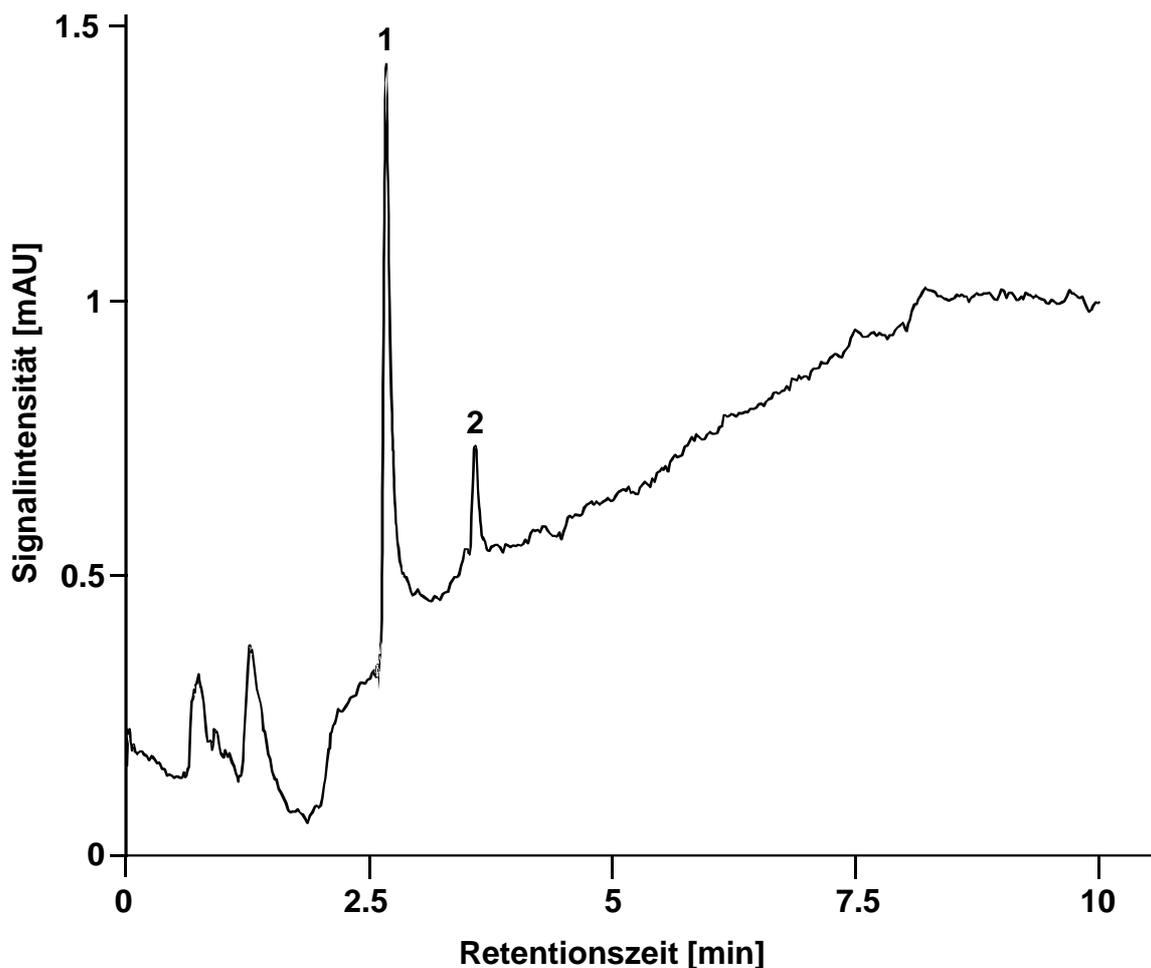


Abbildung 43: Trennung von Atraton (1) und Terbutryn (2); Säule: PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradient: 0 bis 50% Acetonitril + 0.050% TFA in 7.5 min; Flussrate: 2.5 μ l/min, UV-Detektion bei 220 nm; Injektion von jeweils 1 ppm Atraton und Terbutryn, Full Loop, 500 nl.

3.4 Trennung von dansylierten Aminosäuren

Eine weitere praxisrelevante Substanzklasse stellen die Aminosäuren dar, die in diesem Kapitel genauer diskutiert werden.

Um das chromatographische Verhalten der modifizierten monolithischen Kapillarsäulen unter Gradientenbedingungen zu testen, wurden 25 dansylierte Aminosäuren, deren Molmassen zwischen 308.35 (Dansyl-Glycin) und 706.9 Da (Di-dansyl-L-Cystin) mittels Einzelsubstanzinjektionen charakterisiert. Die ermittelten Peakhalbwertsbreiten sowie Netto- und Brutto-Retentionszeiten sind in **Tabelle 15** zusammengefasst. Vergleicht man die Retentionszeiten, so fällt auf, dass nur sehr wenige Dansyl-Aminosäuren unter den gewählten Bedingungen co-eluieren. Weiterhin fällt auf, dass es möglich ist, Strukturisomere innerhalb des 10-min-

Gradienten zu trennen. Dansyl-L- γ -aminobuttersäure und Dansyl-L- α -aminobuttersäure unterschieden sich in 0.22 min in ihren Retentionszeiten. Die Konstitutionsisomere Dansyl-L-Valin und Dansyl-L-Norvalin zeigten Retentionszeiten, die sich um 0.59 min unterschieden. Somit wäre eine Basislinientrennung der genannten Isomere ohne Probleme realisierbar. Andererseits co-eluierten Dansyl-L-Isoleucin und Dansyl-L-Leucin ($\Delta t_R = 0.06$ min) unter den chromatographischen Bedingungen. Ein Vergleich von strukturell ähnlichen Aminosäuren wie Dansyl-Glutamat/Dansyl-Glutamin sowie Dansyl-Aspartat/Dansyl-Asparagin zeigten deutlich unterschiedliche Retentionszeiten, die um 0.60 min bzw. 0.98 min voneinander abwichen. Eine ähnlich gute Selektivität konnte für Dansyl-L-Prolin und Dansyl-L-Hydroxyprolin ($\Delta t_R = 1.49$ min) beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten Dansyl-L-Arginin und Dansyl-L-Asparagin, die normalerweise auf herkömmlichen C18-Materialien nur schwer zu trennen sind [122], deutlich unterschiedliche Retentionszeiten ($\Delta t_R = 2.94$ min), was für eine hohe Selektivität des Monolithen für die entsprechenden Analyten spricht. Darüber hinaus schwankten die Peakhalbwertsbreiten zwischen 1.9 und 3.8 Sekunden und sprechen somit für eine hohe Trenneffizienz der entsprechenden Monolithen.

Tabelle 15: Chromatographische Daten von 25 Dansyl-Aminosäuren.

No.	Name	t _R [min]	t _R ' [min]	w _h [s]
1	Dansyl-L-Asparagin	2.24	0.67	1.9
2	Dansyl-L-Cysteinsäure	2.55	0.95	3.2
3	Dansyl-L-Aspartat	3.21	1.65	3.8
4	Dansyl-L-Glutamin	4.44	2.96	2.4
5	Dansyl-L-Serin	4.45	2.98	2.4
6	Dansyl-Glycin	4.65	3.07	3.4
7	Dansyl-L-Prolin	4.94	3.47	2.3
8	Dansyl-L-Threonin	5.04	3.51	2.2
9	Dansyl-L-Glutamat	5.01	3.56	2.5
10	Dansyl-L-Arginin	5.07	3.61	2.2
11	Dansyl-L- α -Alanin	5.27	3.81	2.3
12	ϵ -Dansyl-L-Lysie	5.35	3.89	3.1
13	Dansyl- γ -Amino-n-buttersäure	5.56	4.08	2.3
14	Dansyl-L- α -Amino-n-buttersäure	5.82	4.30	2.4
15	Dansyl-Sarcosin	5.98	4.41	2.9
16	Dansyl-hydroxy-L-Prolin	6.51	4.96	2.6
17	Dansyl-L-Valin	6.72	5.22	2.5
18	Dansyl-L-Methionin	6.94	5.43	2.4
19	Dansyl-L-Norvalin	7.34	5.81	2.6
20	Dansyl-L-Isoleucin	7.47	5.95	2.6
21	Dansyl-L-Leucin	7.55	6.01	2.6
22	O-Dansyl-Tyrosin	7.86	6.33	2.3
23	Dansyl-L-Tryptophan	8.10	6.53	2.3
24	di-Dansyl-L-Cystin	8.67	7.17	2.3
25	di-Dansyl-L-Lysin	10.08	8.61	2.5

Säule, PS/DVB_Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, 150 x 0.20 mm I.D.; mobile Phase, Eluent A: 0.050% TFA in Wasser, Eluent B: 0.050% TFA in Acetonitril; Gradient: 0-50% B in 10 min; Flussrate, 2.5 μ l/min; Injektion von jeweils 0.5 ng/ μ l Probe, 50 $^{\circ}$ C, UV-Detektion bei 220 nm.

Wie theoretisch erwartet, eluieren die di-dansylierten Aminosäuren Di-Dansyl-L-Cystin (7.17 min) und Di-Dansyl-L-Lysin (8.61 min) als letzte Komponenten von der Säule, was für eine stärkere Interaktion mit der monolithischen stationären Phase spricht verglichen mit den mono-dansylierten Analyten. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin (Phenylalanin war nicht in der Mischung vorhanden) eluieren als letzte Komponenten innerhalb der Reihe der mono-

dansylierten Aminosäuren. Grund hierfür könnten π - π -Wechselwirkungen und abnehmende Polarität der entsprechenden Aminosäuren sein. Im nächsten Experiment wurde eine Mischung bestehend aus 14 dansylierten Aminosäuren chromatographiert. Wie **Abbildung 44** und **Tabelle 16** zu entnehmen ist, konnte eine Basislinientrennung aller Komponenten bis auf Peak 6 und 7 (Dansyl-L- α -Alanin und ϵ -Dansyl-L-Lysin) unter den chromatographischen Bedingungen erzielt werden. Die Peakhalbwertsbreiten (Mittelwert: 0.093 min) schwankten zwischen 0.157 min für Peak 1 (Dansyl-L-Asparagin), welcher isokratisch eluierte und daher eine sehr große Peakbreite besitzt und 0.063 min für Peak 2 (Dansyl-L-Cysteinsäure). Nichtsdestotrotz sind Peakhalbwertsbreiten unter 0.1 min sehr gute Werte für einen 30-min-Gradienten, der praktische Anwendungen ohne Probleme zulassen würde. Was das weitere chromatographische Verhalten der Dansyl-Aminosäuren angeht, so neigen alle Peaks zu leichtem bis starkem Tailing (1.25 bis 2.17). Lediglich Dansyl-L- α -Alanin und ϵ -Dansyl-L-Lysin co-eluierten unter den gewählten chromatographischen Bedingungen.

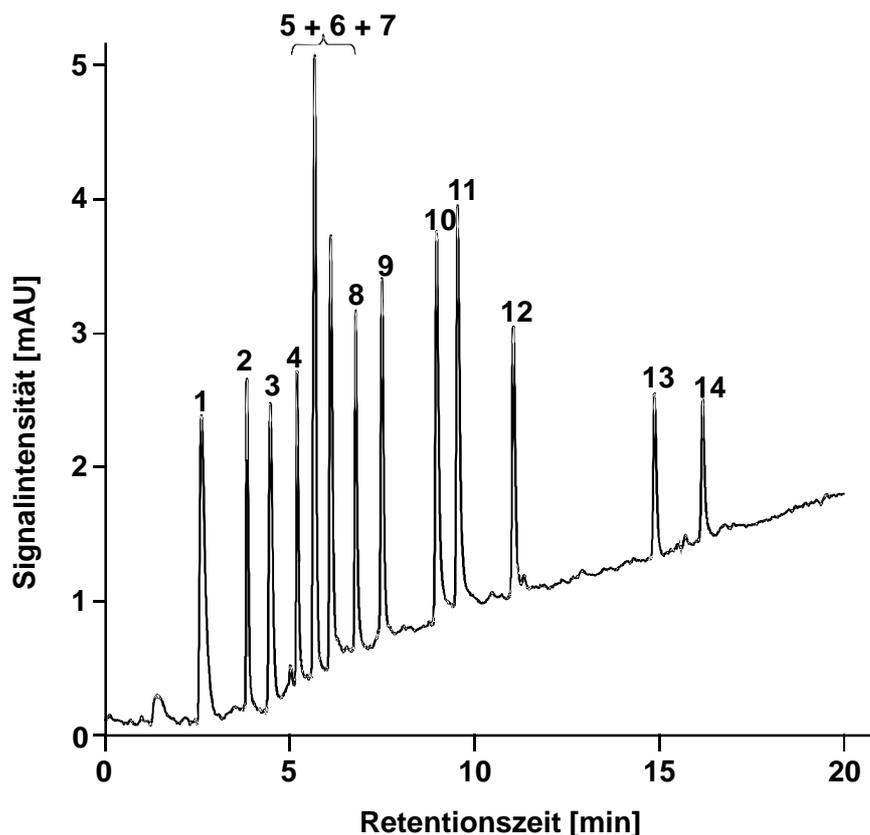


Abbildung 44: Trennung von 14 dansylierten Aminosäuren auf einem 150 x 0.2 mm I.D.PS/DVB-Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil mobile Phase, Eluent A: 0.050% TFA in Wasser, Eluent B: 0.050% TFA in Acetonitril; Gradient: 0-50% B in 30 min; Flussrate, 2.7 $\mu\text{l}/\text{min}$; Injektion von jeweils 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Probe, 50 $^{\circ}\text{C}$, UV-Detektion bei 220 nm.

Tabelle 16: Chromatographische Daten der Trennung von 14 dansylierten Aminosäuren.

Peak	Substanz	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Dansyl-L-Asparagin	2.60	0.157	2.17
2	Dansyl-L-Cysteinsäure	3.83	0.063	1.80
3	Dansyl-L-Serin	4.46	0.108	1.63
4	Dansyl-L-Prolin	5.18	0.066	1.86
5	Dansyl-L-Threonin	5.67	0.086	1.25
6	Dansyl-L- α -Alanin	Peaks nicht basisliniengetreunt!		
7	ϵ -Dansyl-L-lysine			
8	Dansyl- γ -amino-n-buttersäure	6.77	0.070	1.77
9	Dansyl- α -amino-buttersäure	7.49	0.083	1.44
10	Dansyl-hydroxy-L-Prolin	8.97	0.096	1.62
11	Dansyl-L-Norvalin	9.53	0.099	1.99
12	Dansyl-L-Tryptophan	11.04	0.089	1.61
13	di-Dansyl-L-Cystin	14.87	0.087	1.43
14	di-Dansyl-L-Lysin	16.17	0.093	1.46

Danach erfolgte die Analyse einer Mischung aus 23 dansylierten Aminosäuren.

Im nächsten Experiment wurde eine Mischung bestehend aus 23 dansylierten Aminosäuren unter den folgenden Bedingungen chromatographiert (**Abbildung 45**):

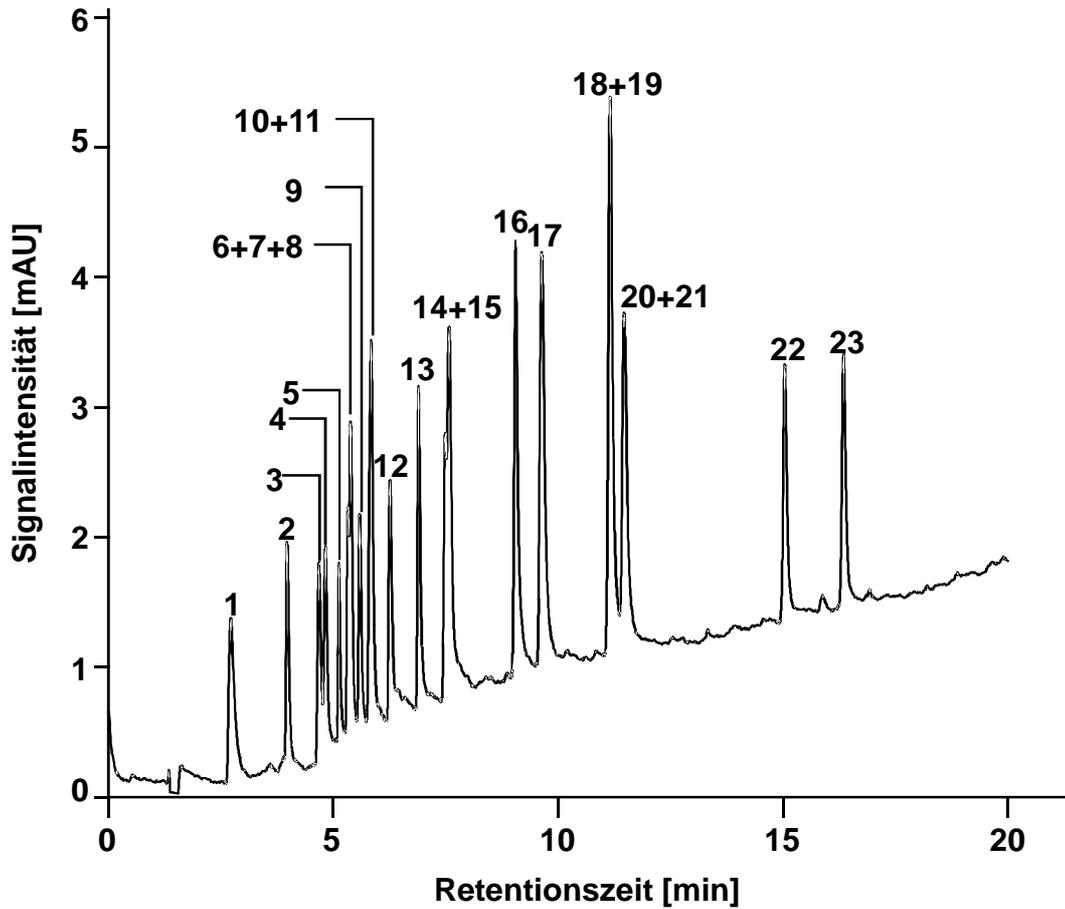


Abbildung 45: Trennung von 23 Dansyl-Aminosäuren auf einem 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil; mobile Phase, Eluent A: 0.050% TFA in Wasser, Eluent B: 0.050% TFA in Acetonitril; Gradient: 0-50% B in 30 min; Flussrate, 2.7 $\mu\text{l}/\text{min}$; Injektion von jeweils 0.25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Probe, 50 $^{\circ}\text{C}$, UV-Detektion bei 220 nm.

Tabelle 17: Chromatographische Daten der Trennung von 23 dansylierten Aminosäuren.

Peak	Substanz	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Dansyl-L-Asparagin	2.72	0.125	1.70
2	Dansyl-L-Cysteinsäure	3.97	0.065	1.80
3	Dansyl-L-Aspartat	4.67	0.073	1.18
4	Dansyl-L-Glutamin	4.82	0.067	1.28
5	Dansyl-Serin	5.12	0.054	1.40
6	Dansyl-L-Prolin	5.36	Keine Basislinientrennung!	
7	Dansyl-L-Threonin			
8	Dansyl-L-Glutamat			
9	Dansyl-L-Arginin	5.59	0.062	1.59
10	Dansyl-L- α -Alanin	5.84	Keine Basislinientrennung!	
11	ϵ -Dansyl-L-Lysin			
12	Dansyl- γ -amino-buttersäure	6.26	0.077	2.31
13	Dansyl- α -amino-buttersäure	6.90	0.066	1.80
14	Dansyl-L-Sarcosin	7.49	Keine Basislinientrennung!	
15	Dansyl-hydroxy-L-Prolin	7.58		
16	Dansyl-L-Methionin	9.05	0.088	2.06
17	Dansyl-L-Norvalin	9.64	0.114	1.65
18	Dansyl-L-Isoleucin	11.15	Keine Basislinientrennung!	
19	Dansyl-L-Leucin			
20	O-Dansyl-L-Tyrosin	11.47	Keine Basislinientrennung!	
21	Dansyl-L-Tryptophan			
22	di-Dansyl-L-Cystin	15.04	0.090	1.38
23	di-Dansyl-L-Lysin	16.34	0.092	1.35

Wie **Abbildung 45** und **Tabelle 17** zu entnehmen ist, konnten nicht alle 23 Peaks unter den chromatographischen Bedingungen basisliniengetrennt werden, was angesichts der Probenkomplexität von 23 Komponenten schwierig zu realisieren ist. Die Peakhalbwertsbreiten (Mittelwert: 0.081 min) schwankten zwischen 0.125 min für Peak 1 (Dansyl-L-Asparagin), welcher isokratisch eluierte und daher eine sehr große Peakbreite besitzt, und 0.054 min für Peak 5 (Dansyl-L-Serin). Was das weitere chromatographische Verhalten der Dansyl-Aminosäuren angeht, so neigen alle Peaks zu leichtem bis starkem Tailing (1.18 bis 2.31). Wie bereits bei den Einzelsubstanzinjektionen abzusehen war, gelang die Basislinientrennung mehrerer Strukturisomere, z.B. Dansyl- γ -amino-buttersäure und Dansyl- α -amino-buttersäure mit Retentionszeiten von 6.26 min und 6.90 min, was für die Selektivität und Trennleistung des Monolithen spricht.

Durch Optimierung von Gradientenzeit und Flussrate kann die Trennung von Dansyl-Aminosäuren noch erheblich beschleunigt werden (**Abbildung 46** und **Tabelle 18**). Durch Reduktion der Gradientenzeit, Injektion in den laufenden Gradienten und Erhöhung der Flussrate auf 4.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ gelang die Trennung von 10 Dansyl-Aminosäuren in weniger als 2 Minuten.

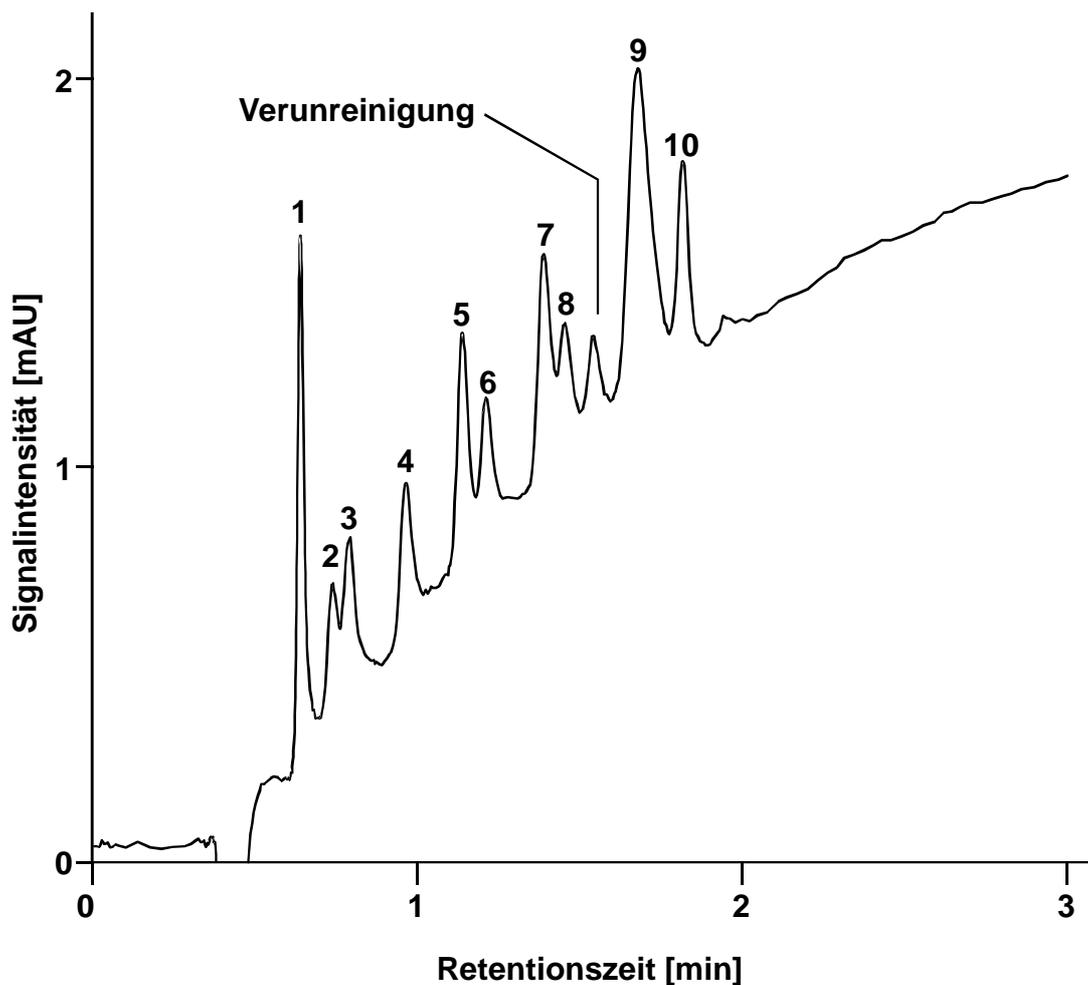


Abbildung 46: Schnelle Trennung von 10 dansylierten Aminosäuren in weniger als 2 min auf einem 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolithen mit erhöhtem THF-Anteil. mobile Phase, Eluent A: 0.050% TFA in Wasser, Eluent B: 0.050% TFA in Acetonitril; Gradient: 0-50% B in 7.5 min (Injektion nach 3min); Flussrate, 4.5 $\mu\text{l}/\text{min}$; Injektion von jeweils 0.30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Probe, 50 $^{\circ}\text{C}$, UV-Detektion bei 220 nm.

Tabelle 18: Chromatographische Daten der schnellen Trennung von 10 Dansyl-Aminosäuren in weniger als 2 min.

Peak	Substanz	t_R [min]	w_h [min]	T	R
1	Dansyl-L-Serin	0.64	0.021	1.50	2.47
2	Dansyl-L-Threonin	0.74	0.027	0.81	1.09
3	Dansyl-L- α -Alanin	0.79	0.031	1.04	2.97
4	Dansyl-L- α -amino-n-buttersäure	0.97	0.038	1.21	2.80
5	Dansyl-L-Prolin	1.14	0.034	1.10	1.26
6	Dansyl-L-Methionin	1.21	0.034	1.30	3.05
7	Dansyl-L-Tryptophan	1.39	0.036	0.97	1.16
8	Dansyl-DL-Norleucin	1.45	0.030	1.15	1.68
9	O-Dansyl-Tyrosin	1.68	0.070	1.26	1.57
10	di-Dansyl-L-Cystin	1.82	0.034	1.12	n.a.

Die Trennung der zehn Aminosäuren konnte in weniger als 2 min mit Peakhalbwertsbreiten unter 2.4 Sekunden und stellenweise sogar unter 1.8 Sekunden realisiert werden mit ausreichender Auflösung von $R > 1$, was für qualitative und semiquantitative Zwecke ausreichend ist.

Isokratische Trennungen von Dansyl-Aminosäuren

Um die Anzahl der theoretischen Böden zu bestimmen, die ein Maß für die Trenneffizienz einer Säule darstellt, wurden diverse Trennungen unter isokratischen Bedingungen realisiert.

Isokratische Trennung von Leucin und Isoleucin

Zur Bestimmung der Bodenzahl des verwendeten Monolithen wurden die Strukturisomere Leucin und Isoleucin verwendet (**Abbildung 47**):

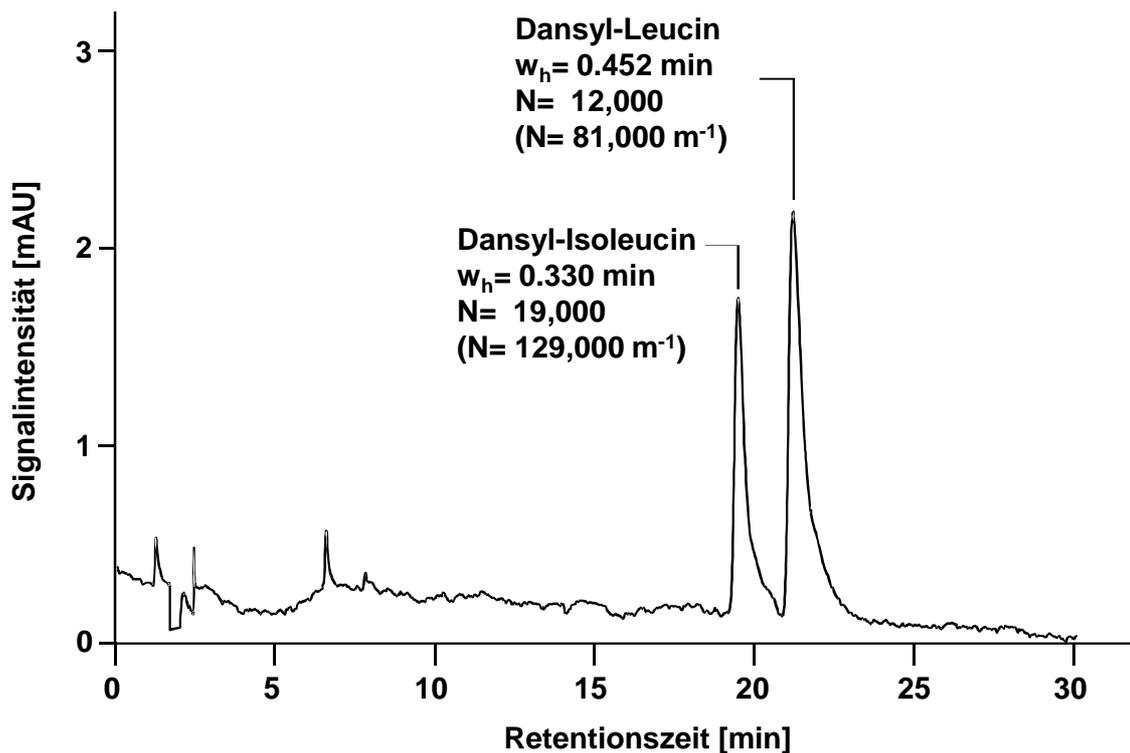


Abbildung 47: Isokratische Trennung von Dansyl-Isoleucin und Dansyl-Leucin; Säule: 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Eluent: 1% Acetonitril in wässriger 0.050% -iger TFA; Flussrate 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Injektion von je 0.250 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Analyt, UV-Detektion bei 220 nm.

Die isokratische Trennung (**Abbildung 47**) der beiden Strukturisomere konnte in weniger als 25 Minuten mit einer durchschnittlichen Bodenzahl von 15,500 bzw.

105,000 Böden pro Meter durchgeführt werden. Die Retentionszeiten beider Analyten unterschieden sich um 1.73 min, was eine sehr gute Selektivität bedeutet.

Isokratische Trennung von Dansyl- α -amino-n-buttersäure und Dansyl- γ -amino-n-buttersäure

Als weiteres Beispiel der Trennung von Strukturisomeren wurde eine Mischung bestehend aus Dansyl- α -amino-n-buttersäure und Dansyl- γ -amino-n-buttersäure eingesetzt (**Abbildung 48**):

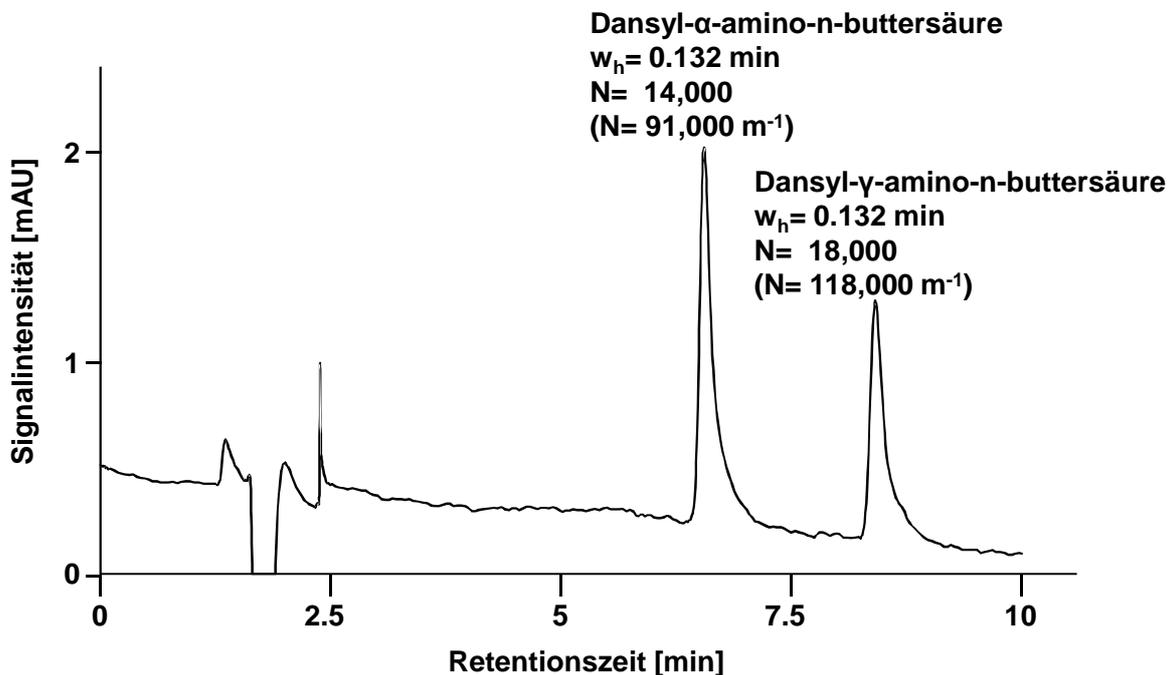


Abbildung 48: Isokratische Trennung von Dansyl- α -amino-n-buttersäure und Dansyl- γ -amino-n-buttersäure; Säule: 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Eluent: 1% Acetonitril in wässriger 0.050% -iger TFA; Flussrate 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Injektion von je 0.250 ng/ μl Analyt, UV-Detektion bei 220 nm.

Die isokratische Trennung der beiden Strukturisomere der Dansyl-amino-n-buttersäure (**Abbildung 48**) lieferte eine durchschnittliche Bodenzahl von 16,000 für die Säule bzw. 104,500 Böden pro Meter, was nahezu identischen Werte sind verglichen mit Leucin und Isoleucin und die sehr gute Trenneffizienz der Monolithen demonstriert. Somit ist es möglich, Strukturisomere isokratisch in kurzer Zeit zu trennen.

Isokratische Trennung von vier Dansyl-Aminosäuren

Die isokratische Trennung der vier dansylierten Aminosäuren Asparagin, Threonin, Alanin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) lieferte die folgenden Ergebnisse:

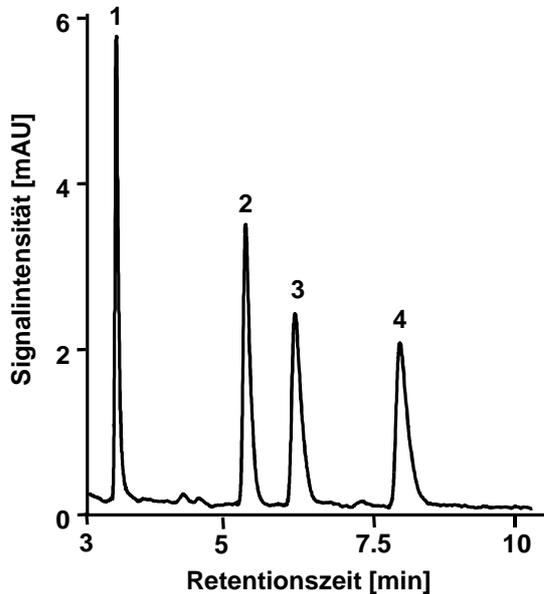


Abbildung 49: Isokratische Trennung von Dansyl-Asparagin (1), Dansyl-Threonin (2), Dansyl- α -Alanin (3) und Dansyl- γ -amino-n-buttersäure (4); Säule: 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; 1 % Acetonitril in wässriger 0.050% -iger TFA; 2.3 μ l/min; Temperatur, 50 °C; Injektion von je 0.250 ng/ μ l Analyt („Heart-Cut“-Injektion)

Tabelle 19: Chromatographische Daten der isokratischen Trennung von Dansyl-Asparagin (1), Dansyl-Threonin (2), Dansyl- α -Alanin (3) und Dansyl- γ -amino-n-buttersäure (4).

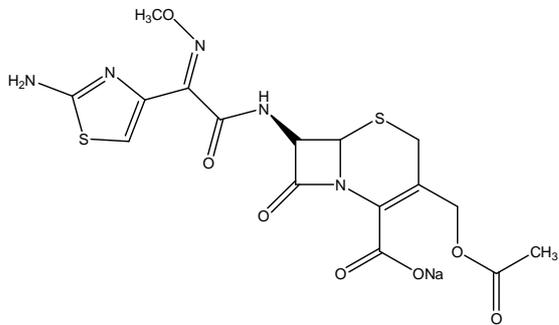
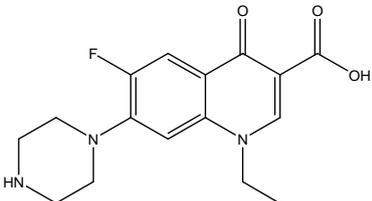
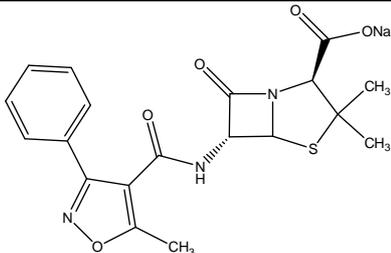
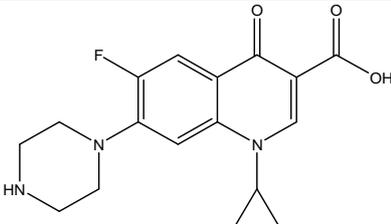
Peak	Substanz	t_R [min]	N [m^{-1}]
1	Dansyl-L-Asparagin	3.27	110,000
2	Dansyl-L-Threonin	5.45	75,000
3	Dansyl-L- α -Alanin	6.28	51,000
4	Dansyl- γ -amino-n-buttersäure	8.07	56,000

Wie **Abbildung 49** und **Tabelle 19** zu entnehmen ist, konnte die isokratische Trennung der vier Aminosäuren mit Bodenzahlen von 56,000 bis 110,000 Böden pro Meter realisiert werden, was einer durchschnittlichen Bodenzahl von 73,000 pro Meter bzw. 11,000 für den 150 mm langen Monolithen entspricht. Durch Verwendung der Technik der Heart-Cut-Injektion konnte hierbei die Peaksymmetrie deutlich verbessert werden, womit gezeigt werden konnte, dass das relativ starke Tailing bei den isokratischen Trennungen von Strukturisomeren nicht ausschließlich auf die stationäre Phase zurückzuführen ist, sondern auch auf säulenunabhängige Faktoren.

3.5 Trennung von Antibiotika

Eine weitere Substanzklasse, die sich durch eine Vielzahl an verschiedenen Funktionalitäten und unterschiedlichem chromatographischen Verhalten kennzeichnet, sind Antibiotika. In diesem Kapitel wird das chromatographische Verhalten von acht verschiedenen Antibiotika mittels Einzelsubstanzinjektion beschrieben. Die Strukturformeln und verwendeten Antibiotikakategorien können **Tabelle 20** entnommen werden:

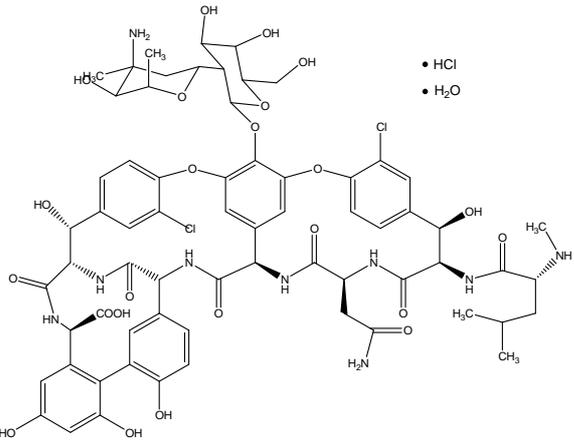
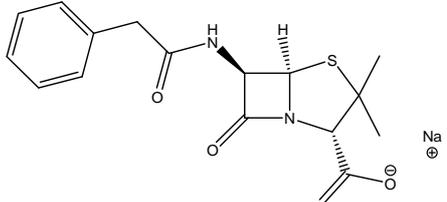
Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Antibiotikakategorien samt Strukturformeln (Teil 1).

Substanz	Kategorie	Struktur
Cefotaxim Natriumsalz	Cephalosporin β -Lactam	
Norfloxacin	Fluorquinolon	
Oxacillin	Penicillin β -Lactam	
Ciprofloxacin	Fluorquinolon	

Wie **Tabelle 20** zu entnehmen ist, wurde eine große Bandbreite an Antibiotika-Typen mit unterschiedlichen Strukturformeln untersucht wie zum Beispiel die klassischen β -Lactame (unterteilt in Penicilline und Cephalosporine), Fluorquinolone wie

Norfloxacin und Ciprofloxacin sowie ein Vertreter der Glycopeptide in Form von Vancomycin. Die verwendeten Antibiotika deckten dabei einen Massenbereich von 1447.66 Da (Vancomycin) bis 319.33 Da (Norfloxacin) ab.

Fortsetzung Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Antibiotikaklassen samt Strukturformeln (Teil 2).

Substanz	Kategorie	Struktur
Vancomycin Hydrochlorid-hydrat	Glycopeptid	
Penicillin G Natriumsalz	Penicillin β -Lactam	

Um einen generellen Überblick über die Retentionszeiten der Antibiotika auf den verwendeten Monolithen zu erhalten, wurden zuerst Einzelsubstanzinjektionen aller verwendeten Substanzen durchgeführt. Hierbei lieferten die Analysen folgende Ergebnisse:

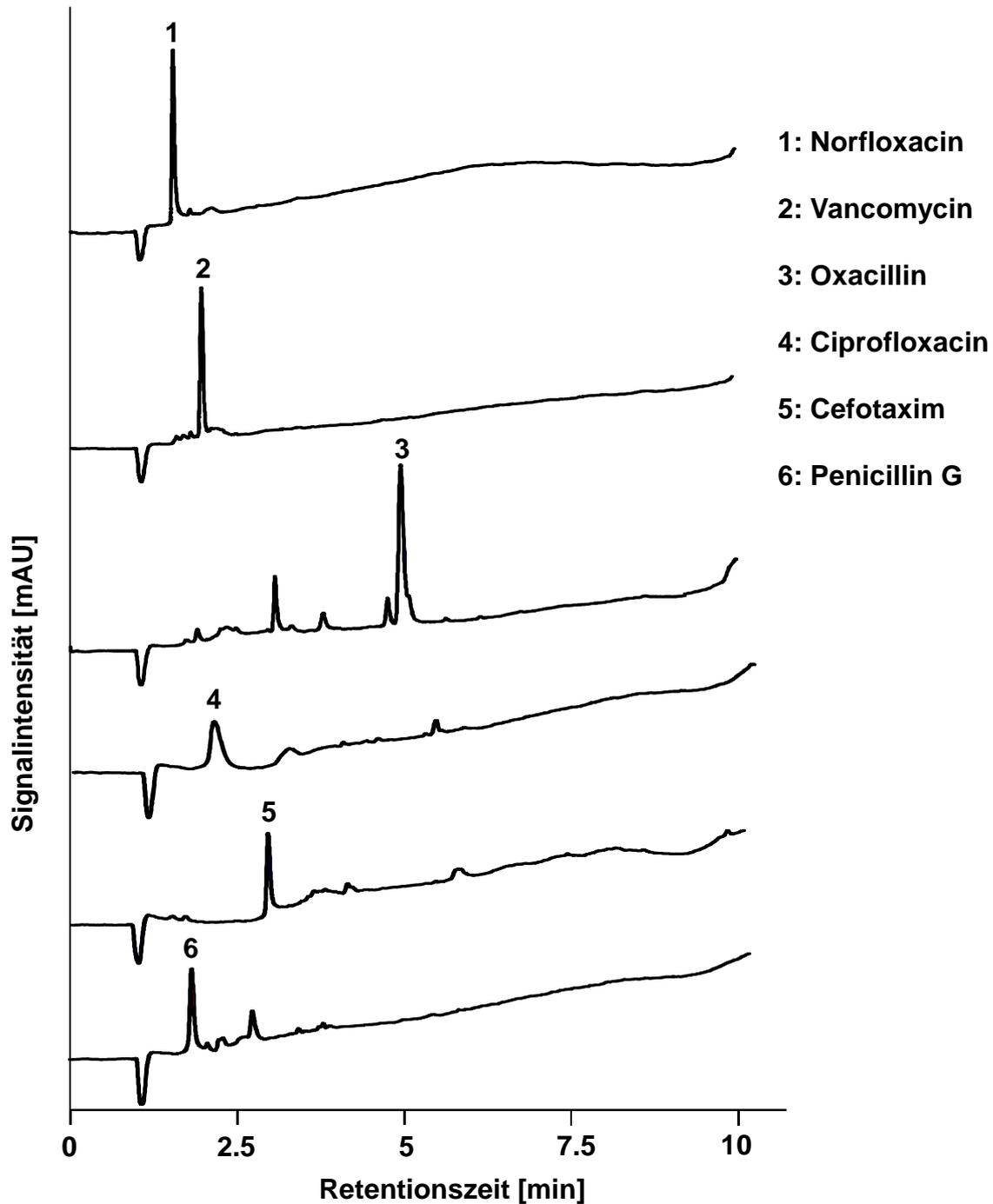


Abbildung 50: Einzelsubstanzinjektionen von Norfloxacin (1), Vancomycin (2), Oxacillin (3), Ciprofloxacin (4), Cefotaxim (5) und Penicillin G (6). Säule: 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradient: 0-50% Acetonitril +0.050% TFA in 7.5 min; 4.5 µl/min; Temperatur, 50 °C; Injektion von je 5.0 ng/µl Analyt, UV-Detektion bei 220 nm.

Tabelle 21: Chromatographische Daten der Einzelsubstanzinjektionen von sechs Antibiotika.

Substanz	t_R [min]	w_h [min]
Norfloxacin	1.54	0.038
Penicillin G	1.82	0.062
Vancomycin	1.96	0.045
Ciprofloxacin	2.07	0.171
Cefotaxim	3.02	0.054
Oxacillin	4.96	0.087

Wie in **Abbildung 50** und **Tabelle 21** illustriert, lieferte die Injektion von sechs Antibiotika aus vier verschiedenen Substanzklassen (Penicillin- β -Lactame, Cephalosporin- β -Lactame, Fluorquinolone und Glycopeptide) durchgehend sehr schmale Peaks mit Ausnahme von Ciprofloxacin ($w_h = 0.171$ min), welches isokratisch eluiert. Die restlichen Peakhalbwertsbreiten liegen bei 0.038 min für Norfloxacin, 0.062 min für Penicillin G, 0.045 min für Vancomycin, 0.054 min für Cefotaxim und 0.087 min für Oxacillin. Wie zu erwarten war, zeigt Vancomycin als Vertreter der Glycopeptide und einer molaren Masse von fast 1.5 kDa auf einem PS/DVB-Monolithen ein Verhalten, wie es für Peptide zu erwarten ist in Form eines symmetrischen, schmalen Peaks. Andere Antibiotika wie zum Beispiel die Fluorquinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin, welche sich in ihrer Struktur nur wenig voneinander unterscheiden, zeigten ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten und hatten Retentionszeiten von 1.54 min und 2.07 min ($\Delta t_R = 0.53$ min), wodurch eine Basislinientrennung innerhalb des 7.5-min-Gradienten ohne Probleme zu erreichen wäre. Die kritischen Peakpaare innerhalb der getesteten Antibiotika stellten Penicillin G/Vancomycin sowie Vancomycin/Ciprofloxacin dar, die sich nur wenig in ihren Retentionszeiten unterscheiden haben (0.14 min bzw. 0.11 min) und somit nahezu co-eluieren. Durch Anpassung des Gradienten könnte hierbei noch eine bessere Auflösung erzielt werden. Doch auch bei den Antibiotika zeigen PS/DVB-Monolithen eine hohe Trenneffizienz für eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzklassen wie Penicillin- β -Lactame, Cephalosporin- β -Lactame sowie Fluorquinolone und Glycopeptide, was das Anwendungsspektrum von organischen Monolithen deutlich vergrößert. Darüber hinaus wird deutlich, dass einige der Antibiotika herstellungs- bzw. lagerungsbedingt diverse Verunreinigungen beinhalten. Da die verwendete Methode MS-kompatibel ist, wäre eine MS-Kopplung und Identifizierung der Verunreinigungen ohne weitere Probleme realisierbar.

3.6 Trennung von Schilddrüsenhormonen

Die letzte in diesem Kapitel besprochene Substanzklasse stellen die Schilddrüsenhormone dar, welche strukturell den Aminosäuren ähneln. Während der Synthese oder der Lagerung des Schilddrüsenhormons Levothyroxin (T4) bzw. Liothyronin (T3), kann es zu einer Vielzahl von Nebenprodukten kommen, die bei der pharmazeutischen Qualitätskontrolle charakterisiert werden müssen. Mögliche Abbauprodukte können hierbei durch Abspaltung von Iod-Atomen oder anderen Bauteilen wie der Amino-Funktion entstehen. In diesem Kapitel wird anhand einer Standardmischung bestehend aus Schilddrüsenhormonen und potentiellen Abbauprodukten (**Abbildung 51**) getestet, ob es möglich ist, die Schilddrüsenhormone inklusive Verunreinigungen mit monolithischen Trennmedien auf PS/DVB-Basis trennen zu können.

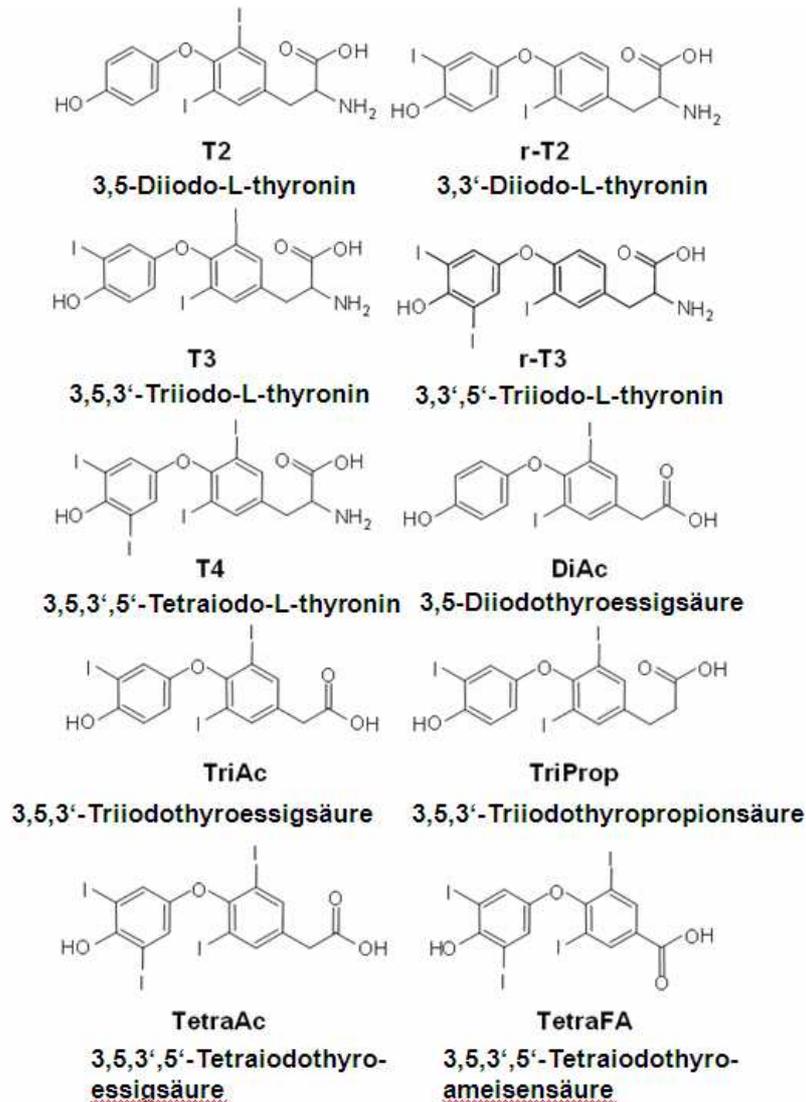


Abbildung 51: Übersicht über die Standardmischung zur Charakterisierung der Schilddrüsenhormone und deren Abbauprodukte.

Die Mischung beinhaltet neben den Schilddrüsenhormonen Levothyroxin (T4) und Liothyronin (T3) noch 3,5-Diiodo-L-thyronin (T2), 3,3'-Diiodo-L-thyronin (r-T2) sowie r-T3 (3,3'5'-Triiodo-L-thyronin), die sich in Anzahl sowie Stellung der einzelnen Iodatome unterscheiden. Darüber hinaus enthält die Mischung fünf Carbonsäurederivate, die durch Abbaureaktionen am Aminosäure-Rest entstehen können. Um die Trennung zu optimieren, wurden mehrere Laufmitteladditive getestet: TFA als Ionenpaarbildner, Phosphorsäure sowie eine Messung ohne Additiv.

Wie in **Abbildung 52** illustriert, gelang die beste Auftrennung des Standardgemisches unter Verwendung eines Wasser/Acetonitril-Gradienten ohne Additiv (**Abbildung 52c**). In diesem Fall gelang die Basislinientrennung aller zehn Komponenten mit Peakhalbwertsbreiten zwischen 3 und 16 Sekunden. Darüberhinaus konnten TetraAc und TetraFA ohne Additiv am empfindlichsten dargestellt werden: Während bei den Trennungen mit TFA und die beiden Peaks nicht detektierbar waren aufgrund der enormen Peakbreite, konnten die beiden Substanzen ohne Additiv noch nachgewiesen werden. Die besten Peakhalbwertsbreiten zwischen 3 und 8 Sekunden lieferten die Trennungen mit TFA, wobei hier aber die Selektivität am schlechtesten war. So gelang es unter der Verwendung von TFA aufgrund der schlechteren Selektivität nicht, T4 und DiAc (Peak 5 + 6) vollständig zu trennen, was sowohl ohne Additiv als auch mit Phosphorsäure ohne Probleme möglich war. Was bei allen drei Trennungen auffällt, ist die Tatsache, dass die ersten fünf Peaks (T2 bis T4) durchgehend bessere Peakbreiten und Peakformen ergaben als die letzten fünf Peaks (DiAc bis TetraFA).

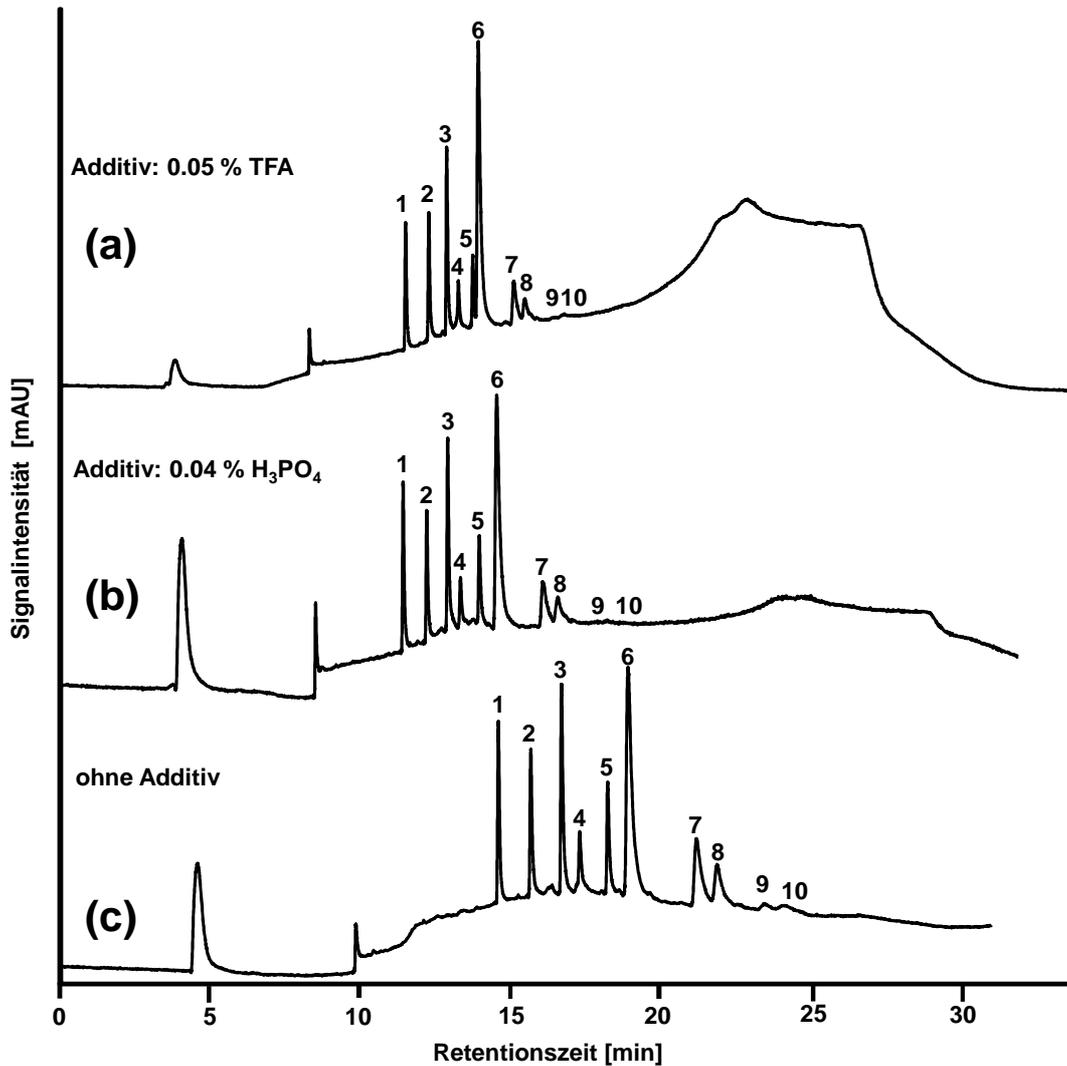


Abbildung 52: Trennung von Schilddrüsenhormonen und deren Abbauprodukten, T2 (1), r-T2 (2), T-3 (3), r-T3 (4), T4 (5), DiAc (6), TriAc (7), TriProp (8), TetraAc (9) und TetraFA (10). Säule: 300 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradienten: 0-80% Acetonitril + 0.050% TFA in 15 min (a) bzw. 0-80% Acetonitril + 0.04% Phosphorsäure in 15 min (b) bzw. 0-80% Acetonitril (ohne Additiv), (c); 2.0 µl/min; Temperatur, 50 °C; Injektion von je 0.20-0.30 ng/µl Analyt; Injektionsvolumen 500 nl, UV-Detektion bei 225 nm.

Tabelle 22: Chromatographische Daten der Trennung von Schilddrüsenhormonen und deren Abbauprodukten, chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 55. %0.050% %%%

Substanz	0.050% TFA als Additiv		0.04% H ₃ PO ₄ als Additiv		ohne Additiv	
	t _R [min]	w _h [s]	t _R [min]	w _h [s]	t _R [min]	w _h [s]
T2 (1)	11.49	3.0	10.63	3.0	11.84	3.3
r-T2 (2)	12.27	3.6	11.35	3.6	12.71	3.5
T3 (3)	12.86	3.6	12.00	3.6	13.54	3.7
r-T3 (4)	13.25	3.6	12.39	3.6	14.03	4.1
T4 (5)	13.73	3.6	12.97	4.2	14.79	4.0
DiAc (6)	13.92	6.6	13.50	7.8	15.34	8.8
TriAc (7)	15.11	7.8	14.92	9.6	17.19	11.2
TriProp (8)	15.47	7.8	15.39	10.2	17.74	11.0
TetraAc (9)	/	/	/	/	19.00	12.2
TetraFA (10)	/	/	/	/	19.57	16.2

Diese Unterschiede im chromatographischen Verhalten bei allen Trennungen kann beispielsweise auf strukturelle Unterschiede zurückgeführt werden: Während die ersten fünf Peaks als Aminosäurederivate interpretiert werden können, fehlt den letzten fünf Substanzen die charakteristische Amino-Funktionalität, wodurch sie lediglich Carbonsäurederivate sind. Dieser minimale Unterschied in den Struktureigenschaften führte daher zu signifikant anderen chromatographischen Eigenschaften, die durch die verwendeten Additive nicht beeinflusst werden konnten: Weder die Verwendung eines sauren potentiellen Ionenpaarbildners noch die Verwendung einer Säure oder keines Eluentadditivs hatte einen Einfluss auf die Diskrepanz der Trenneffizienz zwischen Aminosäuren- und Carbonsäurederivaten. Trotzdem zeigten die Trennungen deutlich das Potential von PS/DVB-Monolithen für die Trennung von kleinen Molekülen, die zur Qualitätssicherung von Schilddrüsenhormon-Proben werden könnten. Darüber hinaus sei erwähnt, dass die Konzentrationen der verwendeten Substanzen innerhalb der Mischung lediglich 200 bis 300 ppb betragen, die ohne Probleme nachgewiesen werden konnten.

3.7 Trennung von Biopolymeren

3.7.1 Trennung von Peptiden

Da die Phasenmorphologie der Monolithen einen signifikanten Einfluss auf kleinere Moleküle hat, was unter anderem mit der Zugänglichkeit der Poren zusammenhängt, wurde weiterhin untersucht, ob die ursprünglich für die Trennung kleiner Moleküle optimierten monolithischen PS/DVB-Säulen auch für Biopolymere geeignet sind. Daher wurde zuerst getestet, ob es möglich war, den aus neun Neuropeptiden bestehenden Peptidstandard P2693 (**Tabelle 23**) effizient trennen zu können.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Peptidstandard P2693.

Peak	Peptid	Abkürzung	Sequenz
1	Bradykinin Fragment 1-5	Brad 1-5	RPPGF
2	Vasopressin [Arg ⁸]	Vas	CYFQNCPRG-NH ₂
3	Methionin-Enkephalin	Met-Enk	YGGFM
4	Leucin-Enkephalin	Meu-Enk	YGGFL
5	Oxytocin	Oxy	CYIQNCPLG-NH ₂
6	Bradykinin	Brad	RPPGFSPFR
7	LHRH Decapeptid	LHRH pep	pEHWSYGLRPG-NH ₂
8	Bombesin	Bomb	pEQRLGNQWAVGHLM-NH ₂
9	Substanz P	Sub P	RPKPQQFFGLM

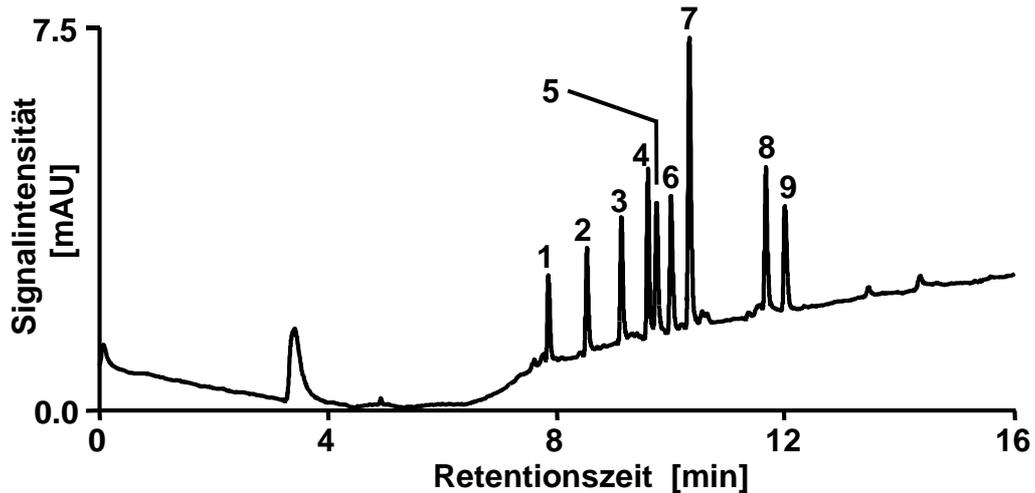


Abbildung 53: Trennung von neun Neuropeptiden. Säule: 300 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradienten: 0-50% Acetonitril + 0.050% TFA in 15 min; 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Injektion von 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$; Injektionsvolumen 500 nl, UV-Detektion bei 214 nm Peakzuordnung in Tabelle 23.

Wie **Abbildung 53** und **Tabelle 24** zu entnehmen ist, konnte die Trennung der Peptide mit sehr hoher Trenneffizienz realisiert werden: Die durchschnittliche Peakhalbwertsbreite betrug 3 s, was einen sehr guten Werte für einen 15-min-Gradient darstellt. Die Asymmetriefaktoren implizieren moderates Tailing, z.B. 1.20 für Leucin-Enkephalin, wodurch die modifizierten Monolithen mit erhöhten THF-Anteil auch für die Trennung von Peptiden bestens geeignet sind.

Tabelle 24: Chromatographische Daten der Trennung von neun Neuropeptiden. Säule: 300 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradienten: 0-50% Acetonitril + 0.050% TFA in 15 min; 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$; Temperatur, 50 $^{\circ}\text{C}$; Injektion von 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$; Injektionsvolumen 500 nl.

Peak	Peptide	t_R [min]	w_h [s]	T
1	Bradykinin Fragment 1-5	7.85	2.8	1.42
2	Vasopressin [Arg^8]	8.53	2.9	1.28
3	Methionin-Enkephalin	9.13	2.9	1.33
4	Leucin-Enkephalin	9.60	2.6	1.20
5	Oxytocin	9.75	3.2	1.29
6	Bradykinin	9.99	3.3	1.47
7	LHRH Decapeptid	10.31	3.2	1.38
8	Bombesin	11.65	3.1	1.30
9	Substanz P	11.98	3.7	1.45

Trennung eines BSA/Thyroglobulin-Verdaus

Um die Trenneffizienz für komplexe Peptidmischungen charakterisieren zu können, wurde ein tryptischer BSA/Thyroglobulin-Verdau chromatographiert:

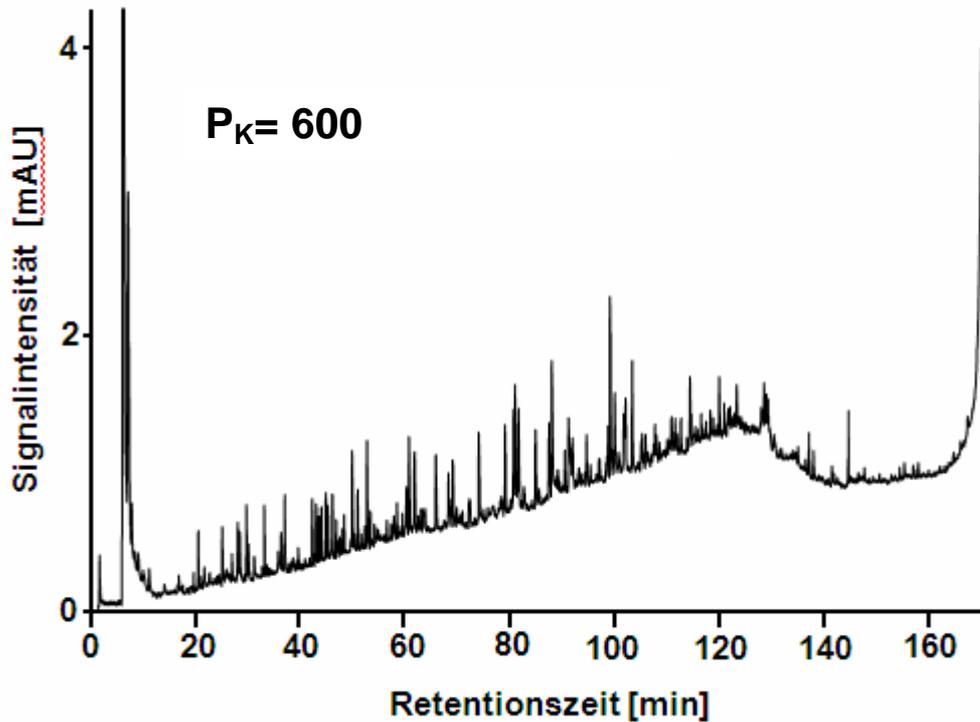


Abbildung 54: Trennung eines BSA/Thyroglobulin-Verdau. Säule: 300 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradient: 0-50% Acetonitril + 0.050% TFA in 160 min; 2.0 μ l/min; Temperatur, 50 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 500 nl, UV-Detektion bei 214 nm.

Wie in **Abbildung 54** dargestellt, konnte der BSA/Thyroglobulin-Verdau mit sehr hoher Effizienz getrennt werden. Die durchschnittliche Peakbasisbreite der Peptide betrug 0.27 min, aus der sich eine Peakkapazität von fast 600 für den 160-Minuten-Gradienten ergibt. Für die Berechnung der Peakkapazität kann die gesamte Gradientenlaufzeit verwendet werden, da die Peptide über die gesamte Gradientendauer eluieren.

3.7.2 Trennung von Proteinen

Nachdem die Trenneffizienz der PS/DVB-Monolithen, welche für die Trennung von kleinen Molekülen optimiert wurde, auch für Peptide und komplexe Peptidmischungen bestätigt wurde, wurde darüber hinaus die Eignung dieser Monolithen zur Trennung von intakten Proteinen untersucht. Um die chromatographischen Eigenschaften weiterer Biomoleküle zu untersuchen, wurde eine Mischung aus zehn Proteinen auf den modifizierten Monolithen getrennt (**Abbildung 55**):

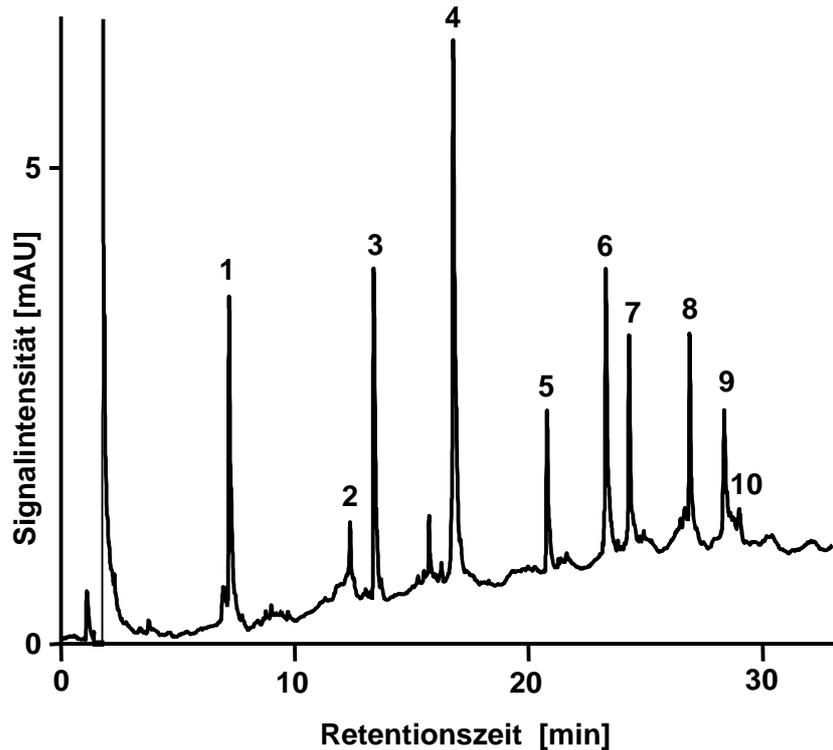


Abbildung 55: Trennung von 10 Proteinen. Ribonuclease A (1), Cytochrom C (2), Insulin (3), Lysozym (4), α -Lactalbumin (5), Myoglobin (6), Hämoglobin- α (7), β -Lactoglobulin B (8), β -Lactoglobulin A (9), Hämoglobin- β (10); Säule: 150 x 0.2 mm I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Gradient: 20-50% Acetonitril + 0.050% TFA in 30 min; 2.0 μ l/min; Temperatur, 50 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 500 nl, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 25: Chromatographische Daten der Trennung von 10 Proteinen. Chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 57.

Peak	Protein	t_R [min]	w_h [s]
1	Ribonuclease A	7.21	4.7
2	Cytochrom C	12.39	5.0
3	Insulin	13.39	5.4
4	Lysozym	16.79	5.5
5	α -Lactalbumin	20.80	5.3
6	Myoglobin	23.32	5.3
7	Hämoglobin- α	24.32	5.0
8	β -Lactoglobulin B	26.91	4.5
9	β -Lactoglobulin A	28.39	5.5
10	Hämoglobin- β	29.03	7.9

Die Trennung der 10 Proteine (**Abbildung 55** und **Tabelle 25**) konnte mit Peakhalbwertsbreiten zwischen 4.5 (β -Lactoglobulin B) und 7.9 Sekunden (Hämoglobin- β) in einem Elutionsfenster von fast 30 min realisiert werden. Die durchschnittliche Peakhalbwertsbreite betrug hierbei 5 s. Innerhalb des 30-min-

Gradienten gelang die Basislinientrennung der beiden Milchproteine β -Lactoglobulin A + B, die sich in ihrer Sequenz in nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden ($\Delta t_R = 1.48$ min), was für die hohe Selektivität der Monolithen spricht. Darüber hinaus war es möglich, beide Hämoglobin-Ketten (α und β , $\Delta t_R = 4.71$ min) ebenfalls basisliniengetrennt zu chromatographieren. Auch alle anderen Proteine der Mischung wie zum Beispiel der Herzinfarktmarker Myoglobin oder das medizinisch relevante Insulin konnten mit Peakbreiten von ungefähr 5 Sekunden getrennt werden. Insgesamt ergab sich eine Peakkapazität von annähernd 200, was einen sehr hohen Wert für Proteine darstellt. Normalerweise können nur selten Peakkapazitäten von > 150 erreicht werden [¹²³].

Somit können die modifizierten Monolithen sowohl für Peptide als auch intakte Proteine ohne Probleme verwendet werden, da sie ähnliche oder sogar bessere Trenneffizienzen zeigen als die klassische Mischung für Biopolymertrennungen.

4. Zusammenfassung

Im ersten Kapitel dieser Dissertation wurden modifizierte monolithische Kapillarsäulen auf Poly-(styrol-divinylbenzol)-Basis durch Variation der Porogene bzw. Porogenkonzentrationen entwickelt, um die Säulen für Trennungen kleinerer Moleküle wie Aminosäuren, Parabene, Triazine, Antibiotika und Schilddrüsenhormone zugänglich zu machen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob diese neuen Kapillarsäulen auch die Trenneffizienz für große Moleküle wie Peptide oder Proteine verbessern können, was durch entsprechende IP-RP-HPLC-Analysen bewiesen werden konnte. So konnten neun Neuropeptide innerhalb von 15 min basisliniengetrennt werden mit durchschnittlichen Peakhalbwertsbreiten von 3 Sekunden. Darüberhinaus gelang die effiziente Trennung von 10 Proteinen innerhalb von 30 min. Hierbei ist zu erwähnen, dass es möglich war, β -Lactoglobulin A und B mit ausreichender Auflösung zu trennen – ebenso wie die beiden Hämoglobin-Ketten α und β . Hierbei wurden Peakkapazitäten von 200 erreicht. Durch Erhöhung des Tetrahydrofuran-Gehalts im Polymerisationsgemisch gelang es, effiziente und äußerst permeable Trennsäulen zu synthetisieren. Die typischen Dimensionen der bislang verwendeten klassischen PS/DVB-Monolithen lagen üblicherweise bei 60 x 0.2 mm, weil aufgrund des relativ hohen Gegendrucks (130-160 bar bei einem Fluss

von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$) eine Erhöhung der Trenneffizienz durch Säulenverlängerung nur schwer realisierbar war. Mit Hilfe des modifizierten Polymerisationsgemisches war es möglich, Säulen von 150 x 0.2 mm bis 300 x 0.2 mm herzustellen. Die durchschnittlichen Gegendrücke der 300 x 0.2 mm Monolithen lagen bei 220 bis 260 bar bei einem Fluss von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ oder höher, wohingegen die 150 x 0.2 mm Monolithen Gegendrücke von 120 bis 180 bar lieferten. Mit Hilfe dieser Säulen konnten schnelle und effiziente Gradienten-Trennungen von dansylierten Aminosäuren mit Peakhalbwertsbreiten von knapp über fünf Sekunden für einen 30-Minuten-Gradienten erzielt werden. Isokratische Trennungen dansylierter Aminosäuren lieferten Bodenzahlen von 70,000 m^{-1} bis 100,000 m^{-1} . Beim Vergleich der Morphologien mittels Rasterelektronenmikroskopie von Monolithen mit klassischer Polymerisationsmischung und den Monolithen mit erhöhtem THF-Gehalt stellte sich heraus, dass ein erhöhter THF-Gehalt zu Ungunsten des Monomergehalts zu ca. 5-10 Mal größeren Globuli und deutlich größeren Makroporen führte, welche die erhöhte Permeabilität. Weitere Studien bzgl. der Morphologie und des Monolithen mittels Druck-Fluss-Diagrammen zeigten, dass das Material ausreichende mechanische Stabilität besitzt und keine Kompression oder Verformung einsetzte im getesteten Druckbereich bis 400 bar.

Auch die Aufnahme einer Van-Deemter-Kurve für Dansyl-Asparagin I ergab ein Minimum bei einer Trennstufenhöhe von ungefähr 10 μm bei einer Lineargeschwindigkeit von 0.41 mm/s, was einem Fluss von 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$ entspricht. Hieraus ergab sich eine Bodenzahl von über 30,000 für die Säule, bzw. 100,000 m^{-1} . Die Trennung von Parabenen, welche unter anderem als Konservierungsmittel in Kosmetika und Lebensmitteln eingesetzt werden, lieferte hierbei hochsymmetrische Peaks, die allerdings große Peakhalbwertsbreiten von 20 bis fast 40 Sekunden besaßen. Die Triazine, die im Bereich der Umweltanalytik eine wichtige Substanzklasse darstellen, konnten ebenfalls effizient und reproduzierbar getrennt werden.

Die strukturell und funktionell stark variierenden Antibiotika, die im Rahmen dieser Dissertation getestet wurden, lieferten sehr gute Trenneffizienzen mit Peakhalbwertsbreiten zwischen 3 und 5 s für einen 7.5-min-Gradienten. Hierbei wurden Antibiotika aus vier verschiedenen Substanzklassen (β -Lactam Penicilline, β -Lactam Cephalosporine, Fluorquinolone sowie Glykopeptide) mit Molmassen zwischen 300 und 1,500 Da untersucht, um eine möglichst große Bandbreite an

Substanzen abzudecken. Somit können PS/DVB-Monolithen beispielsweise in der Umweltanalytik eingesetzt werden, um Antibiotika aus Abwässern zu untersuchen bzw. besteht die Option zur Untersuchung möglicher Verunreinigungen bei der Synthese der Antibiotika. Für Schilddrüsenhormone wurden ähnliche Ergebnisse wie für die Antibiotika erhalten, wodurch ein Einsatz der Monolithen in der pharmazeutischen Qualitätssicherung realisierbar wäre.

Darüber hinaus verdeutlicht dieses Kapitel die Komplexität der Optimierung monolithischer Trennmedien auf Polymerbasis zur Trennung von kleinen Molekülen. Generell ist hierbei die Tatsache zu erwähnen, dass eines der Hauptprobleme der PS/DVB-Monolithen darin liegt, dass die Generierung einer bimodalen Porenverteilung nur sehr schwer umzusetzen ist. Wie die aktuellen Arbeiten von *Greiderer et al.* [^{124,125}] mit Monolithen auf Styrol-Basis zeigen, ist die Generierung einer bimodalen Porenverteilung beispielsweise durch Steuerung der *Polymerisationszeit* möglich. *Durch Reduktion der Polymerisationszeit* gelangen *Greiderer et al.* die Herstellung von Monolithen mit bimodaler Porenverteilung, durch die es möglich war, kleine Moleküle wie Alkylbenzole, Phenole oder Phenone ebenso zu trennen wie Oligonucleotide und Proteine.

Kapitel II

Evaluierung von monolithischen
50 x 1.0 mm I.D. PS/DVB-Säulen

1. Einleitung

Monolithische Trennmedien auf PS/DVB-Basis sind äußerst effiziente stationäre Phasen für Biopolymere wie Peptide, Proteine und Nucleinsäuren [110;126-128]. Die effizientesten Trennungen liefern hierbei normalerweise Kapillarmonolithen mit Innendurchmessern von 50-200 µm aufgrund der guten axialen und radialen Homogenität der stationären Phase. Diese geringen Innendurchmesser sind allerdings nicht nur mit Vorteilen verbunden, da durch die geringe Menge an stationärer Phase entsprechend geringere Beladbarkeiten der Säulen resultieren. Die Synthese von PS/DVB-Monolithen mit größeren Innendurchmessern und vergleichbarer Trenneffizienz wie die Kapillarsäulen ist hierbei schwierig zu realisieren. Problematisch sind hierbei Faktoren wie die radiale Homogenität oder auch die Stabilität der stationären Phase. In Kontakt mit Wasser neigt das monolithische PS/DVB-Skelett zum Schrumpfen, was sich bei Säulen mit geringen Innendurchmessern zwar kaum bemerkbar macht, aber bei Säulen mit beispielsweise 1 mm Innendurchmesser zur Zerstörung des Monolithen führen kann. Daher müssen solche Monolithen immer mit einem gewissen Anteil an Acetonitril in der mobile Phase (mindestens 5%) betrieben werden, um Schrumpffphänomenen entgegenwirken zu können. Gerade Säulen mit 1 mm Innendurchmesser stellen einen hervorragenden Kompromiss zwischen Beladbarkeit und Massenempfindlichkeit dar, weswegen sie bei Proteomanalysen sowohl in der ersten als auch zweiten Dimension eingesetzt werden können. Aufgrund der Säulendimensionen ist es möglich, größere Mengen an komplexen Proben zu fraktionieren; gleichzeitig können die Säulen aber auch in der zweiten Trenndimension ohne Split an ein Massenspektrometer gekoppelt werden, was das Anwendungsgebiet dieser Säulen deutlich ausweitet. Im zweiten Kapitel dieser Dissertation werden die für schnelle und effiziente Proteintrennungen optimierten 50 x 1.0 mm PS/DVB-Monolithen (ProSwift™ RP) der Firma Dionex Benelux (Amsterdam, Die Niederlande) eine ausführlichen Evaluierung unterzogen. Hierbei werden zuerst grundlegende Charakteristika der Monolithen wie Reproduzierbarkeiten, Verschleppungseffekte und Wiederfindungsraten untersucht. Im Anschluss werden mehrere Anwendungen der Säulen demonstriert, die die Analyse von Molkegetränken oder Hühnereiern bis hin zur Analyse von Antikörpern beinhaltet. Die Synthese von 1-mm-Monolithen erweist sich hierbei als deutlich

schwieriger als die Synthese von Kapillar-Monolithen mit Innendurchmessern von 200 μm oder kleiner: Im Gegensatz zu kleineren Säuleninnendurchmessern sind stabilisierende Wandeffekte bei Innendurchmessern von 1 mm nicht so stark ausgeprägt. Auch die Polymerisation selbst gestaltet sich als deutlich schwieriger, da das gebildete Polymer zur Schrumpfung neigt, was sich bei größeren Säuleninnendurchmessern und damit der Verwendung von größeren Mengen an Polymerisationsmischung stärker bemerkbar macht wie bei kleineren Säulendimensionen. Darüber hinaus stellen Faktoren wie radiale Homogenität, Temperaturkonstanz über den gesamten Kapillarinne Durchmesser oder ähnliche Phänomene ebenfalls schwer umzusetzende Syntheseparameter dar.

Generell bestehen mehrere Möglichkeiten, um Monolithen mit Innendurchmessern zu synthetisieren. Man kann beispielsweise PEEK-Kapillaren als HPLC-Säulenhülle verwenden, und den Monolithen kovalent an die PEEK-Kapillarwand binden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass man die Polymerisation in einem „Heat Shrink Tubing“ durchführt und dieses danach mit der Säulenhülle verklebt. Auch das verwendete Material der Säulenhülle ist wichtig. Hier reichen die Materialien von PEEK bis hin zu Stahl-Housings.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet. Die Polyimid-beschichteten amorphen Quarz-Kapillaren stammten von PolyMicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA).

Methanol (gradient grade) wurde von Acros (Geel, Belgien) bezogen. Acetonitril („gradient grade“) wurden von Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben. Die Proteine Ribonuclease A (Rind), Bovines Serum Albumin (BSA), Cytochrom C (Pferdeherz), Conalbumin (Hühnerei), Insulin (human, E. coli expressed), Lysozym (Hühnereiweiß), α -Lactalbumin (Rindermilch), Myoglobin (Pferd), Ovalbumin (Hühnerei), β -Lactoglobulin A (Rindermilch) und β -Lactoglobulin B (Rindermilch) stammten von Sigma (St. Louis, MO, USA). Hämoglobin (Rind) wurde bei Serva (Heidelberg, Germany). Das analysierte Molkegetränk „Strothmann Molke Drink, Diät, 0.1% Fett, Multivitamin) stammte von Campina (Heilbronn, Germany).

Bei den analysierten Hühnereiern handelte es sich um „Gold Eier“, (Bodenhaltung, Güteklasse A, Gewichtsklasse M, Packstelle DE-160001). Der Proteinextrakt aus dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides* wurde von Dr. med. Nathalie Acevedo im Rahmen eines Kooperationsprojekts zur Verfügung gestellt. Bei den analysierten Antikörpern (Maus-IgG) sowie den monoklonalen Antikörpern Bet v 1 5.1 (stark bindend) und Bet v 1 8.3 (schwach bindend) handelte es sich um Antikörper gegen das Birkenpollenhauptallergen Bet v 1, die mittels Affinitätschromatographie im eigenen Arbeitskreis [¹²⁹] aufgereinigt wurden.

2.2 HPLC-Systeme

Die Micro/Nano-HPLC-Apparatur mit Hochdruckgradientensystem bestand aus einer Hochdruckgradientensteuereinheit (HPLC Central Processor, Bischoff Analystechnik, Leonberg, Deutschland), welche zwei Laufmittelpumpen „HPLC Compact“ der Firma Bischoff Analystechnik (Leonberg, Deutschland) steuerte. Das Niederdruckgradientensystem bestand aus einer Komplettapparatur der Smartline-Produktlinie (Firma Knauer, Berlin, Deutschland) und aus einem UV-Detektor („Smartline UV Detector 2500“), dem „Smartline Manager 5000“ mit integriertem Entgaser und einer Pumpe („Smartline Pump 1,000“, Niederdruckgradientensystem) mit integrierter Mischkammer. Darüber hinaus beinhaltete die Apparatur einen Mini-Thermostat (Eigenbau) sowie einen UV-Detektor (UltiMate UV/VIS-Detektor der Firma LC-Packings – A Dionex Company, Amsterdam, Niederlande), kombiniert mit Durchflusszellen ($V = 3$ nl, Lichtweg: 10 mm, Kapillar-I.D. 20 μ m) von LC Packings – A Dionex Company, Amsterdam, Niederlande. Zur online-Laufmittelentgasung wurde zwischen Laufmittelvorrat und den Pumpen ein Entgaser von Knauer (Berlin, Deutschland) zwischengeschaltet. Beide Laufmittelströme wurden über ein T-Stück (Firma Valco, Schenk, Schweiz) in eine Mischkammer (Firma Lee, Westbrook, CT) geführt; der anschließende Split erfolgte über ein weiteres T-Stück (Firma Valco, Schenk, Schweiz). Der selbstgebaute Säulenofen besteht aus einem Kunststoffgehäuse mit einem extern steuerbaren Heizelement sowie einem Ventilator zur gleichmäßigen Erwärmung des Ofeninnenraumes. Der Probengeber (4-Wege-Rotationsinjektor) stammt von der Firma Valco (Schenk, Schweiz) und ist direkt mit der Trennsäule verbunden.

Das verwendete Niederdruckgradientensystem bestand aus einer Komplettapparatur der Smartline-Produktlinie (Firma Knauer, Berlin, Deutschland) und aus einem UV-Detektor („Smartline UV Detector 2500“), dem „Smartline Manager 5000“ mit integriertem Entgaser und einer Pumpe („Smartline Pump 1,000“, Niederdruckgradientensystem) mit integrierter Mischkammer. Zur Laufmittelentgasung wurde zwischen Laufmittelvorrat und den Pumpen ein Entgaser von Knauer (Berlin, Deutschland) zwischengeschaltet. Der selbstgebaute Säulenofen bestand aus einem Kunststoffgehäuse mit einem extern steuerbaren Heizelement sowie einem Ventilator zur gleichmäßigen Erwärmung des Ofeninnenraumes. Der Probengeber (4-Wege-Rotationsinjektor) stammte von der Firma Valco (Schenkon, Schweiz) und war direkt mit der Trennsäule verbunden.

Für die Wiederfindungs- und Carryover-Experimente wurde ein Niederdruckgradienten-HPLC-System („Accela“, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) verwendet.

2.3 Massenspektrometer

Für die Carryover-Experimente wurde ein LTQ Orbitrap XL Massenanalysator (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland) benutzt. Zur Kopplung der 50 x 1.0 mm ProSwift RP Monolithen wurde die „Ion Max“ ESI-Quelle mit einer 34-gauge-Metallnadel (beide ThermoFisher Scientific) verwendet. Die Orbitrap wurde dabei unter Verwendung folgender Parameter betrieben: Sheath Gas: 5 units, Auxillary Gas: 5 units, Spray Voltage: 3 kV, Capillary Voltage: 48 V, Capillary Temperature: 280 °C, Orbitrap ACG: 10⁶.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Säulen zu testen, wurden im ersten Experiment zwei unterschiedliche ProSwift-Säulen nach dem folgenden Protokoll getestet (**Abbildung 56**):

Eluent A	0.050% TFA in Wasser
Eluent B	0.040% TFA in 80:20% ACN:Wasser
Flussrate	60 µl/min
Säulengegendruck	nicht größer als 230 bar
Gradient	15-80% B in 10 min
Injektion	1.0 µl
Temperatur	60 °C
UV-Detektion	214 nm (45 nL flow cell)
Probe	Ribonuclease A (Rind) Myoglobin (Pferd) Carboanhydrase (Rind), jeweils 0.05 mg/mL

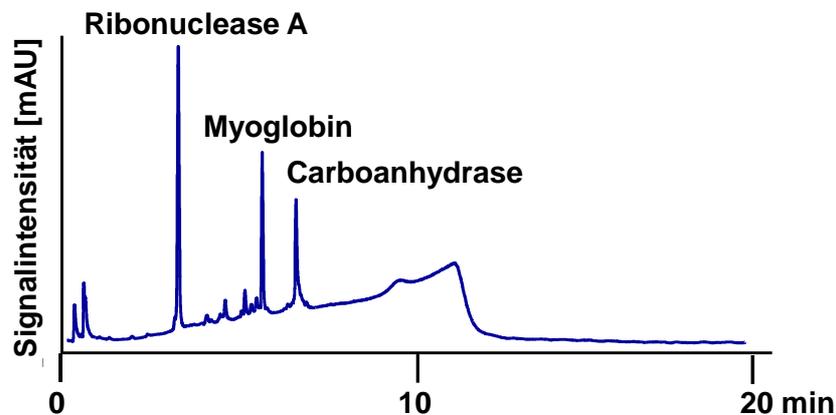


Abbildung 56: Beispielchromatogramm der Trennung des Proteinstandards nach den Vorgaben von Dionex Benelux.

Tabelle 26: Chromatographische Daten des ProSwift Monolithen S/N 43698 für sieben Trennungen nach dem Testprotokoll.

Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.29	0.064	1.07
2	Myoglobin	5.83	0.059	1.30
3	Carbonanhydrase	6.79	0.062	1.69
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.30	0.065	1.09
2	Myoglobin	5.84	0.063	1.31
3	Carbonanhydrase	6.92	0.065	1.46
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.28	0.056	1.10
2	Myoglobin	5.84	0.056	1.34
3	Carbonanhydrase	6.89	0.066	1.37
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.20	0.060	1.07
2	Myoglobin	5.74	0.053	1.33
3	Carbonanhydrase	6.75	0.060	1.56
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.21	0.052	1.10
2	Myoglobin	5.74	0.049	1.40
3	Carbonanhydrase	6.75	0.061	1.65
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.33	0.056	1.08
2	Myoglobin	5.83	0.055	1.36
3	Carbonanhydrase	6.92	0.071	1.81
Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.27	0.057	1.11
2	Myoglobin	5.76	0.050	1.37
3	Carbonanhydrase	6.76	0.059	1.69
Protein	Standardabweichung für t_R	RSD für t_R [%]		
Ribonuclease A	0.047	1.5		
Myoglobin	0.048	0.8		
Carbonanhydrase	0.081	1.2		
Protein	Standardabweichung für w_h [min]	RSD für w_h [%]		
Ribonuclease A	0.0046	8.0		
Myoglobin	0.0049	9.0		
Carbonanhydrase	0.0042	6.6		
Protein	Standardabweichung für T	RSD für T [%]		
Ribonuclease A	0.02	1.5		
Myoglobin	0.04	2.6		
Carbonanhydrase	0.15	9.4		

Tabelle 27: Chromatographische Daten des ProSwift Monoliths S/N 43699 für sieben Analysen

Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.41	0.057	1.13
2	Myoglobin	5.97	0.052	1.59
3	Carbonanhydrase	6.93	0.067	1.97
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.37	0.059	1.23
2	Myoglobin	5.95	0.052	1.63
3	Carbonanhydrase	6.96	0.062	1.57
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.37	0.059	1.23
2	Myoglobin	5.99	0.052	1.61
3	Carbonanhydrase	7.00	0.062	1.63
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.40	0.054	1.19
2	Myoglobin	5.94	0.052	1.58
3	Carbonanhydrase	6.95	0.056	1.70
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.40	0.059	1.24
2	Myoglobin	5.94	0.051	1.52
3	Carbonanhydrase	6.99	0.061	1.59
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.35	0.057	1.20
2	Myoglobin	5.91	0.054	1.51
3	Carbonanhydrase	6.92	0.062	1.67
Peak	Protein	t _R [min]	w _h [min]	T
1	Ribonuclease A	3.36	0.060	1.22
2	Myoglobin	5.90	0.050	1.53
3	Carbonanhydrase	6.93	0.063	1.63
Protein	Standardabweichung für t _R	RSD für t _R [%]		
Ribonuclease A	0.023	0.7		
Myoglobin	0.031	0.5		
Carbonanhydrase	0.031	0.4		
	Standardabweichung für w _h [min]	RSD für w _h [%]		
Ribonuclease A	0,0020	3.5		
Myoglobin	0,0012	2.3		
Carbonanhydrase	0,0032	5.2		
	Standardabweichung für T	RSD für T [%]		
Ribonuclease A	0.04	3.1		
Myoglobin	0.05	3.0		
Carbonanhydrase	0.14	8.1		

Wie **Tabelle 26** zu entnehmen ist, betragen die relativen Standardabweichungen für die Retentionszeiten für Säule S/N 43698 1.5% für Ribonuclease A, 0.8% für Myoglobin sowie 1.2% für Carboanhydrase, was einer mittleren relativen Standardabweichung von 1.17% für alle drei Proteine entspricht und einen akzeptablen Wert darstellte. Die Peakhalbwertsbreiten dieser Säule schwankten zwischen je nach Protein zwischen 7 und 9% (RSD), wogegen die Asymmetriefaktoren zwischen 1.5 und 9.4% abwichen (RSD).

Wie aus **Tabelle 27** hervorgeht, lagen die relativen Standardabweichungen für die Retentionszeiten aus sieben Wiederholungsmessungen (S/N= 43699) deutlich unter 1%, z.B. 0.7% für Ribonuclease A, 0.5% für Myoglobin sowie 0.4% für Carboanhydrase, was für eine hohe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten mit einer mittleren relativen Standardabweichung von 0.53% entspricht und somit einen deutlich besseren Wert darstellt wie für Säule S/N 43698. Vergleicht man die relativen Standardabweichungen der Peakhalbwertsbreiten, so wird deutlich, dass die Werte je nach Protein zwischen 2% und 5% schwanken. Die Peakhalbwertsbreiten schwankten für alle Proteine generell zwischen 0.052 min und 0.067 min., Betrachtet man beispielsweise die Myoglobin-Peaks, so schwankten die Peakhalbwertsbreiten in den sieben Wiederholungsmessungen lediglich zwischen 0.050 und 0.054 min was einer relativen Standardabweichung von 2.3% entspricht. Ein Blick auf die Asymmetriefaktoren zeigt die leichte bis mittelstarke Tendenz zum Tailing für alle Peaks. Ribonuclease A zeigte durchgehend eine leichte Tendenz zum Tailing mit Werten zwischen 1.13 und 1.24, was einer relativen Standardabweichung von lediglich 3.1% entspricht. Myoglobin und Carboanhydrase zeigten eine deutlich stärkere Tendenz zum Tailing mit Werten größer als 1.5 oder 1.6.

Insgesamt zeigte Säule S/N 43699 deutlich bessere Reproduzierbarkeiten bzgl. Retentionszeit, Peakhalbwertsbreiten sowie Asymmetriefaktoren. Auch die Trenneffizienz war deutlich besser, was durch die besseren Peakhalbwertsbreiten und Asymmetriefaktoren bewiesen werden konnte. Für alle weiteren Experimente in diesem Kapitel wurde somit der 50 x 1.0 mm ProSwift Monolith mit der Seriennummer 43699 verwendet.

Um die Reproduzierbarkeit der Säulen im Hinblick auf komplexere Proteinmischungen genauer zu charakterisieren, wurde im nächsten Experiment die Reproduzierbarkeit einer 9er-Proteinmischung realisiert:

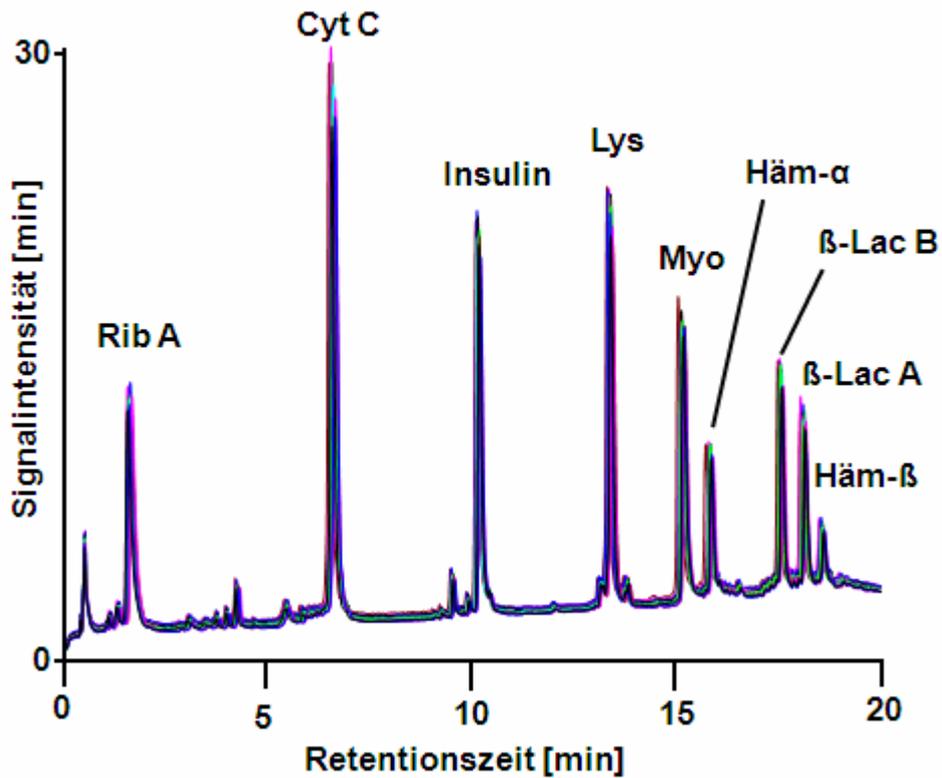


Abbildung 57: 20 übereinanderlegte Trennungen eines 9er Proteinstandards. Ribonuclease A (1), Cytochrom C (2), Insulin (3), Lysozym (4), Myoglobin (5), Hämoglobin- α (6), β -Lactoglobulin B (7), β -Lactoglobulin A (8), Hämoglobin- β (9); Säule: 50 x 1.0 mm ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Gradient: 20-50% Acetonitril + 0.050% TFA in 30 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 1000 nl, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 28: Mittelwerte der wichtigsten chromatographischen Parameter von 20 Replikaten eines 9er-Proteinstandards. Chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 59.

Peak	Protein	t_R [min]	Peakfläche [mAU*min]	w_b [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	1.588	1.799	0.205	0.126	2.303
2	Cytochrom C	6.566	3.614	0.181	0.109	1.511
3	Insulin	10.119	2.282	0.158	0.094	1.946
4	Lysozym	13.342	2.470	0.164	0.098	0.815
5	Myoglobin	15.104	1.936	0.199	0.119	1.906
6	Hämoglobin- α	15.792	0.718	0.150	0.091	1.467
7	β -Lactoglobulin B	17.518	1.076	0.147	0.088	1.544
8	β -Lactoglobulin A	18.074	0.912	0.153	0.091	1.675
9	Hämoglobin- β	18.531	0.284	0.152	0.088	1.269

Tabelle 29: Absolute Standardabweichungen der wichtigsten chromatographischen Parameter von 20 Replikaten eines 9er-Proteinstandards. Chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 59.

Peak	Protein	t_R [min]	Peakfläche [mAU*min]	w_b [min]	w_h [min]	T
1	Ribonuclease A	0.034	0.038	0.007	0.003	0.319
2	Cytochrom C	0.039	0.082	0.009	0.004	0.035
3	Insulin	0.043	0.047	0.004	0.004	0.036
4	Lysozym	0.044	0.056	0.008	0.003	0.009
5	Myoglobin	0.047	0.060	0.009	0.004	0.029
6	Hämoglobin- α	0.047	0.031	0.006	0.002	0.098
7	β -Lactoglobulin B	0.039	0.037	0.008	0.002	0.032
8	β -Lactoglobulin A	0.047	0.030	0.007	0.003	0.029
9	Hämoglobin- β	0.050	0.012	0.007	0.002	0.164

Tabelle 30: Relative Standardabweichungen in Prozent der wichtigsten chromatographischen Parameter von 20 Replikaten eines 9er-Proteinstandards, chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 59.

Peak	Protein	t_R [%]	Peakfläche [%]	w_b [%]	w_h [%]	T [%]
1	Ribonuclease A	2.152	2.110	3.600	2.670	13.843
2	Cytochrom C	0.588	2.261	4.789	3.701	1.511
3	Insulin	0.420	2.077	2.828	3.748	1.875
4	Lysozym	0.329	2.268	4.851	2.820	1.160
5	Myoglobin	0.309	3.122	4.453	3.692	1.526
6	Hämoglobin- α	0.297	4.364	3.786	2.715	6.664
7	β -Lactoglobulin B	0.224	3.433	5.343	2.720	2.094
8	β -Lactoglobulin A	0.262	3.310	4.724	3.431	1.749
9	Hämoglobin- β	0.268	4.106	4.671	2.152	12.934

Wie Abbildung 57 und den Tabellen 28-30 zu entnehmen ist, konnte die Trennung des Proteinstandards sowohl mit hoher Reproduzierbarkeit als auch mit hoher Trenneffizienz realisiert werden: Die mittleren Peakhalbwertsbreiten schwankten zwischen 0.088 und 0.126 min, . Die Peaksymmetrie implizierte je nach Peak leichtes bis starkes Tailing bei Asymmetriefaktoren zwischen 1.3 und 2. Die Peakbasisbreiten lagen im Bereich zwischen 0.15 und 0.20 min, was Peakkapazitäten von 150-200 bedeutet, wenn man die gesamte Gradientenzeit miteinbezieht. Benutzt man das Elutionsfenster der Proteine als Referenzwert, so liegen die Peakkapazitäten in einem Bereich von 100-130. Was die relativen Standardabweichungen angeht, so ergaben sich folgende Werte:

- Die relative Standardabweichung der Retentionszeiten lagen zwischen 0.2 und 0.6%, was für eine sehr hohe Reproduzierbarkeit spricht. Lediglich eine Ausnahme (Peak 1, Ribonuclease A) zeigte eine relative Standardabweichung

von knapp über 2%. Hierbei handelt es sich um den zuerst eluierenden Peak mit der mit Abstand kleinsten Retentionszeit. Dementsprechend war die relative Standardabweichung entsprechend hoch. Ein Vergleich der absoluten Standardabweichungen ergab eine Abweichung von 0.034 min für Ribonuclease A, was innerhalb der Werte der restlichen Proteine liegt.

- Vergleicht man die relativen Standardabweichungen der Peakflächen, erhält man Werte zwischen 2.1 und 4.4%, was ebenfalls für eine sehr gute Reproduzierbarkeit spricht angesichts der Tatsache, dass es sich bei den Analyten um Proteine handelt.
- Die Peakbreiten zeigten ein ähnlich gutes Ergebnis: Während die relativen Standardabweichungen der Peakhalbwertsbreiten zwischen 2.2 und 3.5% schwankten, waren die Standardabweichungen der Basisbreiten etwas höher (2.8 bis 5.3%). Dies kann damit zusammenhängen, dass die Peakbasisbreite bei der Integration fehleranfälliger ist als die Bestimmung der Peakhalbwertsbreiten. Insbesondere bei Proteinen gestaltet sich die Bestimmung der Peakbasisbreite aufgrund von Isoformen und herstellungsbedingten Verunreinigungen bzw. bei der Realprobe aufgrund der hohen Komplexität als äußerst schwierig.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Trenneffizienz beispielsweise mit den Ergebnissen der Dissertation von *Manuela Hügel* (2008, Universität des Saarlandes), die nahezu identische Proteinmischungen auf 200 µm I.D. PS/DVB-Monolithen trennte, so konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden im Hinblick auf Selektivität und Trenneffizienz: Sowohl auf den 200 µm als auch auf den 1 mm Monolithen gelang die Basislinientrennung der Isoformen β -Lactoglobulin A und B. Vergleicht man die erhaltenen Werte auf dem 1 mm Monolithen mit den in **Kapitel 1, Abschnitt 3.7** beschriebenen Proteintrennungen – ebenfalls durchgeführt auf 200 µm Monolithen), so wird dieser Trend bestätigt. In beiden Fällen konnten Peakhalbwertsbreiten kleiner als 6 Sekunden realisiert werden. Hierbei kann die Trenneffizienz von Monolithen mit kleineren Innendurchmessern tendenziell als etwas besser eingestuft werden im Vergleich zu den 1-mm-Monolithen, was u.a. auf homogenere Morphologien bzw. herstellungsspezifische Faktoren bei kleineren Säulen-I.D. zurückgeführt werden kann.

3.2 Mechanische Stabilität und Quellverhalten

Um die mechanische Stabilität der 50 x 1-mm- Monolithen zu testen, wurde die Fluss-Druck-Kurve bei Flussraten von 0 bis 160 $\mu\text{l}/\text{min}$ unter Verwendung der gängigsten HPLC-Eluenten (Wasser, Methanol, Acetonitril und THF) mit dem UltiMate-3000-nano-HPLC-System aufgezeichnet. Statt reinen Acetonitrils wurde eine Mischung von 5% Acetonitril in Wasser verwendet, da das monolithische PS/DVB-Material laut Herstellerangaben in reinem Wasser zu signifikantem Schrumpfen neigt, was zur Zerstörung des Monolithen führen kann. Man erkennt deutlich den linearen Zusammenhang zwischen volumetrischer Flussrate und Gegendruck der Säule mit R^2 -Werten von 0.998 oder besser. Die Ausnahme bildet hierbei THF ($R^2= 0.991$). Die Verwendung von Acetonitril, welches die geringste Viskosität der verwendeten Eluenten besitzt, führte zu den kleinsten Gegendrücken der Säule. Der höchste Druckabfall wurde mit 5% Acetonitril in Wasser detektiert. Theoretisch sollte der Druckabfall in direktem Zusammenhang mit der Viskosität der verwendeten Eluenten einhergehen. Demensprechend liegt der Gegendruck des Monolithen unter Verwendung von Methanol zwischen den Werten von Acetonitril und Wasser, da Methanol viskoser als Acetonitril ist, aber keine so hohe Viskosität wie Wasser besitzt. Die Ausnahme hierbei stellte THF war, welches einen ähnlichen Gegendruck wie das Wasser/Acetonitril-Gemisch lieferte, aber eine Viskosität besitzt, die zwischen der von Acetonitril und Methanol liegt. Demnach liegt der Grund für den hohen Gegendruck in den Quelleigenschaften des PS-DVB-Copolymers: Durch die Verwendung von THF quillt das Polymer, wodurch die Poren kleiner und der Gegendruck der Säule größer wird. Da der Gegendruck von THF aber immer noch geringer wie der von Wasser ist, kann man die Monolithen aufgrund des moderaten Quellverhaltens problemlos mit THF als Laufmittel betreiben. Normalisiert man den Druck auf die Laufmittelviskosität (**Abbildung 58**) und trägt die berechneten Werte gegen die Flussrate auf, erkennt man, dass die Druck/Viskositäts-Verhältnisse im Einklang mit den Solventpolaritäten ist: Mit abnehmender Solventpolarität nimmt das Quellverhalten des Polymers leicht zu. Am stärksten quillt das Polymer erwartungsgemäß mit THF.

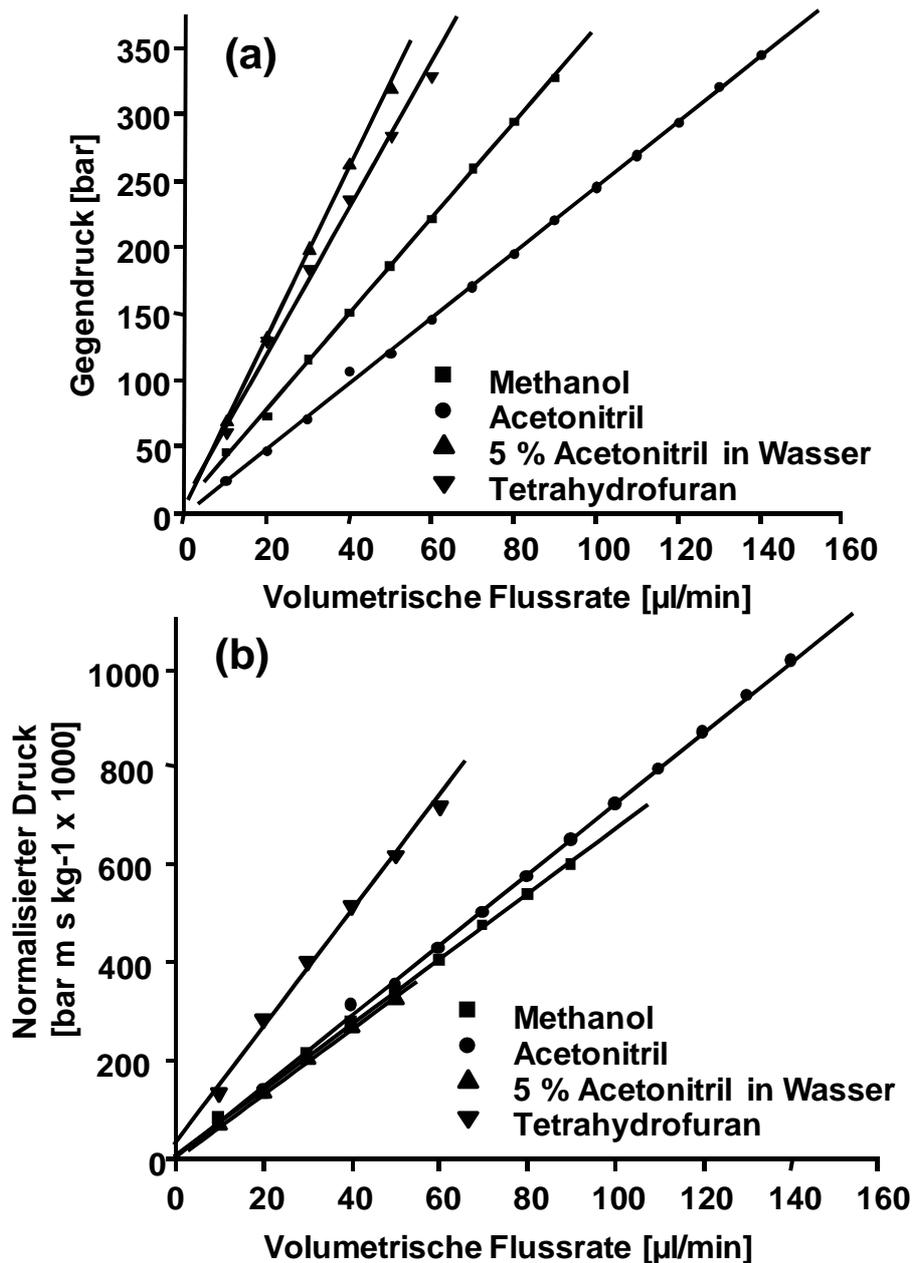


Abbildung 58: Fluss/Druck-Kurve (a) und auf Viskosität normalisierter Druck, aufgetragen gegen die volumetrische Flussrate (b) eines 50 x 1.0 mm ProSwift-Monolithen unter der Verwendung mehrerer Laufmittel. Säule: PS/DVB-Monolith, 50 x 1.0 mm I.D., Eluenten: (■) Methanol, (●) Acetonitril, (▲) 5% Acetonitril in Wasser, (▼) Tetrahydrofuran; Temperatur, 25 °C.

Vergleicht man die erhaltenen Werte beispielsweise mit denen von *Premstaller et al.* [114], die in ihren Arbeiten analoge Experimente mit Kapillar-Monolithen auf PS/DVB-Basis durchführten, so zeigten sich einige Unterschiede bzgl. des Quellverhaltens: In den Arbeiten von *Premstaller et al.* führte die Verwendung von THF zu den höchsten Gegendrücken in den Flussrate-vs.-Säulengegendruck-Diagrammen, was für ein signifikantes Quellen des Polymers spricht. Bei der Verwendung der 50 x 1.0 mm Monolithen im Rahmen dieser Arbeit führte die Verwendung von THF nur zu den zweithöchsten Gegendrücken, wodurch die Quelleigenschaften des verwendeten

PS/DVB-Materials anders sind als im Vergleich zu den PS/DVB-Kapillarmonolithen in den Arbeiten von *Premstaller et al.*

Darüber hinaus wird deutlich, dass auch bei Monolithen mit größeren Innendurchmessern bis zum oberen Limit des verwendeten HPLC-Systems (bis 400 bar) keine Verformung des Materials einsetzte,

Ein Vergleich mit PS/DVB-Monolithen mit Innendurchmessern von 4.6 mm [^{130;131}] resultiert in vergleichbaren Ergebnissen: Durch die hohe Permeabilität konnten Flussraten bis 10 ml/min generiert werden, wodurch Proteintrennung in weniger als 20 Sekunden durchgeführt werden konnte und dabei keine mechanische Deformierung der Monolithen infolge des Gegendrucks einsetzte.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit PS/DVB-Partikeln [^{132;132}] zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei PS/DVB-Monolithen. *Maa et al.* verwendeten bei ihren Experimenten 30 x 4.6 mm Säulen, gepackt mit nicht-porösen quervernetzten Polystyrol-Partikeln mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 3 µm. Auch dort wurde festgestellt, dass das Polymer in den organischen Lösungsmitteln tendenziell zum Quellen neigt, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Trennleistung hat. *Ma et al.* haben hierbei eine 5-8%-ige Größenänderung im Partikeldurchmesser postuliert.

3.3 Carryover-Effekte und Wiederfindung von Proteinen

3.3.1 Carryover-Effekte von Proteinen

Unter Carryover-Effekten versteht man generell Verschleppungsphänomene von Analyten, meistens aus dem vorhergehenden Analysenlauf, die die darauffolgenden Messungen negativ beeinflussen können. Gerade im Bereich der Bioanalytik können Carryover-Effekte einen entscheidenden Einfluss auf Faktoren wie Präzision und Genauigkeit von HPLC- bzw. HPLC-MS-Methoden haben, die sich insbesondere bei kleinen Probemengen und geringen Probenkonzentration bemerkbar machen und die empfindlichen Analysen stören können. Darüber hinaus werden die Detektionssysteme immer empfindlicher, was die Auswirkungen von Analytverschleppungen signifikant erhöht. Gerade in der Proteinanalytik, bei der die Proteine durch Mehrpunktadsorption mit der stationären Phase wechselwirken, können Carryover-Effekte zum Problem werden, vor allem, wenn Konzentrationen in der Nähe der Nachweisgrenze analysiert werden.

Carryover-Effekte können ihren Ursprung nicht nur in der stationären Phase haben, an der die Proteine adsorbieren und stellenweise noch mehrere Läufe später in den Chromatogrammen finden sind. Sie können darüber hinaus auch durch Adsorption an Fritten, Verbindungen oder auch durch unzureichendes Spülen des Autosamplers auftreten.

Eine einfache Methode zur Carryover-Bestimmung besteht darin, dass man das zu testende System über Nacht mit mehreren Blindgradienten spült, um sicherzugehen, dass die Säule keine Analyten mehr enthält. Hierbei sollte man auf die empfindliche und nachweisstarke Massenspektrometrie als Detektionsmethode zurückgreifen, um auch Carryover-Effekte im Femtomol-Bereich oder niedriger erkennen zu können. Auf die anschließende Injektion und Trennung einer Standardmischung aus verschiedenen Proteinen folgen dann mehrere Blankläufe, um mögliche Carryover-Effekte detektieren zu können.

Zur Bestimmung möglicher Carryover-Effekte wurde ein ProSwift 50 x 1.0 mm PS/DVB-Monolith über Nacht mit 100% Acetonitril gespült und im Anschluss nach drei Blindgradienten (20-60% Acetonitril + 0.050% TFA in 45 min) mehrere Stunden mit 20% Acetonitril + 0.050% TFA equilibriert. Im Anschluss erfolgte die Trennung einer Proteinmischung bestehend aus BSA, Ribonuclease A, Myoglobin und Ovalbumin.

Nach der Trennung des Proteinstandards folgten mehrere Blankläufe unter den identischen Bedingungen. Wie **Abbildung 59** zu entnehmen ist, ist bereits im ersten Blanklauf nach der Injektion weder Ribonuclease A noch Ovalbumin im Rahmen der Nachweisgrenzen des LTQ Orbitrap Massenanalysators zu finden. Auch bei der gezielten Suche mittels EIC sind keine Protein-Ladungszustände von Ribonuclease A oder Ovalbumin zu finden, die ein Signal-zu-Rauschen von 3:1 übersteigen. Somit können Ribonuclease A und Ovalbumin bereits im ersten Blindgradienten nach der Trennung nicht mehr detektiert werden. Die Nachweisgrenze der Orbitrap für Proteine dieser Größe (nähere Details siehe **Kapitel III**) liegt normalerweise je nach Protein im niedrigen Femtomol-Bereich (2-40 fmol). Im unmittelbar auf die Trennung folgenden Blindgradienten ist lediglich ein Peak bei 35 min zu erkennen, der aufsummiert keine Proteinsignale von Myoglobin oder BSA enthielt (**Abbildung 59**). Somit konnte gezeigt werden, dass bereits im Blanklauf nach der Proteininjektion

keine Verschleppungen von Ribonuclease A, BSA, Ovalbumin und Myoglobin zu erkennen sind.

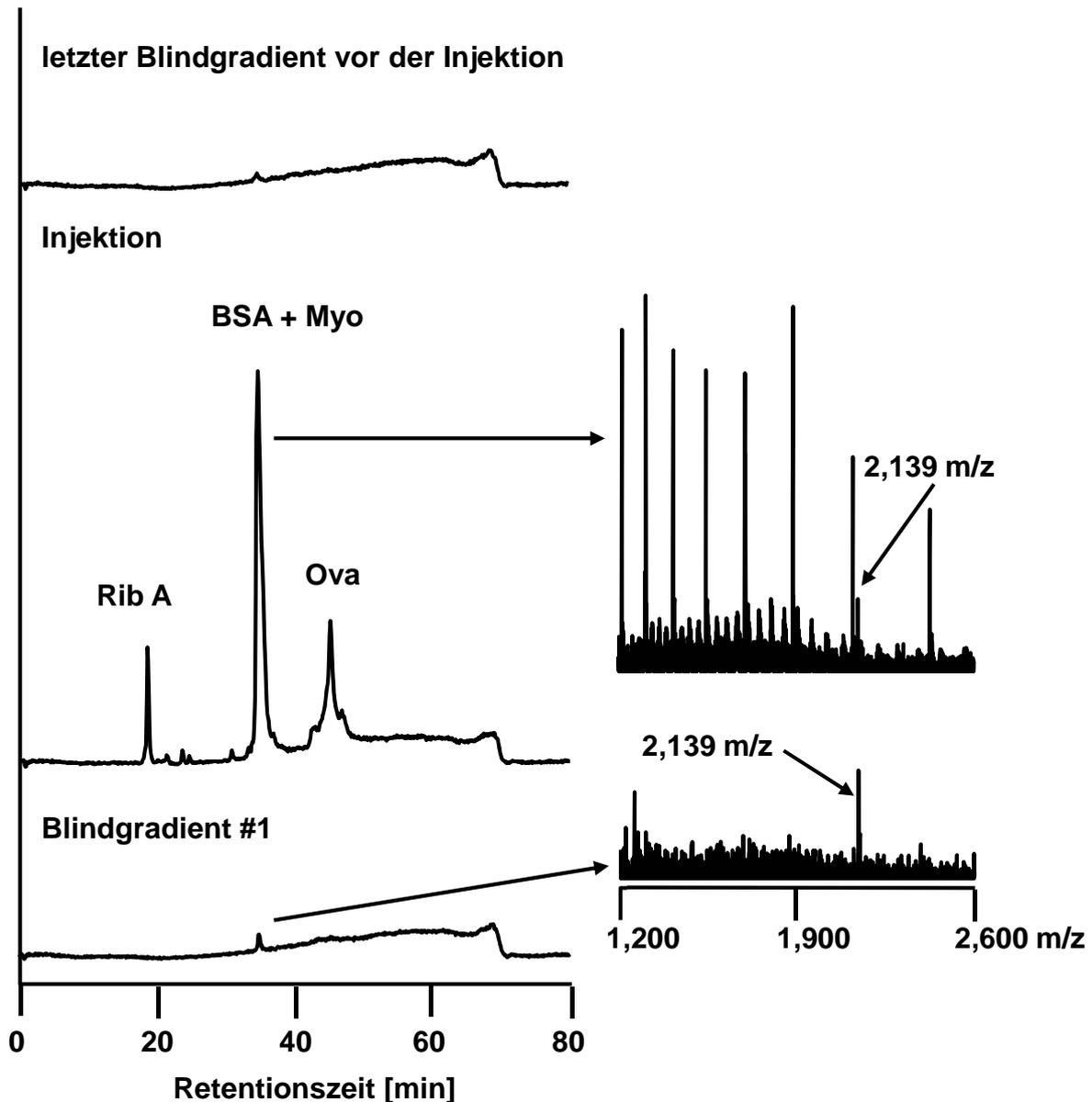


Abbildung 59: Bestimmung der Carryover-Effekte auf einem ProSwift 50 x 1.0 mm PS/DVB-Monolithen (RTICCs). Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; Gradient: 20-60% B in 45 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 1000 nl; Proteinmengen jeweils 50 ng; MS-Detektion (LTQ Orbitrap MS, R= 100,000, positiver Modus, ESI).

Im zweiten und dritten Blindgradienten nach der Proteininjektion ist der Peak bei 35 min verschwunden; in diesen Blindgradienten sind durchgehend keine Proteinsignale nachweisbar. Somit zeigen die ProSwift-Monolithen keine Carryover-Effekte für die getesteten Proteine und sind somit bestens geeignet für die Analyse selbst kleinster Probemengen in der Nähe der Nachweisgrenze. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denselben Proteinen, die von *Eschelbach et al.* auf Kapillarsäulen durchgeführt

wurden, die mit porösen 1.9 µm bzw. 5 µm ethylverbrückten C18-Teilchen gepackt waren [123], lieferte folgende Ergebnisse: Unter Normaldruck (p= 160 bar) waren selbst nach der dritten Injektion noch deutliche Spuren aller Proteine bis auf Ribonuclease im RTICC zu erkennen. Die Messungen von *Eschelbach et al.* wurden dabei mit einem Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt. Ähnliche Carryover-Ergebnisse wie für die ProSwift-Monolithen konnten *Eschelbach et al.* nur unter Ultrahochdruck-Bedingungen realisieren.

3.3.2 Wiederfindung von Proteinen

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung von stationären Phasen sind die Wiederfindungsraten der Analyten, d.h. wie groß die Diskrepanz zwischen injizierter und detektierter Analytmenge ist. Diese Probleme erschweren die Analyse intakter Proteine mittels (IP-)RP-HPLC oftmals erheblich.

Auch wenn die exakte Bestimmung der Wiederfindung von Proteinen auf den ersten Blick trivial zu sein scheint, so müssen hierbei einige Faktoren beachtet werden:

Die Wiederfindungsrate kann beispielsweise nicht einfach durch Injektionen von bekannten Proteinmengen mit und ohne Säule unter UV-Detektion realisiert werden, da die Störung in der Basislinie durch die Injektion einen erheblichen Einfluss auf die Peakflächen im UV-Spektrum hat, was zu großen Fehlern bei der Bestimmung der Wiederfindung führt. Einen interessanten und exakten Ansatz zur Bestimmung der Wiederfindung von Proteinen lieferten *Eschelbach* und *Jorgenson* [123]: Durch Kalibrierung des UV-Detektors mittels Direktinfusion bestimmter Proteine mit verschiedenen Konzentrationen und unter Auftragung der Signalhöhe gegen die Proteinkonzentrationen kann eine Kalibriergerade für jedes der zu untersuchenden Proteine aufgenommen werden. Nach linearer Regression kann dann für jedes Protein ein Responsefaktor bestimmt werden. Im Anschluss erfolgt die Trennung der Proteine auf der zu untersuchenden Säule. Auch hier werden sukzessiv unterschiedliche Proteinmengen injiziert, die im Konzentrationsbereich der vorher aufgenommenen Kalibriergeraden liegen müssen. Über die Peakvolumina und die vorher bestimmten Responsefaktoren können dann für jedes Protein die Wiederfindungsraten für die verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden. Wichtig bei dieser Methode ist die Tatsache, dass bei der Kalibrierung des UV-Detektors die Absorption des Eluenten berücksichtigt werden muss. Untersucht man mehrere Proteine in einer Mischung, muss die Eluentzusammensetzung bei der

Elution des entsprechenden Proteins berücksichtigt werden. Eluiert das Protein beispielsweise bei 40% Acetonitril + 0.050% TFA, muss zur Kalibrierung des UV-Detektors das Protein in 40% Acetonitril + 0.050% TFA gelöst injiziert werden. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Proteinen auf den 50 x 1.0 mm ProSwift-Monolithen wurden analog zu *Eschelbach et al.* [¹²³] die Proteine Ribonuclease A, BSA sowie Ovalbumin benutzt. Im ersten Schritt wurde die Trennung der drei Proteine optimiert, bei dem die optimierten Parameter wie folgt aussahen:

- Eluent A: Wasser + 0.050% TFA
- Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA
- Gradient: 20-60% B in 45 min
- UV-Detektion: 214 nm
- Flussrate: 60 µl/min
- Temperatur: 60 °C
- $V_{\text{injection}}$: 1.0 µl

Die drei Proteine eluierten hierbei bei den folgenden Laufmittelzusammensetzungen Ribonuclease A bei 14% B, BSA bei 31% B sowie Ovalbumin bei 43% B. Demnach wurden zur Kalibrierung des UV-Detektors die Proteine in den entsprechenden Laufmittelzusammensetzungen, bei denen sie eluieren, gelöst, um die Absorption des Laufmittels zu berücksichtigen.

Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Verdünnungsreihen der Proteine angesetzt, um den Detektor zu kalibrieren. Die genauen Einwaagen und Konzentrationen der Stammlösungen können **Tabelle 31** entnommen werden.

Tabelle 31: Genaue Einwaagen und Gehalt der Stammlösung für die Kalibrierung des UV-Detektors.

	Ribonuclease A	BSA	Ovalbumin
Einwaage [mg]	2.10	2.16	2.23
Stammlösung [mg/ml]	1.05	1.08	1.12

Danach wurden die einzelnen Proteine auf entsprechende Konzentrationen zwischen 0 und 80 ng/µl mit den entsprechenden Eluentzusammensetzungen verdünnt. Dabei

wurden pro Protein fünf verschiedene Konzentrationen jeweils drei Mal in den Detektor bei 214 nm injiziert und die Signalhöhe aufgenommen (**Tabelle 32**).

Tabelle 32: Werte für Konzentration und Response von Ribonuclease A, BSA und Ovalbumin.

Ribonuclease A		BSA		Ovalbumin	
Konzentration [ng/μl]	Response [mAU]	Konzentration [ng/μl]	Response [mAU]	Konzentration [ng/μl]	Response [mAU]
0.00	0	0.00	0	0.00	0
0.00	0	0.00	0	0.00	0
0.00	0	0.00	0	0.00	0
21.0	233	21.6	278	22.4	297
21.0	230	21.6	275	22.4	304
21.0	236	21.6	283	22.4	304
42.0	522	43.2	587	44.8	522
42.0	526	43.2	588	44.8	512
42.0	528	43.2	590	44.8	521
63.0	745	64.8	830	67.2	735
63.0	740	64.8	830	67.2	740
63.0	750	64.8	837	67.2	745
84.0	911	86.4	982	89.6	898
84.0	912	86.4	986	89.6	893
84.0	917	86.4	994	89.6	895
105	1033	108	1202	112	1018
105	1025	108	1202	112	996
105	1042	108	1203	112	1013

Nach linearer Regression ergaben sich folgende Ergebnisse für die Kalibration des UV-Detektors (**Tabelle 33**):

Tabelle 33: Responsefaktoren und Ergebnisse der linearen Detektorkalibrierung.

Protein	Geradengleichung	R ²	Responsefaktor mAU/(ng/μl)
Ribonuclease A	y= 10.68*x	0.976	10.68
BSA	y= 11.71*x	0.982	11.71
Ovalbumin	y= 9.89*x	0.961	9.89

Die Steigung der Geradengleichung ergibt hierbei die Responsefaktoren, die für die weiteren Berechnungen von fundamentaler Wichtigkeit ist. Nach der Bestimmung der Responsefaktoren der einzelnen Proteine wurden im Anschluss die drei Proteine mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 40 und 100 ng/μl jeweils dreifach auf einer

monolithischen 50 x 1.0 mm ProSwift-Säule getrennt. Die erhaltenen Peakflächen können dann über den Responsefaktor in Konzentrationen x Zeit umgerechnet werden. Das Peakvolumen kann über die Flussrate und die Basisbreiten bestimmt werden, aus der man dann letztendlich die wiedergefundene Menge an Protein errechnen kann. **Tabelle 34** zeigt exemplarisch die erhaltenen Werte für Ribonuclease A. Die Werte für BSA und Ovalbumin wurden analog bestimmt.

Tabelle 34: Bestimmung der Menge an wiedergefundenem Protein, berechnet über die Peakvolumina und den Responsefaktor aus der UV-Detektor-Kalibrierung.

Ribonuclease A (Injektionsvolumen: V= 1 µl)					
Injizierte Menge [ng]	w _b [min]	Responsefaktor mAU/(ng/ul)	Peakfläche [mAU*min]	Peakvolumen [µl]	Wiedergefundene Menge [ng]
42.0	0.345	10.68	7.4974	20.70	42.12
42.0	0.355	10.68	7.2279	21.30	40.61
42.0	0.384	10.68	7.8042	23.04	43.84
52.5	0.347	10.68	8.1703	20,82	45.90
52.5	0.315	10.68	8.0807	18.90	45.40
52.5	0.354	10.68	8.3050	21.24	46.66
63.0	0.336	10.68	10.1673	20.16	57.12
63.0	0.365	10.68	9.3668	21.90	52.62
63.0	0.306	10.68	10.6007	18.36	59.55
73.5	0.369	10.68	12.0047	22.14	67.44
73.5	0.395	10.68	12.6426	23.70	71.03
73.5	0.306	10.68	12.1039	18.36	68.00
84.0	0.392	10.68	14.8455	23.52	83.40
84.0	0.396	10.68	15.0572	23.76	84.59
84.0	0.325	10.68	14.2993	19.50	80.33
94.5	0.306	10.68	15.4816	18.36	86.98
94.5	0.381	10.68	15.9381	22.86	89.54
94.5	0.342	10.68	15.3877	20.52	86.45

Aus dem Vergleich der injizierten und wiedergefundenen Menge lassen sich dann die Wiederfindungsraten in Prozent berechnen (**Abbildung 60**).

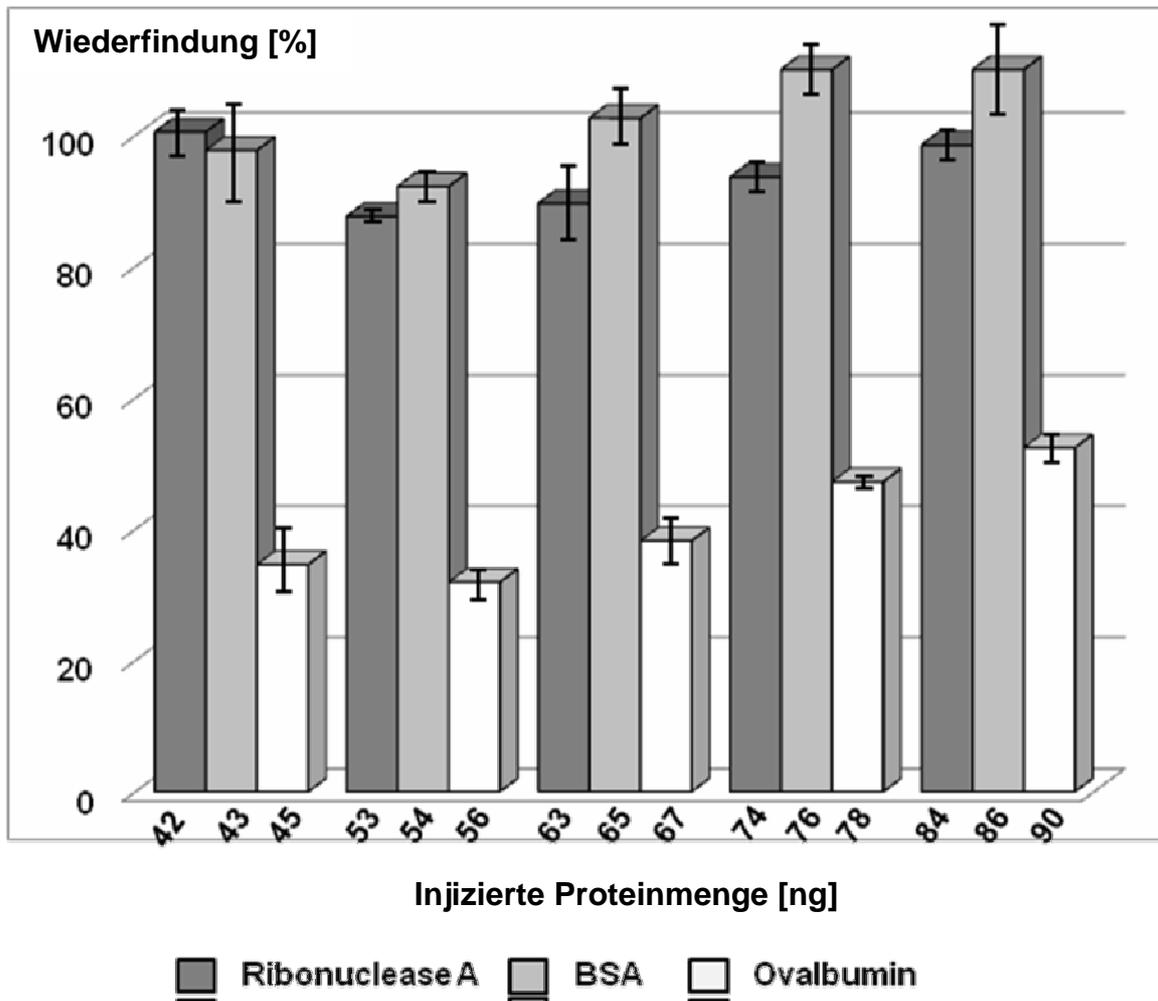


Abbildung 60: Übersicht über die Wiederfindungsraten inklusive Fehlerbalken bei verschiedenen Konzentrationen für die Proteine Ribonuclease A, BSA und Ovalbumin auf einem ProSwift 50 x 1.0 mm Monolithen.

Wie **Abbildung 60** zu entnehmen ist, steigen die Wiederfindungsraten tendenziell für alle Proteine mit zunehmender Konzentration. Die einzige Ausnahme stellte in allen Fällen der erste Messwert bei ca 44 ng Proteingehalt dar. Unter den getesteten Proteinen konnte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 94% für Ribonuclease, 104% für BSA sowie 41% für Ovalbumin ermittelt werden.

Während die Wiederfindungsraten von BSA und Ribonuclease A sehr hohe Werte von annähernd 100% lieferten, war die Wiederfindung von Ovalbumin auf den ProSwift-Monolithen mit durchschnittlich 41% signifikant schlechter. *Eschelbach et al.* verglichen die Wiederfindungsraten von Ovalbumin, BSA und Ribonuclease A unter Normaldruck- sowie Ultrahochdruck-Bedingungen auf Kapillarsäulen, die mit porösen 1.9 μm bzw. 5 μm ethylverbrückten C18-Teilchen gepackt waren. Da die ProSwift-Monolithen unter normalen HPLC-Druckverhältnissen analysiert wurden (~ 200 bar), wurden die Werte lediglich mit den Normaldruck-Werten von *Eschelbach et al.*

verglichen. Die Wiederfindungsraten von BSA und Ribonuclease A waren auf den ProSwift-Monolithen signifikant besser mit Werten von annähernd 100% verglichen mit Wiederfindungsraten von 50% oder weniger. Die Wiederfindungsraten für Ovalbumin waren sowohl beim ProSwift-Monolithen als auch bei den Kapillarsäulen von *Eschelbach et al.* annähernd gleich und betragen 40-50%.

3.4 Anwendungen

3.4.1 Schnelle Analyse von Proteinen aus Molkegetränken

In diesem Kapitel wird die Methodenentwicklung zur schnellen Analyse von Molkegetränken beschrieben unter Verwendung der ProSwift-Monolithen. Vor der Analyse der Realprobe in Form eines Molkegetränks wurde ein Proteinstandard, bestehend aus den wichtigsten Molkeproteinen α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A and β -Lactoglobulin B getrennt (**Abbildung 61**):

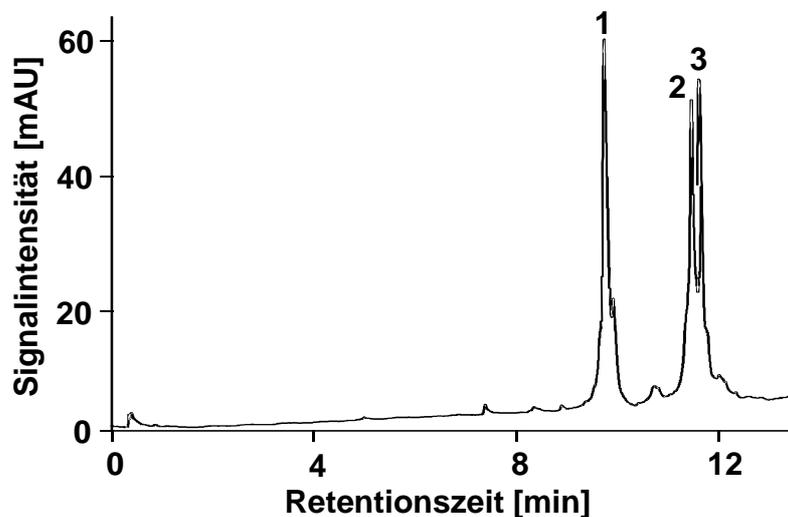


Abbildung 61: Trennung von 3 Molkeproteinen. α -Lactalbumin (1), β -Lactoglobulin B (2), β -Lactoglobulin A (3); Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 20 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 1000 nl von je weils 300 ng/ μ l Protein, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 35: Chromatographische Daten der Trennung von 3 Molkeproteinen chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 66.

Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T	R
1	α -Lactalbumin	9.74	0.113	1.32	9.90
2	β -Lactoglobulin B	11.46	0.093	n.a.	n.a.
3	β -Lactoglobulin A	11.68	0.109	n.a.	n.a.

Wie in **Abbildung 68** und **Tabelle 35** zusammengefasst, konnte eine Trennung aller Proteine realisiert werden. Während α -Lactalbumin von den restlichen Proteinen deutlich getrennt werden konnte, konnte eine Basislinientrennung beider β -Lactoglobuline nicht erreicht werden. Aber da die Peaks deutlich angetrennt sind, ist eine Identifizierung der Proteine aus Realproben bzw. auch die Quantifizierung mittels HPLC-MS-Methoden kein Problem.

Probenvorbereitung

Ein 500- μ l-Aliquot des Molkegetränks wird ohne weitere Verdünnung in einen 1.5-ml-Eppendorf-Cup gefüllt und 20 min bei 15,000 rpm zentrifugiert. Der Überstand kann im Anschluss direkt mittels HPLC-UV analysiert werden. Die Analyse des Molkegetränks erfolgte unter denselben chromatographischen Bedingungen wie die Standardmischung.

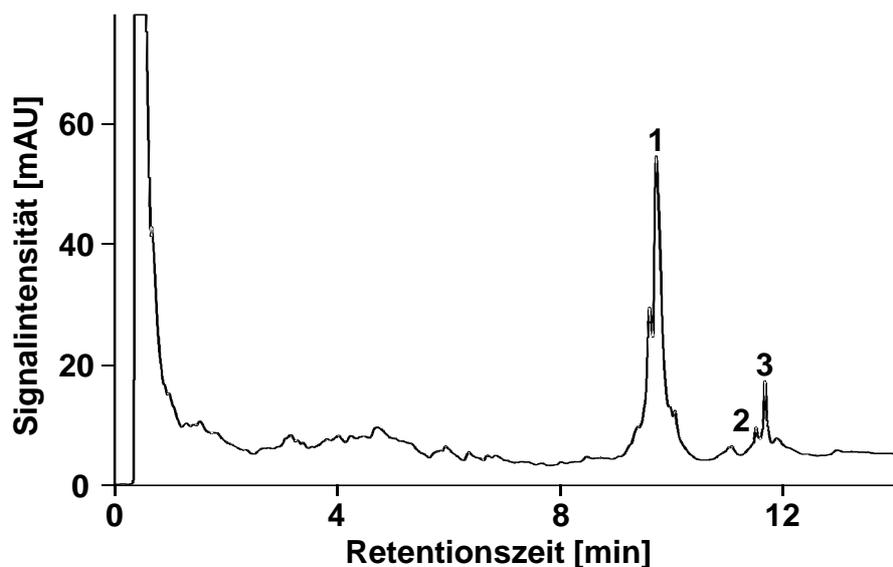


Abbildung 62: Analyse des unverdünnten Überstands des Molkegetränks. α -Lactalbumin (1), β -Lactoglobulin B (2), β -Lactoglobulin A (3); Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 20 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektions volumen 1000 nl, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 36: Vergleich der Retentionszeiten der Molkeproteine aus Standardmischung und Realprobe

Peak	Protein	t_R Standard [min]	t_R Molkegetränk [min]
1	α -Lactalbumin	9.74	9.73
2	β -Lactoglobulin B	11.46	11.52
3	β -Lactoglobulin A	11.68	11.69

Die Analyse des Molkegetränks (**Abbildung 62** und **Tabelle 36**) ergab die eindeutige Identifikation der drei Hauptmolkeproteine mittels Retentionszeitenvergleich. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeiten der Messungen mit den ProSwift-Monolithen konnten sehr gute Übereinstimmungen der Retentionszeiten ermittelt werden. So konnte zum Beispiel α -Lactalbumin mit einer Retentionszeit von 9.73 min in der Realprobe nachgewiesen werden mit einer Abweichung von 0.6 Sekunden im Vergleich zur Retentionszeit im Standardgemisch. Aus den UV-Daten der Realprobe wird deutlich, dass die Hauptkomponente in der Realprobe α -Lactalbumin ist, wohingegen die beiden β -Lactoglobuline in einer deutlich geringeren Konzentration vorkommen. Hierbei muss allerdings noch die Peakreinheit mittels MS-Analyse überprüft werden, da Molkegetränke auch BSA enthalten können, was oftmals mit α -Lactalbumin co-eluiert. Nichtsdestotrotz konnte hier eine sehr schnelle und einfache Methode entwickelt werden, um Molkeproteine identifizieren zu können. Die Methode kann aufgrund ihrer MS-Kompatibilität zur Quantifizierung der Proteine mittels HPLC-MS eingesetzt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Manuela H \ddot{u} gel (Dissertation 2008, Universität des Saarlandes), welche in ihren Arbeiten 200 μ m PS/DVB-Monolithen verwendete, so fällt bei dem hier verwendeten 50 x 1.0 mm Monolithen auf, dass die Basislinientrennung der beiden β -Lactoglobuline A und B nicht umgesetzt werden konnte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei dem verwendeten Monolithen um einen 1-mm-Monolithen aus einem frühen Entwicklungsstadium handelte, der in Plastik-Housings präpariert wurde. 1-mm-Monolithen aus späteren Entwicklungsstufen wurden in Stahl-Housings präpariert und zeigen deutlich bessere Trenneigenschaften als die entsprechenden Monolithen in Plastik-Housings und waren in der Lage, die beiden β -Lactoglobuline basisliniengetreunt darzustellen (**siehe Kapitel II, 3.1**). Vergleicht man die Arbeiten von *Premstaller et al.* [¹³³] aus dem Jahre 1999 mit den hier erhaltenen Ergebnissen, so kann die Trenneffizienz der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Säulen als vergleichbar eingestuft werden: *Premstaller et al.* verwendeten hierbei keine Monolithen, sondern C₁₈-derivatisierte PS/DVB-Partikel. Die Säulendimensionen sind

in etwa vergleichbar mit den hier beschriebenen 50 x 1.0 mm Monolithen, da *Premstaller et al.* damals 60 x 1.0 mm Säulen verwendeten. Unter Verwendung eines 10-min-Gradienten konnten die 3 Hauptproteine der Molke zwar mittels MS dargestellt werden, aber die beiden β -Lactoglobuline co-eluierten unter Verwendung von 0.50 % Ameisensäure als Additiv.

Das die Basislinientrennung der β -Lactoglobuline trotzdem realisiert werden kann, zeigten Arbeiten von *Huber et. al* [¹³⁴] unter Verwendung von 0.5 % TFA als Eluent-Additiv. Vergleiche mit ähnliche Arbeiten wie denen von *Czerwenka et. al* aus dem Jahre 2007 [¹³⁵], die sich mit der Quantifizierung von β -Lactoglobulin mittels LC-MS beschäftigten, verdeutlichen, dass die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten 1.0-mm-Monolithen ebenfalls für die Quantifizierung der Hauptmolkeproteine verwendet werden kann.

3.4.2 Analyse von Proteinen aus Hühnereiern

Um zu überprüfen, ob die ProSwift-Monolithen auch für die Trennung von Proteinen aus Hühnereiweiß geeignet sind, wurden die drei Hauptproteine (Ovalbumin, Conalbumin und Lysozym) zuerst einzeln injiziert. Nach der Einzelsubstanzinjektion der Komponenten wurde der Gradient zur Trennung optimiert, wobei es möglich war, alle Proteine in weniger als 5 min zu trennen.

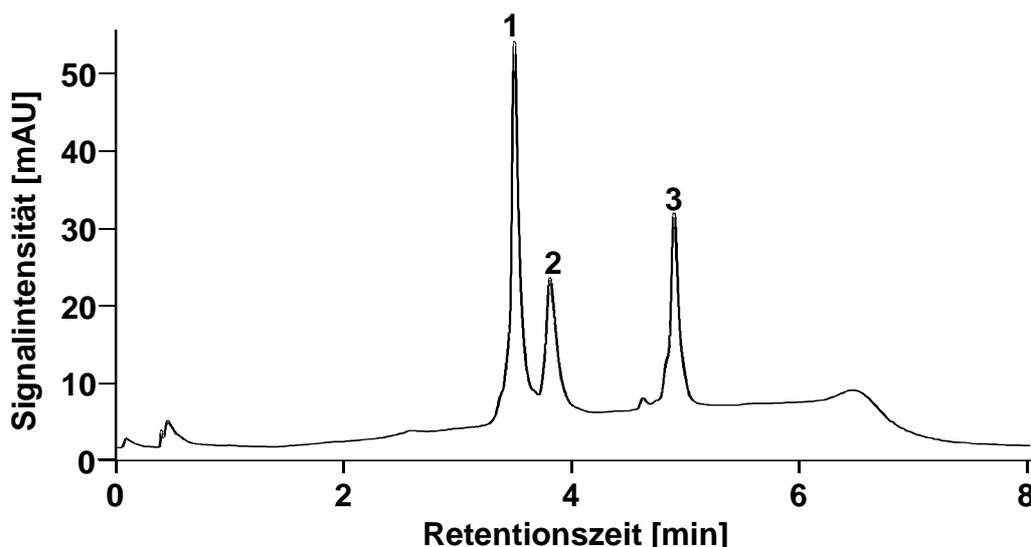


Abbildung 63: Trennung von Lysozym (1), Conalbumin (2) und Ovalbumin (3). Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 5 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 1000 nl von 92 ng/ μ l Lysozym, 79 ng/ μ l Ovalbumin und 82 ng/ μ l Conalbumin, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 37: Trennung von Lysozym (1), Conalbumin (2) und Ovalbumin (3). Chromatographische Bedingungen wie in Abbildung 69.

Peak	Protein	t_R [min]	w_h [min]	T	R
1	Lysozym	3.49	0.067	n.a.	2.15
2	Conalbumin	3.80	0.104	n.a.	7.34
3	Ovalbumin	4.89	0.071	1.11	n.a.

Die schnelle der Standardmischung der drei Hühnerei-Proteine (**Abbildung 63** und **Tabelle 37**) konnte in weniger als 5 min mit Peakhalbwertsbreiten von 0.067 min für Lysozym, 0.104 min für Conalbumin und 0.081 min für Ovalbumin, was zu einer praktikablen durchschnittlichen Peakhalbwertsbreite von 0.081 min führte.

Probenvorbereitung für die Analyse der Hauptproteine aus Hühnereiern

Zur Analyse des Hühnereiweißes wurde das Eiweiß vom Eigelb getrennt. Im Anschluss wurden 0.25 g Eiweiß mit 25 ml Wasser vermischt und 30 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad belassen. Im Anschluss kann die Mischung direkt mittels HPLC-UV analysiert werden.

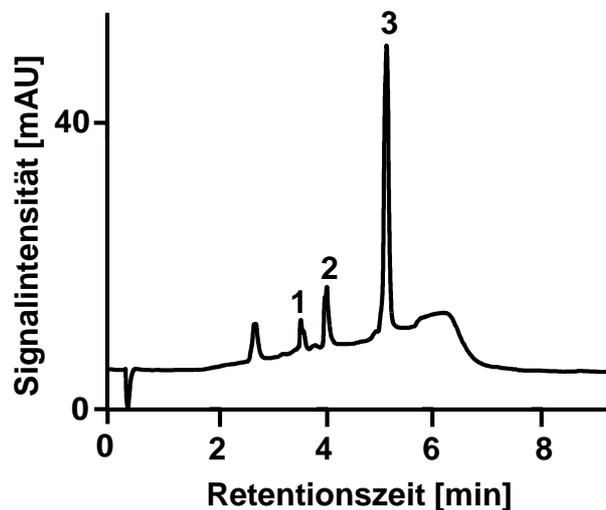


Abbildung 64: Schnelle Trennung von Lysozym (1), Conalbumin (2) und Ovalbumin (3) aus Hühnereiweiß. Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 5 min; 60 μ l/min; Temperatur, 60 $^{\circ}$ C; Injektionsvolumen 1000 nl, UV-Detektion bei 214 nm.

Tabelle 38: Vergleich der Retentionszeiten der Standardmischung und der Realprobe (Hühnereiweiß).

Peak	Protein	t_R Standard [min]	t_R Realprobe [min]
1	Lysozym	3.62	3.65
2	Conalbumin	4.07	4.14
3	Ovalbumin	5.21	5.26

Wie **Tabelle 38** und **Abbildung 64** zu entnehmen ist, konnten die drei Hauptproteine Lysozym, Conalbumin und Ovalbumin aus dem Hühnereiweiß identifiziert werden. Dabei gelang eine Basislinientrennung aller Komponenten in weniger als 6 min. Die Identifizierung der Proteine anhand eines Retentionszeitenvergleichs lieferte sehr gute Übereinstimmungen wie beispielsweise 3.62 min für Lysozym in der Standardmischung sowie 3.65 min für Lysozym in der Realprobe. Somit ist die sehr schnelle Methode bestens geeignet für HPLC-UV-Quantifizierungen der Hauptproteine Lysozym, Ovalbumin sowie Conalbumin. Andererseits ist die Methode MS-kompatibel, wodurch auch hiermit Quantifizierungen möglich wären.

3.4.3 Analyse von Antikörpern mittels HPLC-UV

Ein weiteres Anwendungsgebiet der ProSwift-Monolithen stellt die Antikörper-Analyse dar. Im Rahmen dieses Kapitels seien lediglich die Vorversuche der Trennungen diverser Antikörper mittels IP-RP-HPLC-UV genannt; im dritten Kapitel dieser Dissertation wird ausführlich über die HPLC-MS-Kopplung dieser Analysemethoden für Antikörper diskutiert.

Abbildung 65 zeigt die Injektion eines Immunglobulin G (IgG) Bet v 1 Maus-Antikörpers mit einer Masse von 160 kDa. Man erkennt deutlich mehrere Peaks in der UV-Spur. Zur weiteren Analyse bietet sich die HPLC-MS-Kopplung an, da der Informationsgehalt im UV-Spektrum normalerweise nicht ausreicht, um weitere Informationen über Reinheit und Zustand des Antikörpers zu erhalten.

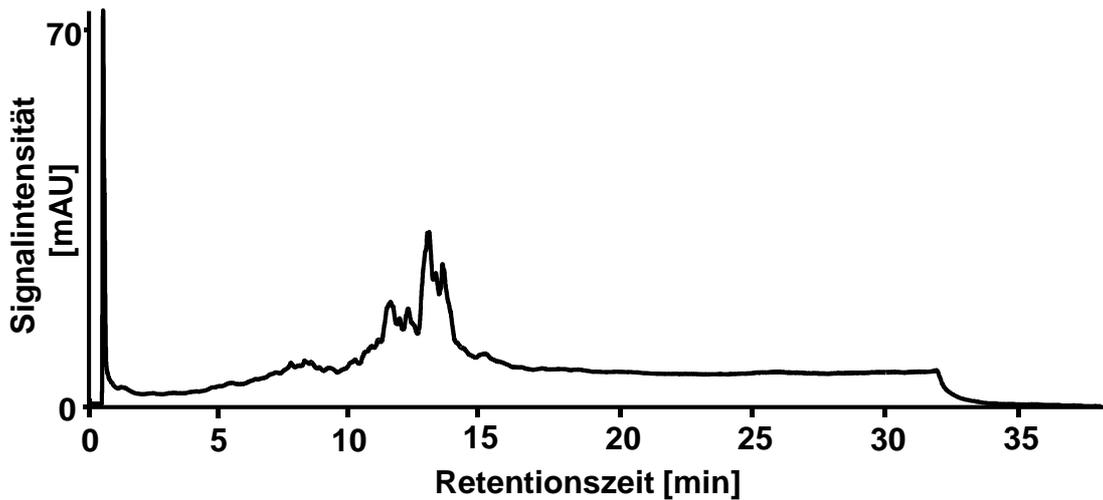


Abbildung 65: IgG Bet v1 Maus Antikörper. Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-100% B in 30 min; 60 µl/min; Temperatur, 60 °C; Injektionsvolumen 1000 nl.

In **Abbildung 66** und **67** dagegen sind zwei weitere Antikörper mittels IP-RP-HPLC-UV analysiert worden. Hierbei handelt es sich um einen schwach (mAB Bet v 1 8.3) und einen stark bindenden (mAB Bet v 1 5.1) monoklonalen Antikörper gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1. Beim stark bindenden Antikörper (**Abbildung 66**) ist lediglich ein einzelner scharfer Peak zu erkennen, was für eine hohe Antikörperreinheit spricht, wohingegen der schwach bindende Antikörper mehrere Peaks zeigt. Dies könnte ein Hinweis auf potentielle Verunreinigungen sein oder impliziert, dass der Antikörper nicht mehr intakt ist, was die schwächere Bindungsaffinität erklären würde. Diese Vermutungen wurden in **Kapitel III** dieser Dissertation durch weiterführende MS-Experimente bestätigt.

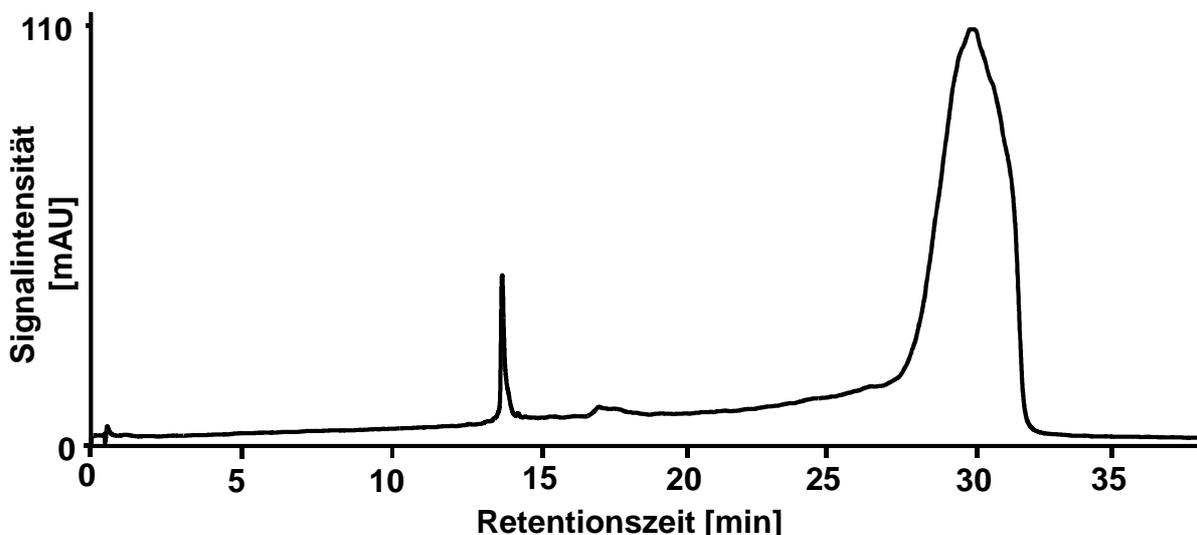


Abbildung 66: Bet v 1 5.1 monoklonaler Antikörper. Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 30 min; 60 µl/min; Temperatur, 60 °C; Injektionsvolumen 1000 nl.

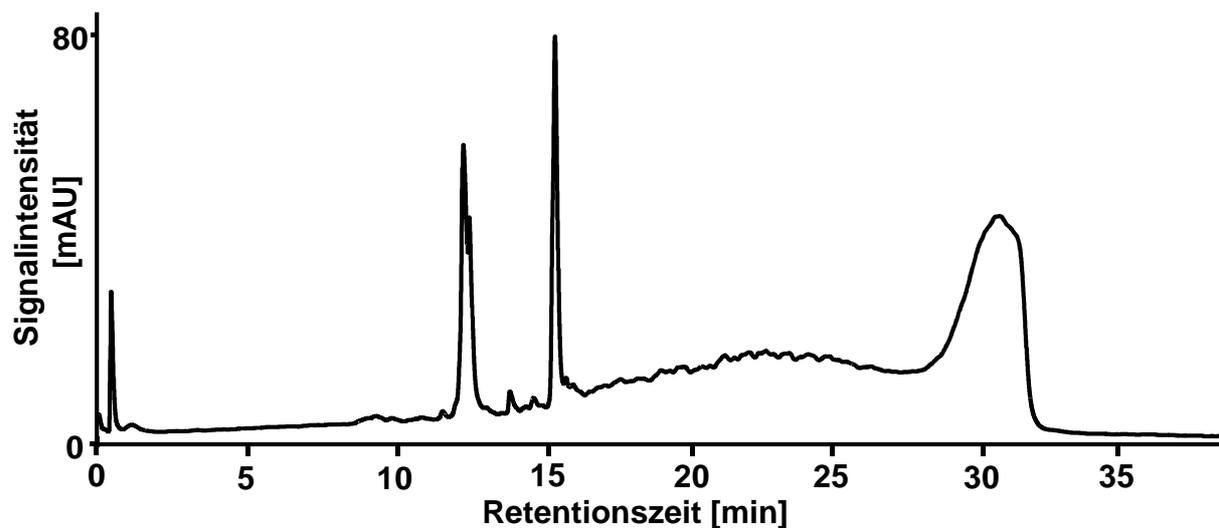


Abbildung 67: Bet v 1 8.3.monoklonaler Antikörper. Säule: 50 x 1.0 mm I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA; Eluent B: Wasser/Acetonitril=1:4 + 0.04% TFA; Gradient: 15-80% B in 30 min; 60 µl/min; Temperatur, 60 °C; Injektionsvolumen 1000 nl.

4. Zusammenfassung

Dieses Kapitel beschäftigt sich allgemein mit einer ausführlichen Evaluierung der ProSwift RP-Monolithen auf PS/DVB-Basis, die von der Firma Dionex Benelux (Amsterdam, Die Niederlande) zur Verfügung gestellt wurden. Reproduzierbarkeitsstudien ergaben hierbei relative Standardabweichungen von weniger als einem Prozent für die Retentionszeiten, zwischen 2 und 5% für die Peakhalbwertsbreiten sowie zwischen 3-8% relative Standardabweichung für die Asymmetriefaktoren, wodurch sich die ProSwift-Monolithen durch eine hohe Reproduzierbarkeit von Proteintrennungen auszeichnen. Darüberhinaus konnten Wiederfindungsraten von annähernd 100% für BSA und Ribonuclease A sowie 41% für Ovalbumin auf den Pro-Swift-Monolithen bestimmt werden. Untersuchungen von möglichen Carryover-Effekten der Proteine Ribonuclease A, BSA, Myoglobin und Ovalbumin zeigten, dass bereits nach dem ersten Blindgradienten nach der Proteintrennung keine Proteinsignale mit Hilfe des nachweisstarken Orbitrap-Massenanalysators detektierbar waren. Darüber hinaus war es möglich, eine 10er-Proteinmischung mit Peakhalbwertsbreiten von unter 0.1 min in 10, 15 und 20 min zu trennen. In weiteren Experimenten konnte eine Reihe von Anwendungsgebieten der Monolithen gefunden werden. Die Pro-Swift-Monolithen ermöglichten die schnelle Analyse von Molkegetränken in weniger als 20 min sowie die schnelle Analyse von Hühnereiern im Hinblick auf die Hauptproteine Ovalbumin, Conalbumin und Lysozym, die in weniger als 6 min basisliniengetrennt und analysiert werden konnten. Aufgrund der MS-Kompatibilität aller entwickelten Methoden ist eine direkte, splitlose Kopplung mit Massenspektrometern realisierbar. Aufgrund der Säulendimensionen konnten die ProSwift-Monolithen auch zur micropräparativen Fraktionierung eines Proteinextrakts des Spulwurms und Parasiten *Ascaris lumbricoides* verwendet werden. Als letztes Anwendungsgebiet konnte die Analyse von monoklonalen Antikörpern diskutiert und etabliert werden. Beim Vergleich eines schwach und eines stark bindenden Antikörpers gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 konnte gezeigt werden, dass der schwach bindende Antikörper nicht mehr intakt oder verunreinigt war, da im UV-Spektrum mehrere Peaks zu sehen waren, welche die schlechte Bindungsaffinität erklären könnten. Diese Vermutung wurde im dritten Kapitel dieser Dissertation durch MS-Experimente bestätigt.

Kapitel III

Analyse von intakten Proteinen mit
Schwerpunkt auf micro-HPLC-FT-
MS

1. Einleitung

Auch wenn die effizientesten Trenntechniken inklusive Quantifizierungen und Identifizierungen im Bereich der Proteomanalyse auf Peptidebene liegen, sind diese so genannten „Bottom up“-Methoden mit einigen Nachteilen verbunden: Durch den Verdau der Proteine wird nicht nur die Probenkomplexität erhöht, sondern durch Verdau verliert man wichtige Informationen über die intakten Proteine wie beispielsweise posttranslationale Modifizierungen, Variationen in den Sequenzen oder auch alternatives Spleißen. Aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Inhomogenität ist die Analyse intakter Proteine ein anspruchsvolles Gebiet der Bioanalytik. Insbesondere im Bereich der „Top-Down Proteomics“ [136;137], welche die Analyse des Proteoms auf intakter Proteinebene umfasst, sind effiziente Proteintrennungen von essentieller Wichtigkeit.

Das letzte Kapitel dieser Dissertation beschäftigt sich mit der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen auf intakter Ebene unter Verwendung verschiedener Massenspektrometer-Typen: Während sich lineare Ionenfallen- und Flugzeitmassenspektrometer schon seit langem in der Analyse intakter Proteine bewähren [138-141], wird in diesem Kapitel getestet, ob auch Massenspektrometer der neuen Generation, in diesem Falle der LTQ Orbitrap XL Massenanalysator, für die Darstellung und Analyse von intakten Proteinen geeignet ist.

Seit der Einführung im Jahre 2005 [142] wurde der Orbitrap-Massenanalysator in vielen Anwendungsbereichen eingesetzt, z.B. der Analyse von Peptiden [143]. Auch wenn ursprünglich die Anwendbarkeit der Orbitrap für die Analyse intakter Proteine angezweifelt wurde, zeigten neuere Studien, dass die Orbitrap trotzdem für Proteine bis 150 kDa eingesetzt werden kann [144]. Bis auf wenige Ausnahmen erfolgte hierbei die Analyse ausschließlich mittels Direktinfusion. *Bondarenko et al.* [145] untersuchten monoklonale Antikörper mittels HPLC-MS, was aber nur durch die Injektion von großen Probenmengen im µg-Bereich realisiert werden konnte. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Kopplung von micro-HPLC und dem Orbitrap-Massenanalysator genauer untersucht im Hinblick auf Nachweisgrenzen, Trenneffizienzen und anderen wichtigen Parametern, die von essentieller Bedeutung für die Proteinanalytik sind.

2. Experimenteller Teil

2.1 Chemikalien und Materialien

Das in den Experimenten verwendete Wasser wurde mit einem Purelab Ultra System von Elga (Siershahn, Schweiz) aufbereitet. Die Polyimid-beschichteten amorphen Quarz-Kapillaren stammten von PolyMicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA).

Acetonitril (Optigrade, for LC-MS) wurde von LGC Promochem (Wesel, Germany) erworben. Die Proteine Ribonuclease A (Rind), Ubiquitin (Rind), Bovines Serum Albumin (BSA), menschliches Serumalbumin (HSA), Cytochrom C (Pferdeherz), Conalbumin (Hühnerei), Insulin (human, E. coli expressed), Lysozym (Hühnereiweiß), α -Lactalbumin (Rindermilch), Myoglobin (Pferd), Transferrin (Mensch), Ovalbumin (Hühnerei), β -Lactoglobulin A (Rindermilch) und β -Lactoglobulin B (Rindermilch) stammten von Sigma (St. Louis, MO, USA). Hämoglobin (Rind) wurde bei Serva (Heidelberg, Germany) bestellt.

Der Proteinextrakt aus dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides* sowie die mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Glutathion-S-Transferase-Proben wurden von Dr. med. Nathalie Acevedo im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Universität Cartagena, Kolumbien (Institut für Immunologische Forschung) zur Verfügung gestellt.

Bei den analysierten Antikörpern (monoklonale Antikörper Bet v 1 5.1 (stark bindend) und Bet v 1 8.3 (schwach bindend)) handelte es sich um Antikörper gegen das Birkenpollenhauptallergen *Betula verrucosa* (Bet v 1). Die Aufreinigung der Antikörper sowie die Affinitätsmessungen wurden dabei im eigenen Arbeitskreis durchgeführt [129].

Der vorliegende *Ascaris lumbricoides*-Proteinextrakt wurde von Dr. med. Nathalie Acevedo unter Verwendung des folgenden Protokolls (Aceton–Saccharose-Fällung) hergestellt:

Die adulten Spulwürmer wurden in steriler Kochsalzlösung mit Penicillin und Streptomycin gewaschen und in 4 ml Saccharose pro Gramm Parasit homogenisiert. Die Extraktion wurde durch Schütteln des Homogenisats in kaltem Aceton durchgeführt. Im Anschluss wurde das Homogenisat 20 min bei -80 °C gelagert. Der Bodensatz wurde in kaltem Aceton resuspendiert, geschüttelt und 1 h bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde der Bodensatz erneut in kaltem Aceton suspendiert und bei 9,500 g 15 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Nach Lyophilisieren und Lösen

des Bodensatzes in PBS (pH 7.2) wurde das Homogenisat 16 h lang in kaltem Aceton gerührt und daraufhin eine Stunde bei 9,500 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Membran (Cut-off 3,500) 24 h gegen PBS (pH 7.2) dialysiert. Die Proteinkonzentration des Extrakts wurde hierbei mittels Lowry-Methode bestimmt. Der lyophilisierte Proteinextrakt wurde anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. (->experimenteller Teil)

2.2 HPLC-Systeme

Zur Durchführung der Experimente wurde ein Niederdruckgradienten-HPLC-Komplettsystem („Accela“, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) mit einem Drucklimit von 1000 bar verwendet. Für die nano-HPLC-Methodenentwicklung und zur Kopplung an das ToF-Massenspektrometer wurde ein UltiMate 3000 nano-HPLC-System verwendet bestehend aus Probengeber, Säulenofen mit 10-Wege-Schaltventilen, Pumpensystem und Entgaser (Dionex Benelux, Amsterdam, NL).

Für die nano-HPLC-Trennungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, monolithische Kapillarsäulen mit 200 µm oder 100 µm Innendurchmesser auf Poly(styrol-divinylbenzol)-Basis sowohl als Trenn- als auch als Trapsäule verwendet, die in Eigenproduktion hergestellt wurden. Zusätzlich wurden 50 x 1.0 mm ProSwift RP Monolithen (Dionex Benelux, Amsterdam, NL) eingesetzt.

2.3 Massenspektrometer und dazugehörige Accessoires

Die FT-MS-Analysen wurden mit einem LTQ-Orbitrap-XL-Massenanalysator (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Die Flugzeit-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem micrOTOF Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) und externer Spritzenpumpe Cole Parmer Serie 74900 (Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA) durchgeführt. Die Ionenfallen-massenspektrometrische Detektion wurde mit dem LTQ-XL-Ionenfallen-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Zur Kopplung der 50 x 1.0 mm ProSwift RP Monolithen wurde die „Ion Max“ ESI-Quelle mit einer 34-gauge-Metallnadel (beide ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Zur Kopplung der monolithischen 100- oder 200-µm-Kapillarsäulen wurde durch die Metallnadel eine amorphe Quarzkapillare (90 µm O.D., 20 µm I.D.) gezogen, um das säulenexterne Totvolumen zu minimieren. Die

Orbitrap und Lineare Ionenfalle wurden dabei unter Verwendung folgender Parameter betrieben: Sheath Gas: 5 units, Auxillary Gas: 5 units, Spray Voltage: 3 kV, Capillary Voltage: 48 V, Capillary Temperature: 280 °C, Orbitrap ACG: 10^6 . Bei Verwendung der 90/20-Kapillare blieben die Parameter gleich bis auf folgende Werte: Sheath Gas: 10 units, Capillary Voltage: 7 V, Tube Lens: 210 V.

Zum Tuning wurden – falls nicht anders vermerkt – die Proteine Lysozym und Cytochrom C (Konzentration: jeweils 100 fmol/ μ l, gelöst in Wasser/ACN = 4:1 (v:v)) verwendet. Die beim Tuning verwendeten Flüsse waren abhängig von der vorher optimierten HPLC-Methode und den verwendeten Säulen (1.0 bis 1.5 μ l/min bei den verwendeten 100- bzw. 200- μ l-Monolithen; 50 bis 60 μ l/min bei Verwendung der 1-mm-Monolithen.

Für Proteine, bei denen eine Isotopenauflösung der Ladungszustände erreicht werden konnte, wurde das Programm Xtract (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) verwendet. Bei nicht-isotopenaufgelösten Proteinspektren wurde das Programm ProMass Deconvolution 2.5 (Novatia, Monmouth Junction, NJ, USA) eingesetzt.

Zur Datenaufnahme und –auswertung wurde das Programm Xcalibur 2.0.7 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung eines micro-HPLC-FT-MS Analysensystems durch die Analyse diverser Proteinmischungen

3.1.1 micro-HPLC-FT-MS einer 3er-Proteinmischung

Als erstes Experiment wurde eine einfache Proteinmischung, bestehend aus Ribonuclease A, Myoglobin und β -Lactoglobulin unter den folgenden chromatographischen und massenspektrometrischen Parametern getrennt:

Hierbei wurde das gängige Trapsäulen-Setup (**Abbildung 68**) verwendet, um die Probe zu entsalzen und die Proteine auf der Trapsäule anzureichern [¹²⁸]. Nach Umschalten des 10-Wege-Ventils wird die getrappte Probe mittels Gradientenelution auf die Trennsäule transferiert und aufgetrennt. Aufgrund der Größe der Trapsäule von nur 1 cm muss hierbei ein spezielles Housing mit einem halben Microtight-Union angefertigt werden. Dieses Setup wurde bereits für die Trennung der Standardproteine benutzt, da mit demselben Setup die spätere Analyse von Realproben realisiert wurde.

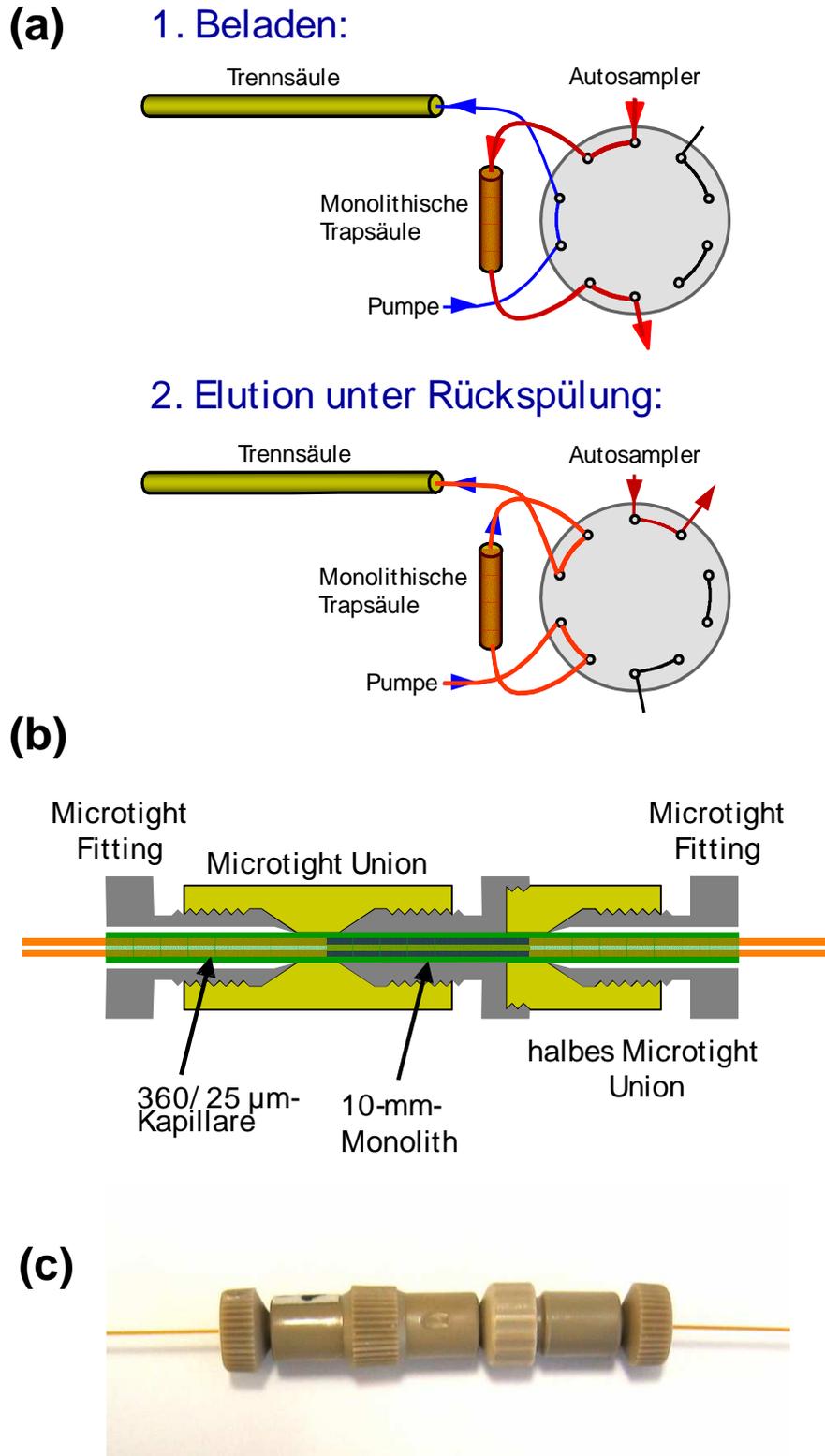


Abbildung 68: (a) schematisches Trapsäulen-Setup unter Verwendung eines 10-Wege-Ventils. (b) schematische Darstellung der Trapsäule (10-mm-Monolith) und (c) Bild des Trapsäulenhousings.

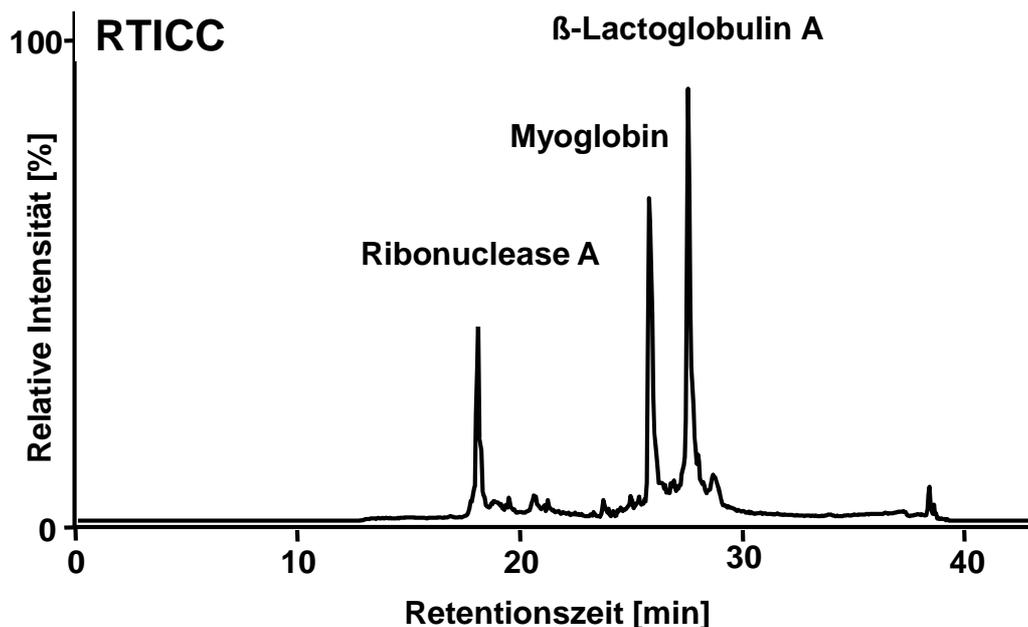


Abbildung 69: Trennung von Ribonuclease A, Myoglobin, β -Lactoglobulin mittels micro-HPLC-FT-MS-Setup (RTICC). 0-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $1.5 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $200 \times 0.1 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Trapsäule, $10 \times 0.2 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil *, 3 min Trapping ($10 \mu\text{l/min}$, 0.1% aq. HFBA); MS-Detektion, Massenbereich 550-3,000 m/z; ESI (positiver Modus).

Wie **Abbildung 69** zu entnehmen ist, konnte die Basislinientrennung der drei Proteine in weniger als 30 min erzielt werden. Die Peakbreiten schwankten hierbei zwischen 0.17 min für Ribonuclease A, 0.26 min für Myoglobin sowie 0.18 min für β -Lactoglobulin A. Da die Messung bei einer Auflösung von 100,000 aufgenommen wurde, muss dabei die Datenaufnahmerate beachtet werden, die automatisch zu einer gewissen Peakverbreiterung führt. Dementsprechend liegt eine sehr gute Trenneffizienz des getesteten micro-HPLC-FT-MS-Setups vor, wodurch das System für die Analyse von Realproben bestens geeignet ist. Als nächster wichtiger Punkt wurde die Massengenauigkeit des Orbitrap-Massenspektrometers untersucht. Insbesondere bei der Analyse von intakten Proteinen ist eine sehr hohe Massengenauigkeit des MS von essentieller Wichtigkeit.

Tabelle 39: Massenabweichungen der mittleren Massen der drei analysierten Proteine.

Protein	Theoretische mittlere Masse [Da]	Gemessene mittlere Masse [Da]	Δ [ppm]
Ribonuclease A	13,682.33	13,682.31	-1.46
Myoglobin	16,951.48	16,951.06	-24.8
β -Lactoglobulin A	18,362.38	18,362.51	+7.08

Die ermittelten Massenabweichungen (**Tabelle 39**) liegen je nach Protein im Bereich von 1.5 bis 25 ppm. Die beste Massengenauigkeit lieferte Ribonuclease A, dessen dekonvolutierte Masse weniger als 1.5 ppm von der aus der Sequenz bestimmten Masse abweicht, was für eine extrem hohe Massengenauigkeit des MS spricht. Auch die Massengenauigkeit von β -Lactoglobulin A ist mit 7 ppm als sehr gutes Ergebnis zu interpretieren. Lediglich die Massenabweichung von Myoglobin mit 25 ppm war größer, doch auch dieser Wert ist im Vergleich zu anderen Massenspektromer-typen als äußerst niedrig anzusehen.

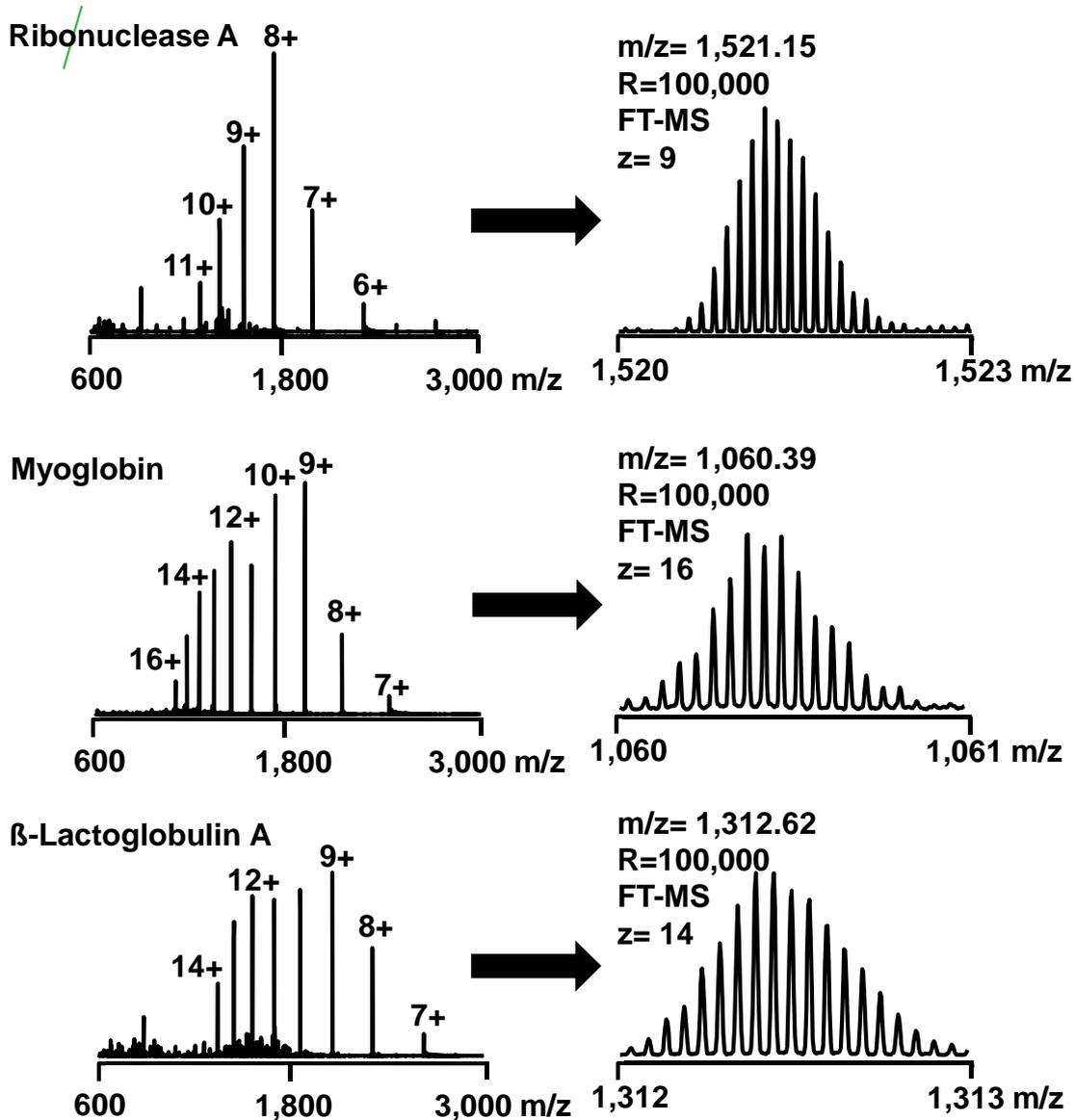


Abbildung 70: Spektren der analysierten Proteine Ribonuclease A, Myoglobin und β -Lactoglobulin inklusive eingezoomter Ladungszustände mit Isotopenaufösung.

Alle detektierten Ladungszustände der Proteine konnten isotopenaufgelöst werden, was an einigen Beispielen (**Abbildung 70**) demonstriert wird. So war es ohne Probleme möglich, selbst hohe Ladungszustände von Ribonuclease A (9-fach positiv geladen), Myoglobin (16-fach geladen) und β -Lactoglobulin A (14-fach positiv geladen) isotopenaufgelöst darzustellen.

3.1.2 micro-HPLC-FT-MS einer 4er-Proteinmischung

Während in **Kapitel 3.2.1** eine Mischung mit Proteinen in einem relativ engen Massenbereich von 14 bis 18 kDa untersucht wurde, beinhaltete die nächste Proteinmischung die Proteine Ubiquitin (8.6 kDa), Cytochrom C (13 kDa), Myoglobin (17 kDa) sowie Carboanhydrase (30 kDa), welche einen breiteren Massenbereich abdecken. Wie **Abbildung 71** zu entnehmen ist, konnten alle Proteine mit adäquater Effizienz getrennt werden. Das hier gezeigte Beispiel verdeutlicht, dass eine chromatographische Trennung eine oftmals bessere Spektrenqualität liefert als eine Direktinfusion. Da bei der chromatographischen Auftrennung von Proteinen die Verwendung von Gradienten unerlässlich ist, ändert sich während dem chromatographischen Lauf die Laufmittelzusammensetzung permanent, was einen Einfluss auf Ionisierbarkeit und Spraystabilität bei der MS-Detektion hat. Nichtsdestotrotz stören bei der Direktinfusion Verunreinigungen, Störsubstanzen etc., welche die Ionisierung des eigentlichen Proteins supprimieren können. Dies konnte hierbei bei dem Protein Carboanhydrase (**Abbildung 72 und 73**) gezeigt werden.

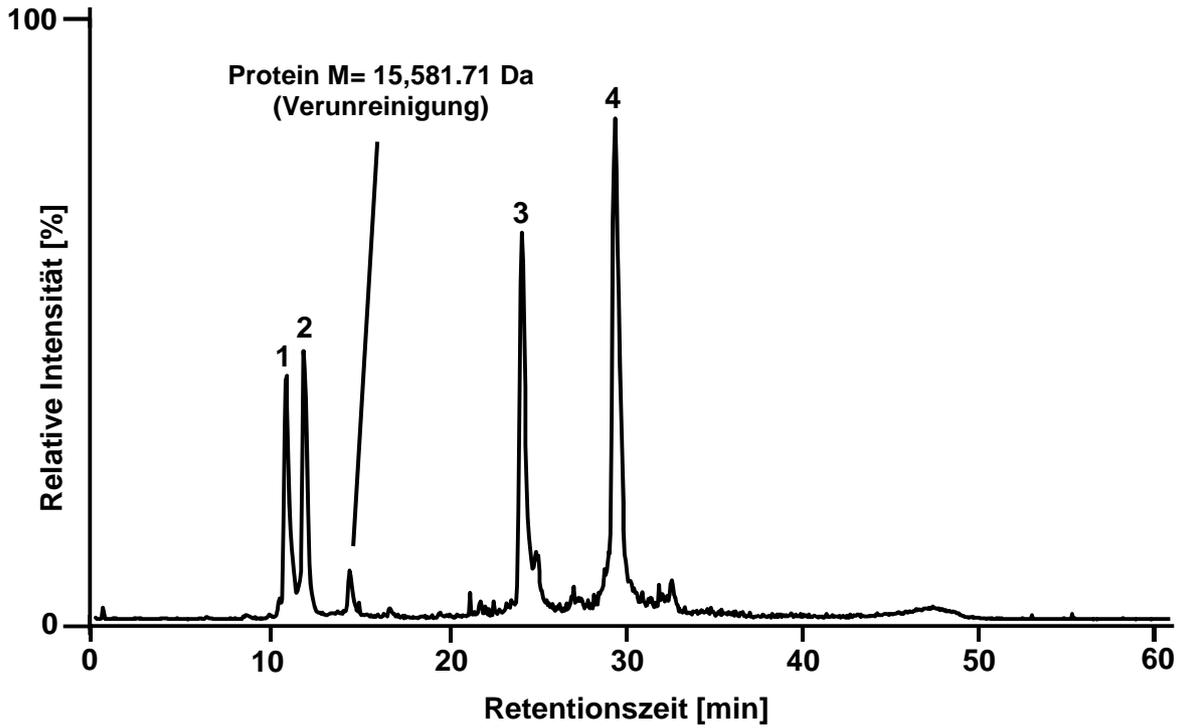
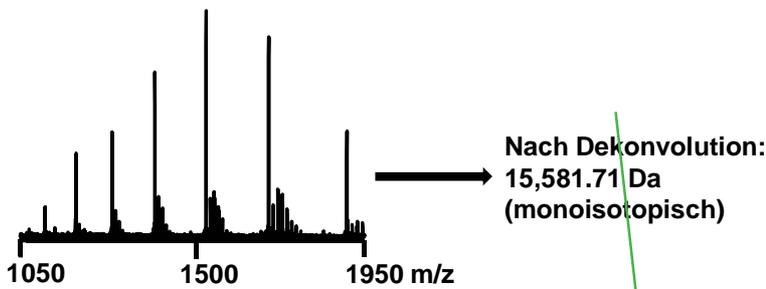


Abbildung 71: Trennung von Ubiquitin (1), Cytochrom C (2), Myoglobin (3) und Carboanhydrase (4) β -Lactoglobulin mittels micro-HPLC-FT-MS-Setup (RTICC). 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 40 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, $60 \text{ }^\circ\text{C}$; Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich $600\text{-}2,000 \text{ m/z}$; ESI (positiver Modus). Injizierte Mengen

Verunreinigung aus der chromatographischen Trennung



Direktinfusion Carboanhydrase (550 fmol/ μl , 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, ESI Positive Mode)

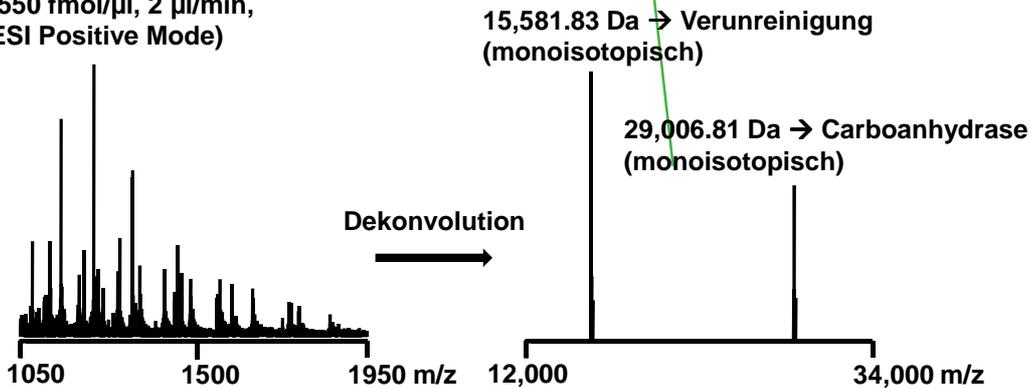


Abbildung 72: Vergleich der Analyse von Carboanhydrase mittels micro-HPLC-FT-MS und Direktinfusion.

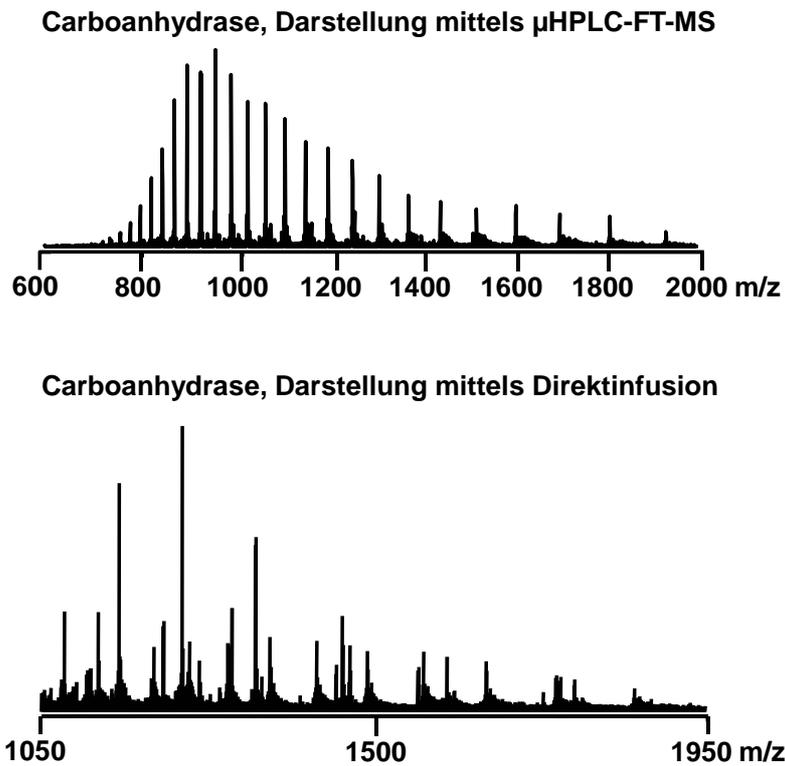


Abbildung 73: Vergleich der Spektrenqualität von Carboanhydrase mittels Direktinfusion und micro-HPLC-FT-MS. Infundierte Menge.

Bei der Direktinfusion wurde deutlich, dass neben der Carboanhydrase noch ein weiteres Protein mit ca. 15,6 kDa als Verunreinigung zu sehen war, das die Spektrenqualität der Carboanhydrase deutlich verschlechterte. Die Spektrenqualität konnte durch die chromatographische Trennung deutlich verbessert werden, da es hierbei gelang, die Verunreinigung von den restlichen Proteinen zu trennen. Auch für die Proteine Ubiquitin, Cytochrom C und Myoglobin konnten qualitativ hochwertige Spektren generiert werden (**Abbildung 74**). Dabei gelang die Darstellung isotopenaufgelöster Spektren für alle Proteine und alle detektierten m/z-Verhältnisse (**Abbildung 75**).

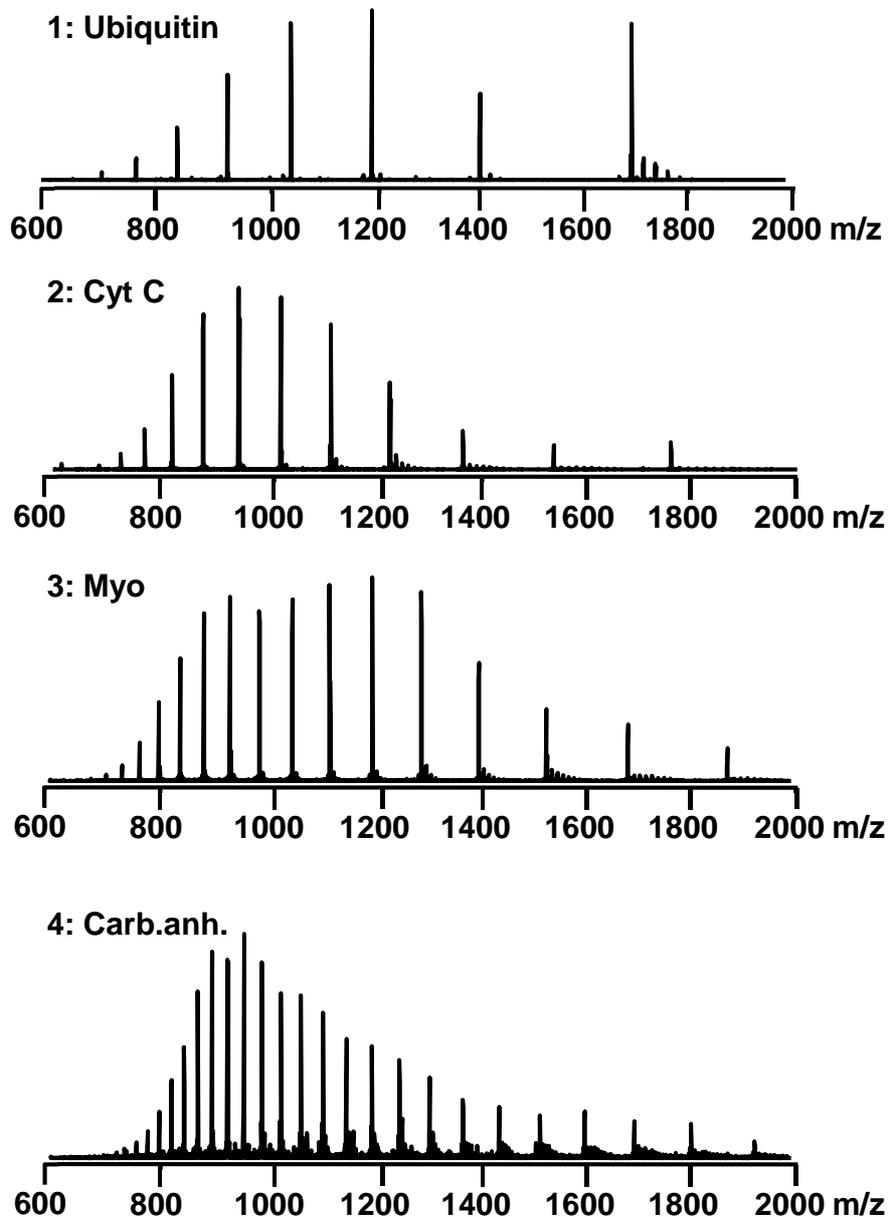


Abbildung 74: FT-MS-Spektren der Trennung der Proteine Ubiquitin, Cytochrom C, Myoglobin und Carboanhydrase. 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 40 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 600-2000 m/z; ESI (positiver Modus).

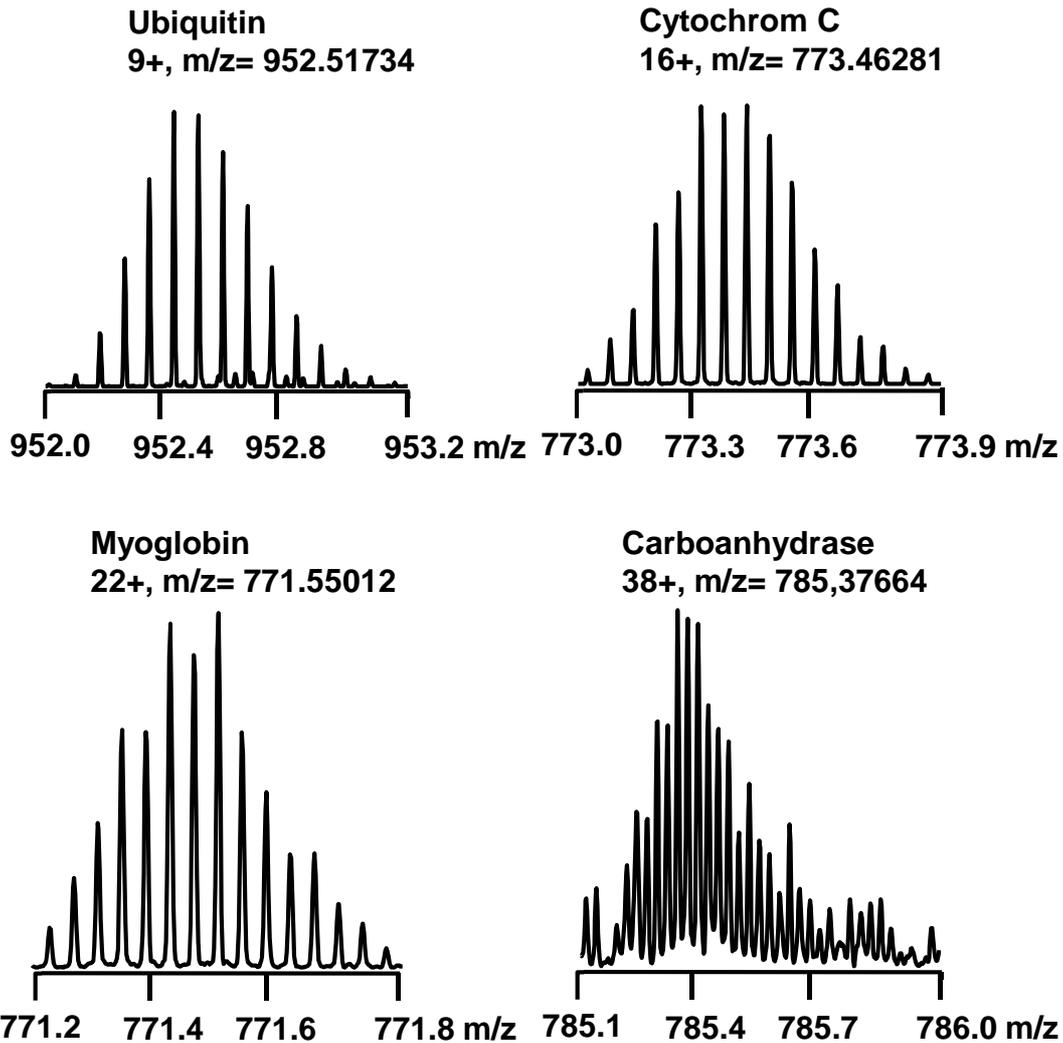


Abbildung 75: Isotopenauflösung verschiedener m/z-Verhältnisse von Ubiquitin (9+), Cytochrom C (16+), Myoglobin (22+) und Carboanhydrase (38+) mittels micro-HPLC-FT-MS, R= 100,000.

Durch das hohe Auflösungsvermögen des Orbitrap-Massenanalysators war es möglich, alle detektierten Ladungszustände der 30 kDa schweren Carboanhydrase isotopenaufgelöst darzustellen, was am Beispiel der 38-fach geladenen positiv geladenen Carboanhydrase demonstriert wurde (**Abbildung 75**). Dies verdeutlicht das hohe Auflösungsvermögen der Orbitrap, mit der es möglich ist, selbst sehr hoch geladene m/z-Verhältnisse von größeren Proteinen isotopenaufgelöst darstellen zu können. Demnach stellten auch die Isotopenauflösungen von mehrfach geladenen Myoglobin- (22+), Ubiquitin- (9+) sowie Cytochrom C-Ionen (16+) kein Problem dar.

Ein weiterer wichtiger Punkt neben der Trenneffizienz des HPLC-Systems und dem Auflösungsvermögen stellt die Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers dar. **Tabelle 40** gibt eine Übersicht über die ermittelten monoisotopischen und mittleren Massen der Proteine:

Tabelle 40: Vergleich der Massenabweichungen von Ubiquitin, Cytochrom C, Myoglobin und Carboanhydrase (monoisotopische Massen und mittlere Massen).

Protein	Theoretische monoisotopische Masse [Da]	Gemessene monoisotopische Masse [Da]	Δ [ppm]
Ubiquitin	8,559.62	8,559.58	-4.67
Cytochrom C	12,351.32 [^{146;147}]	12,351.27	-3.70
Myoglobin	16,940.96	16,940.93	-1.77
Carboanhydrase	29,006.68	29,006.66	-0.69
Protein	Theoretische mittlere Masse [Da]	Gemessene mittlere Masse [Da]	Δ [ppm]
Ubiquitin	8,564.84	8,564.59	-29.1
Cytochrom C	12,359.97	12,359.29	-55.1
Myoglobin	16,951.48	16,950.95	-31.2
Carboanhydrase	29,024.63	29,023.68	-32.7

Die Massenabweichungen der monoisotopischen Massen waren durchgehend besser als die der entsprechenden mittleren Massen. So wurden Massenabweichungen unter 5 ppm erzielt: Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass sowohl für kleine Proteine wie Ubiquitin (8.6 kDa) als auch für die deutlich größere Carboanhydrase (29 kDa) sehr gute Massengenauigkeiten erhalten wurden: Während die monoisotopische Masse von Ubiquitin um -4.7 ppm von der aus der Sequenz berechneten theoretischen Masse abwich, konnte für Carboanhydrase eine monoisotopische Masse experimentell bestimmt werden, die um -0.7 ppm von der theoretischen Masse abwich. Auch die Massenabweichung von Myoglobin (-1.77 ppm) kann als äußerst gering bezeichnet werden. Somit erlaubt das micro-HPLC-FT-MS-Setup die hochauflösende Massenanalyse von Proteinen in einem großen Massenbereich mit Massenabweichungen im sub-10-ppm- bzw. sogar sub-ppm-Maßstab. Ein Vergleich der erhaltenen Werte mit *Everley et al.* [¹⁴⁸] zeigt, dass die verwendeten Monolithen eine vergleichbar gute Trenneffizienz lieferten wie die dort verwendeten C₁₈-1.7- μ m-Partikeln. *Everley et al.* zeigten hierbei, dass es möglich ist, durch Verwendung eines UPLC-Setups bei einem Druck von ca. 800 bar, eine ähnliche Proteinmischung (welche u.a. Myoglobin, Insulin, Cytochrom C enthält) effizient in einem Zeitraum vom 13 min zu trennen unter Verwendung eines Q-ToF-

Massenspektrometers. Auffällig hierbei ist, dass die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Monolithen gute Trenneffizienzen lieferten, die mit den UPLC-Ergebnissen von *Everley et al.* vergleichbar sind. Darüber hinaus testeten *Everley et al.* zusätzlich noch eine klassische HPLC-Säule mit 3.5 μm Teilchen. Hier wurde die Trennung des verwendeten Proteinstandards in 55 min realisiert. Dies verdeutlicht die Vorteile von monolithischen Trennsäulen, die aufgrund der hohen Säulenpermeabilität bei vergleichbar guter bzw. besserer Trenneffizienz Analysen in deutlich kürzerer Zeit erlauben.

3.1.3 Analyse einer 10er-Proteinmischung mittels micro-HPLC-FT-MS

Um die Komplexität der Protein-Standardmischungen weiter zu erhöhen, wurde in diesem Kapitel die Trennung eines 10er-Proteinstandards (**Abbildung 76**) untersucht (chromatographische Parameter siehe **Abbildung 76**).

Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurden fünf aufeinanderfolgende Läufe chromatographisch ausgewertet (**Tabelle 41**). Hierbei ergaben sich für die Retentionszeiten relative Standardabweichungen zwischen 0.25% (Cytochrom C) und 0.03% (α -Lactalbumin), was praktikable Werte darstellt. Die Retentionszeiten für β -Lactoglobulin ergaben hierbei sogar eine absolute Standardabweichung von lediglich einer hundertstel Sekunde. Die Peakhalbwertsbreiten der Peaks lagen im Bereich von 6-9 Sekunden, was adäquate Werte darstellt, vor allem, wenn man hierbei noch die Peakverbreiterung infolge der niedrigen Datenaufnahmerate des Massenspektrometers bei einer Auflösung von 100,000 berücksichtigt. Auch die Selektivität des verwendeten micro-HPLC-MS-Setups ist hoch, da die Basislinientrennung der beiden Hämoglobinketten sowie der Isoformen β -Lactoglobulin A und B realisiert werden konnte. Diese Ergebnisse sind hierbei vergleichbar mit denen von *Huber et al.* [¹³⁴], die durch die Verwendung von C_{18} -derivatisierten PS/DVB-Partikeln (2.3 μm , Säulendimensionen 53 x 4 mm) ähnliche Proteine getrennt haben: Hierbei gelang es zwar mittels HPLC-MS, die beiden β -Lactoglobuline A und B anzutrennen, doch die Selektivität der hier verwendeten Monolithen kann als etwas höher eingestuft werden, da eine Basislinientrennung erreicht werden konnte.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen von *Everley et al.* [¹⁴⁸], die u.a. eine klassische HPLC-Säule mit 3.5 μm Teilchen verwendeten zur Trennung eines ähnlichen 10er-Proteinstandards, verdeutlicht die Vorteile von monolithischen Trennsäulen, die aufgrund der hohen Säulenpermeabilität bei vergleichbar guter bzw. besserer

Trenneffizienz Analysen in deutlich kürzerer Zeit erlauben: Der von *Everley et al.* verwendete Standard (enthält Ribonuclease A, Cytochrom C, Insulin, Lysozym, BSA, Lactalbumin, Myoglobin, Trypsin Inhibitor, Chymotrypsinogen und Ovalbumin) konnte in 55 min getrennt werden. Der 10er Proteinstandard im Rahmen dieser Dissertation konnte in weniger als 30 min basisliniengetrennt werden, wohin gegen bei *Everley et al.* beispielsweise die Basislinientrennung von Lactalbumin und Myoglobin nicht realisiert werden konnte. Durch die Verwendung von 1.7 μm Partikeln und Applikation eines UPLC-Systems konnte die Analysenzeit zwar deutlich reduziert werden auf weniger als 10 min, aber nichtsdestotrotz reichte die Selektivität der Methode von *Everley et al.* nicht aus, um Lactalbumin und Myoglobin basisliniengetrennt darstellen zu können. Durch die Verwendung der im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Monolithen konnte die Basislinientrennung der beiden Proteine ohne Probleme unter gängigen HPLC-Druckverhältnissen kleiner als 200 bar realisiert werden.

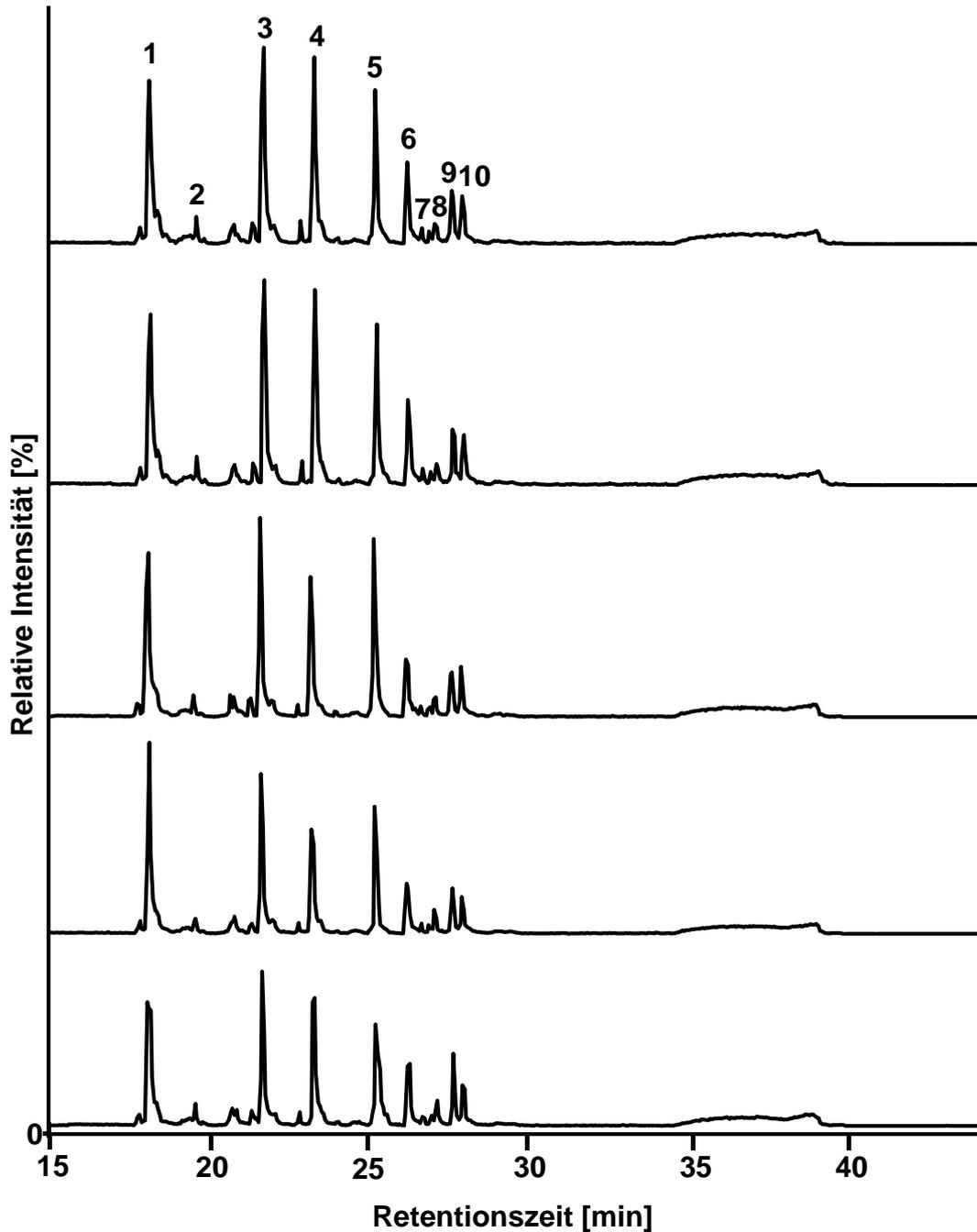


Abbildung 76: Fünf Wiederholungsmessungen eines 10er-Proteinstandards mittels micro-HPLC-FT-MS-Setup (BPCs), 5 Replikate. Ribonuclease A (1), Cytochrom C (2), Insulin (3), Lysozym (4), α -Lactalbumin (5), Myoglobin (6); Hämoglobin- α (7), Hämoglobin- β (8), β -Lactoglobulin B (9), β -Lactoglobulin A (10); 0-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $1.5 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $200 \times 0.1 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Trapsäule, $10 \times 0.2 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, 3 min Trapping ($10 \mu\text{l/min}$, 0.1% aq. HFBA); MS-Detektion, Massenbereich 550-3,000 m/z; ESI (positiver Modus), $R=100,000$.

Tabelle 41: Retentionszeiten sowie deren absolute und relative Standardabweichungen aus fünf Wiederholungsmessungen eines 10er-Proteinstandards mittels micro-HPLC-FT-MS-Setup (BPCs), 5 Replikate. Ribonuclease A (1), Cytochrom C (2), Insulin (3), Lysozym (4), α -Lactalbumin (5), Myoglobin (6); Hämoglobin- α (7), Hämoglobin- β (8), β -Lactoglobulin B (9), β -Lactoglobulin A (10); 0-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $1.5 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $200 \times 0.1 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Trapsäule, $10 \times 0.2 \text{ mm I.D.}$ PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, 3 min Trapping ($10 \mu\text{l/min}$, 0.1% aq. HFBA); MS-Detektion, Massenbereich 550-3,000 m/z; ESI (positiver Modus), $R=100,000$.

Peak	Protein	Mittelwert aus 5 Replikaten t_R [min]	s [min]	RSD [%]
1	Ribonuclease A	18.05	0.042	0.23
2	Cytochrom C	20.69	0.052	0.25
3	Insulin	21.57	0.016	0.07
4	Lysozym	23.15	0.027	0.12
5	α -Lactalbumin	25.08	0.008	0.03
6	Myoglobin	26.08	0.023	0.09
7	Hämoglobin- β	26.78	0.031	0.12
8	Hämoglobin- α	26.96	0.034	0.12
9	β -Lactoglobulin B	27.49	0,030	0.11
10	β -Lactoglobulin A	27.79	0.010	0.04

*(*Die unterschiedliche Elutionsreihenfolge der Hämoglobin-Ketten in diesem Proteinstandard erklärt sich daraus, dass in diesem Standard statt bovinem Hämoglobin menschliches Hämoglobin verwendet wurde, wodurch sich die Ketten in ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden.)*

Neben der adäquaten Trenneffizienz des verwendeten HPLC-Systems konnten alle Proteine durch Verwendung des Orbitrap-Massenanalysators mit hoher Spektrenqualität dargestellt werden (**Abbildung 77**). Darüber hinaus reichte normalerweise ein einzelner Scan aus, um ein qualitativ hochwertiges Spektrum zu erreichen. Dabei konnten alle Proteine, welche einen Massenbereich von 6 bis 19 kDa umfassen, dargestellt werden. Das sehr kleine Protein Insulin, von dem drei Ladungszustände detektiert wurden (3+, 4+ und 5+), konnte ebenso gut dargestellt werden wie die β -Lactoglobuline A und B, welche die größten Proteine in der Standardmischung waren mit annähernd 18.5 kDa. Bei beiden Isoformen konnten Ladungszustände im Bereich von 7+ bis 14+ detektiert werden.

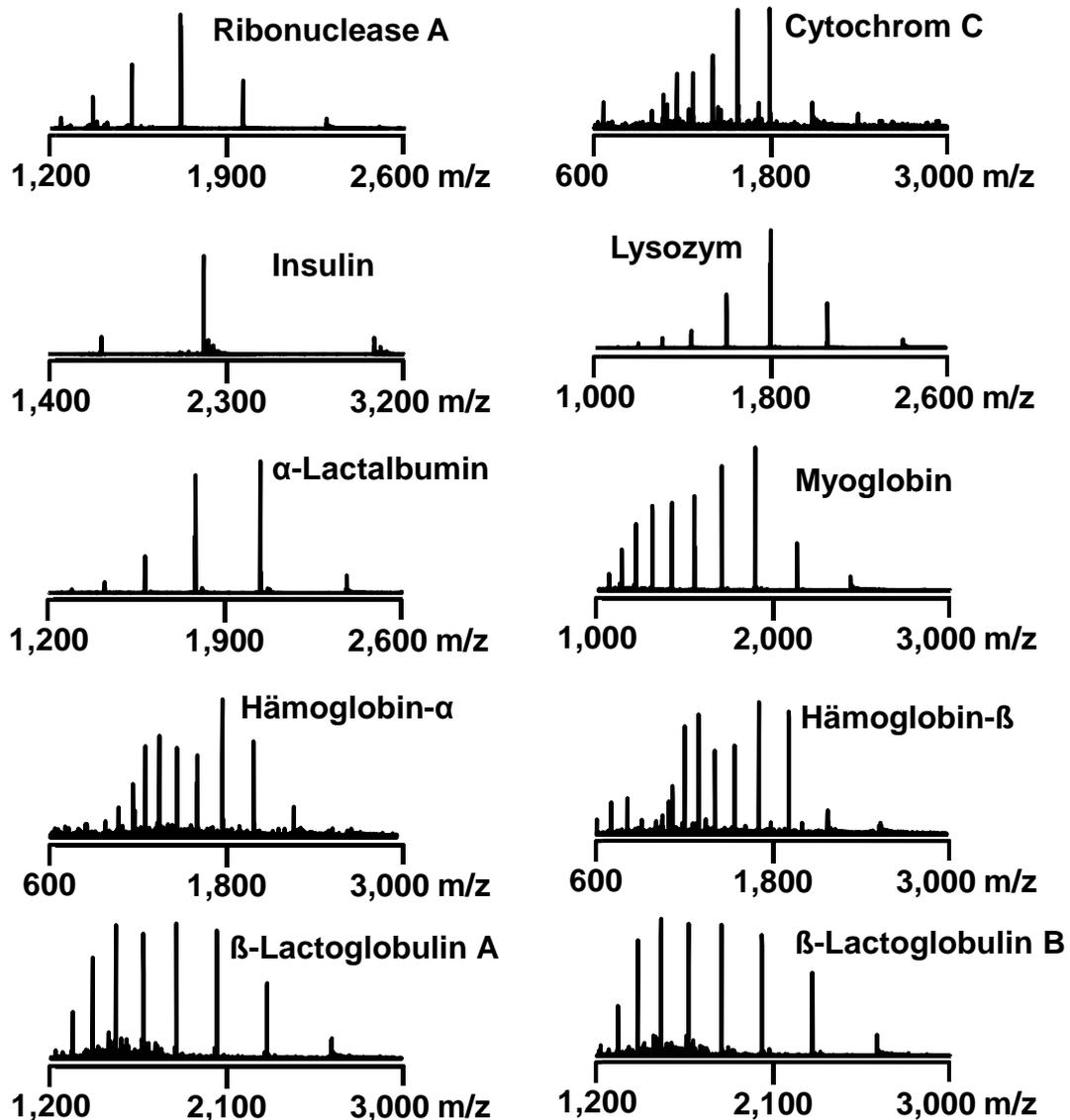


Abbildung 77: Beispielspektren aller Proteine aus dem 10er-Standard, analysiert mittels micro-HPLC-FT-MS-Setup. 0-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $1.5 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $200 \times 0.1 \text{ mm}$ I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Trapsäule, $10 \times 0.2 \text{ mm}$ I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, 3 min Trapping ($10 \mu\text{l/min}$, 0.1% aq. HFBA); MS-Detektion, Massenbereich 550-3000 m/z; ESI (positiver Modus), $R=100,000$.

Neben der Reproduzierbarkeit des verwendeten HPLC-Systems wurde die Massengenauigkeit des Orbitrap-Massenanalysators anhand der mittleren Massen (**Tabelle 42**) charakterisiert. Da die Proteine bei einer Auflösung von 100,000 detektiert wurden und somit die Isotopenauflösung aller detektierten Ladungszustände der Proteine erreicht werden konnte, wurde Xtract zur Dekonvolution der hochaufgelösten Proteinspektren verwendet.

Tabelle 42: Vergleich der gemessenen mit den theoretischen mittleren Massen der 10er-Proteinmischung.

Peak	Protein	Theoretische mittlere Masse [Da]	Gemessene mittlere Masse [Da]	Δ [ppm]
1	Ribonuclease A	13,682.33	13,682.30	-1.83
2	Cytochrom C	12,359.97	12,358.34	-131.89
3	Insulin	5,733.53	5,732.62	-158.7
4	Lysozym	14,305.16	14,303.84	-92.3
5	α -Lactalbumin	14,180.18	14,176.79	-237.0
6	Myoglobin	16,951.48	16,951.05	-25.4
7	Hämoglobin- β	15,867.22	15,866.32	-56.7
8	Hämoglobin- α	15,126.36	15,125.94	-38.3
9	β -Lactoglobulin B	18,276.29	18,276.47	+9.85
10	β -Lactoglobulin A	18,362.38	18,362.49	+5.99

Wie aus **Tabelle 42** hervorgeht, konnten die Proteine generell mit akzeptablen Massenabweichungen dargestellt werden. Die Proteine Ribonuclease A, β -Lactoglobulin A sowie β -Lactoglobulin konnten mit Massenabweichungen unter 10 ppm mit dem Orbitrap-Massenanalysator detektiert werden. Myoglobin ergab eine Abweichung von -25 ppm im Vergleich zur theoretischen Masse. Die beiden Hämoglobinketten konnten mit Massenabweichungen im Bereich von 40-50 ppm dargestellt werden. Auffallend bei einigen Proteinen sind Massenabweichungen jenseits von 100 ppm. Da alle Proteine im selben Massenbereich liegen mit Ausnahme von Insulin, ist es unwahrscheinlich, dass die verhältnismäßig großen Massenabweichungen auf eine fehlerhafte Kalibrierung der Massenachse zurückzuführen sind. Dies würde sich generell in systematischen Abweichungen aller Proteinmassen bemerkbar machen. Ursachen für die großen Massenabweichungen für α -Lactalbumin könnte chemische Ursachen haben wie Proteindegeneration, qualitativ schlechte Proteinchargen usw.

Vergleicht man die erhaltenen Messdaten mit den Arbeiten von *Manuela Hügel* (Dissertation, 2008, Universität des Saarlandes), die ähnliche Proteinmischungen mittels ToF-MS untersucht hat, so fällt auf, dass die Massengenauigkeit mittels FT-MS deutlich besser als mit dem entsprechenden ToF, was aufgrund der Orbitrap-Performance-Parameter zu erwarten war. Die Darstellung von Myoglobin konnte mittels FT-MS mit einer Massengenauigkeit kleiner als 2 ppm dargestellt werden, wohingegen die Darstellung mittels ToF nur mit einer Massengenauigkeit von 51 ppm

realisiert werden konnte. Die Massengenauigkeit von Myoglobin war mittels FT-MS mit einem Wert von 25 ppm im Vergleich zu 94 ppm (ToF) ebenfalls signifikant höher. Die beiden β -Lactoglobuline konnten an der Orbitrap mit Massengenauigkeiten unter 10 ppm detektiert werden. IM Gegensatz dazu lieferten die Daten von Manuela Hügel mittels ToF deutlich breiter gefächerte Werte: Die Massengenauigkeit von β -Lactoglobulin B am ToF betrug 38 ppm und war somit deutlich schlechter als an der Orbitrap wohingegen die massenspektrometrische Detektion von β -Lactoglobulin A am ToF 11 ppm betrug, was zwar immer noch qualitativ schlechter als an der Orbitrap ist, aber einen vergleichbaren Wert darstellt.

3.1.4 Analyse von großen Proteinen bis 80 kDa mittels micro-HPLC-FT-MS

Da in den vergangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, kleine bis mittelgroße Proteine in einem Massenbereich bis 30 kDa mit Isotopenauflosung und geringen Massenabweichungen darzustellen, so wird in diesem Teil der Dissertation getestet, ob auch die Analyse größerer Proteine wie HSA, Transferrin oder auch monoklonalen Antikörpern mit dem Orbitrap-Massenanalysator ebenfalls möglich ist. Da Proteine ab 50 kDa generell nicht mehr isotopenaufgelöst werden können, sollte bei Proteinen > 50 kDa die Auflosung auf 7,500 oder 15,000 heruntergesetzt werden, um die Datenaufnahmerate zu erhöhen. Dies ermöglicht die Aufnahme einer deutlich höheren Zahl an Scans, die bei der Auswertung aufsummiert werden können, was letztendlich die Spektrenqualität deutlich verbessert. Als erstes Beispiel wurde humanes Transferrin mit einer Masse von annähernd 80 kDa in das micro-HPLC-MS-System injiziert.

Da es sich um große Proteine handelt, müssen zusätzlich folgende Parameter zusätzlich eingestellt werden:

- HCD-Kollisionsgas: aus
- FT-Detektionsverzögerung (FT-Detection Delay): low
- Dekonvolutionsprogramm: ProMass 2.5 SR-1

Zuerst wurde mit diesen Einstellungen getestet, ob es möglich ist, eine isotopenaufgeloste Darstellung von Transferrin zu erhalten (**Abbildung 78**). Hierbei wurde ersichtlich, dass es nicht möglich ist, ein hochaufgelöstes Massenspektrum

von Transferrin selbst mit der höchst möglichen Auflösung zu generieren. Nichtsdestotrotz reichte die Spektrenqualität aus, um aus dem ermittelten Spektrum eine Masse zu dekonvolvieren. Hierbei wurde ein Hauptpeak mit einem kleineren Nebenpeak detektiert, die beide allerdings nahezu identische dekonvolvierte Massen lieferten ($M=78,008$ Da und $M=78,300$ Da). Die Massendifferenz von 292 Da könnte einer PTM in Form einer Glykosylierung – genauer gesagt einer N-Acetyl-Neuraminsäure-Glykosylierung (theoretische Massendifferenz 291.2579 Da) – entsprechen, da es sich bei Transferrin um ein im nativen Zustand mehrfach glykosyliertes Protein handelt [^{149;150}]. Ein genauere Blick auf die Summenspektren des Transferrinpeaks innerhalb der Analysen zeigt, dass die Signale für die einzelnen Ladungszustände durch ein Cluster von Massensignalen gebildet werden, was Anzeichen für die unterschiedlichen Glykosylierungsgrade des Transferrins sind.

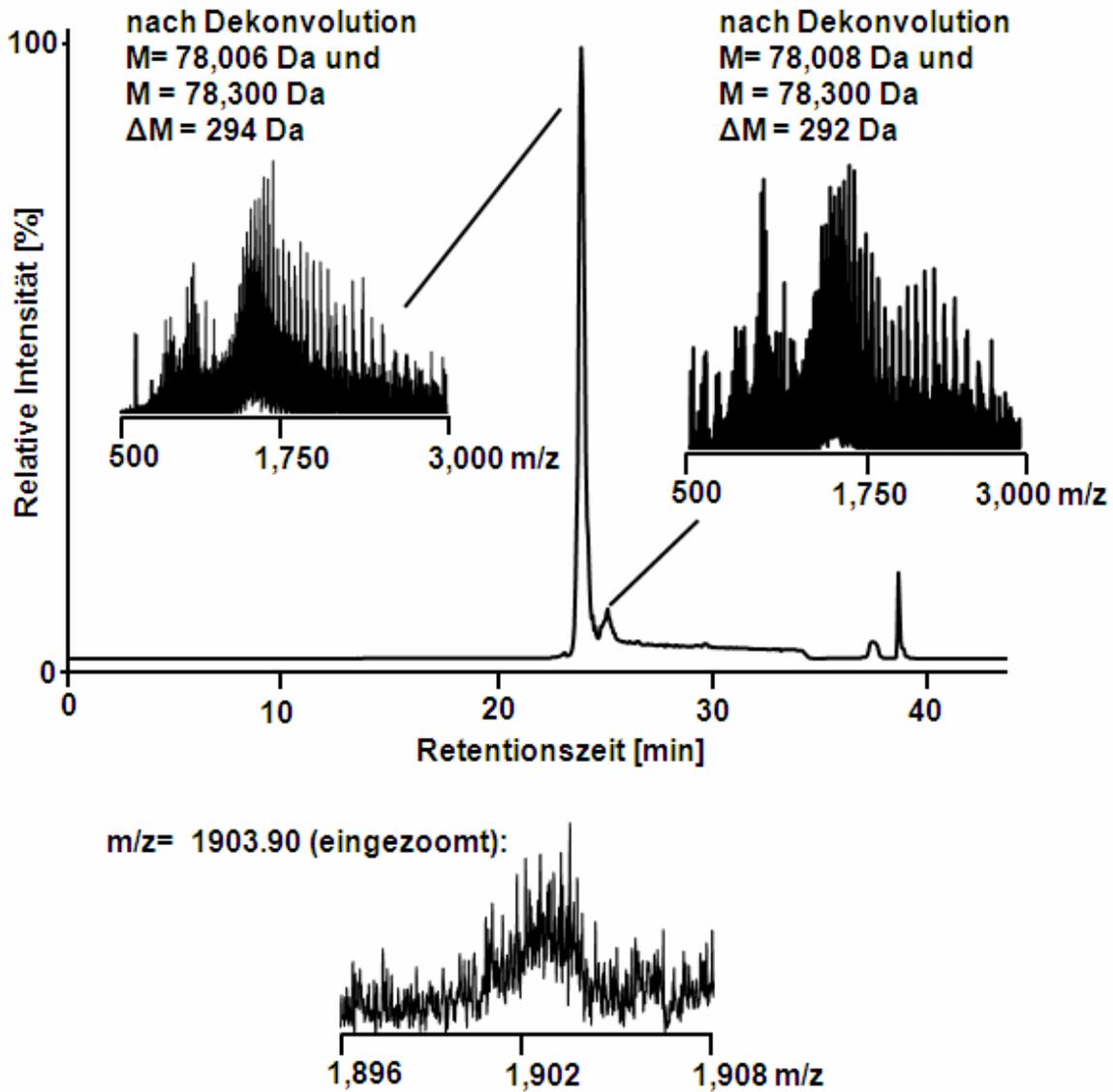


Abbildung 78: Analyse von humanem Transferrin mittels micro-HPLC-FT-MS (RTICC). 0-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $1.5 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $200 \times 0.1 \text{ mm}$ I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Trapsäule, $10 \times 0.2 \text{ mm}$ I.D. PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil, Injektion von $2.6 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ Protein; 3 min Trapping ($10 \mu\text{l}/\text{min}$, 0.10% aq. HFBA); MS-Detektion, Massenbereich 550-3,000 m/z ; ESI (positiver Modus), $R=100,000$.

Um die Spektrenqualität zu verbessern, wurden nach Optimierung der Transferrin-Analyse die folgenden Parameter gewählt:

- Eluent A: Wasser + 0.050% TFA
- Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA
- Gradient: 20-50% B in 30 min
- HPLC-System: Accela HPLC-System
- Säule: 50 x 1.0 mm ProSwift PS/DVB-Monolith
- Flussrate: 60 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Temperatur: 60 $^{\circ}\text{C}$
- $V_{\text{injection}}$: 1.0 μl
- LTQ Orbitrap XL, Auflösung: 15,000
- Massenbereich: 550-3,000 m/z (high mass range)
- Ionisierung: ESI, positiver Modus
- Tuning: Lysozym ($m/z= 2,044$)
- Kalibrierung der Massenachse: Calmix
- HCD-Kollisionsgas: aus
- High Mass Target Range Compensation
- FT-Detektionsverzögerung (FT-Detection Delay): low
- Dekonvolutionsprogramm: ProMass 2.5 SR-1
- Source Fragmentation: 20 V

Die Methode erwies sich hierbei als äußerst sensitiv, da eine Nachweisgrenze von 73 fmol für Transferrin in der Orbitrap berechnet werden konnte. Hierzu wurden drei Replikate mit einer 9.5 ng/ μl (122 fmol/ μl)-Stammlösung aufgenommen und aus den ermittelten Messwerten die Nachweisgrenzen aus dem intensivsten Ladungszustand des Proteins berechnet. Verglichen mit der Nachweisgrenze von Transferrin in der linearen Ionenfalle (LTQ), die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde, war die Nachweisgrenze für Transferrin (46 fmol) besser als in der Orbitrap.

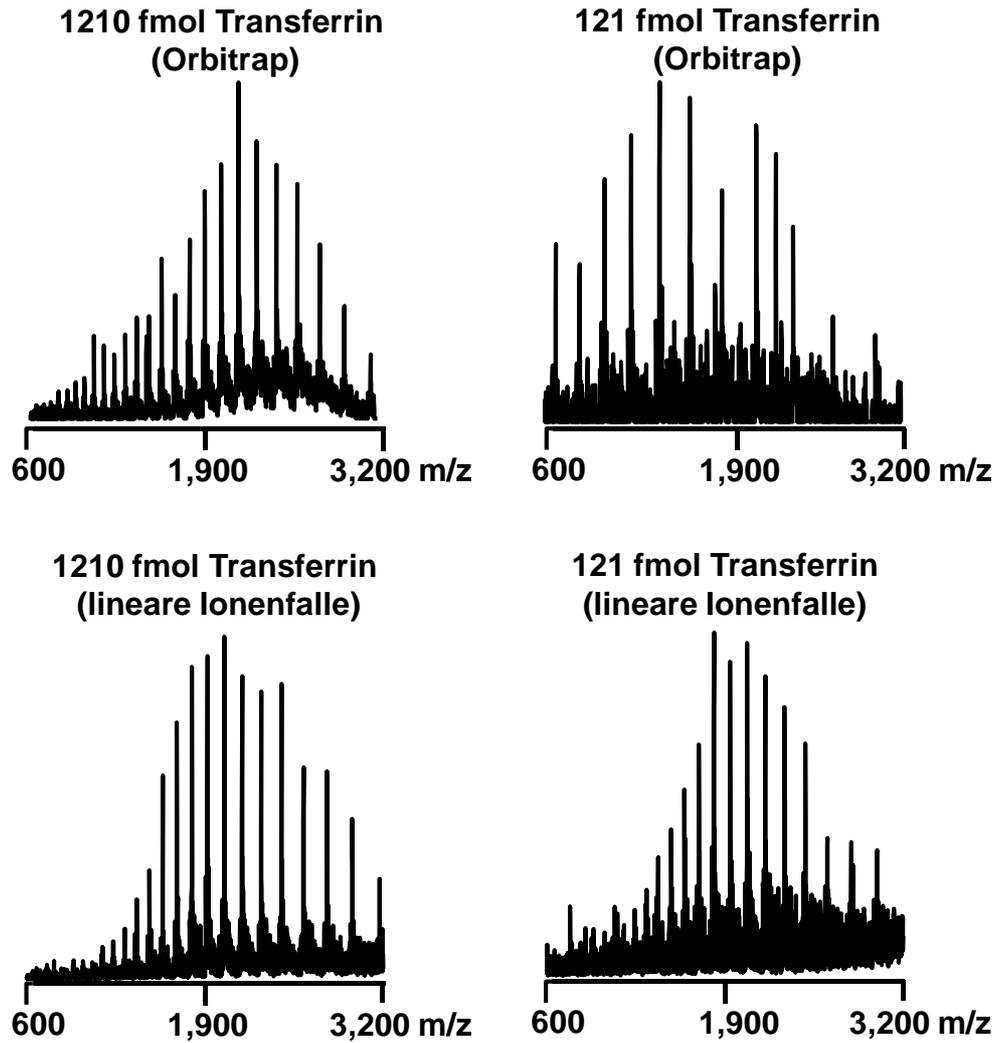


Abbildung 79: Analyse von humanem Transferrin mittels micro-HPLC-FT-MS (RTICC). 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 30 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ I.D. ProSwift RP PS/DVB-Monolith, Injektion von 1,210 sowie 121 fmol Protein; MS-Detektion, Massenbereich 600-3,200 m/z; ESI (positiver Modus), Vergleich der Spektrenqualität von linearer Ionenfalle (LTQ) und Orbitrap.

Abgesehen von Transferrin wurde auch humanes Serumalbumin mittels μ HPLC-FT-MS analysiert. Die massenspektrometrische Analyse von humanem Serumalbumin erfolgte unter der Verwendung der folgenden Parameter:

- Eluent A: Wasser + 0.050% TFA
- Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA
- Gradient: 20-80% B in 30 min
- HPLC-System: Accela HPLC-System
- Säule: 50 x 1.0 mm ProSwift PS/DVB-Monolith
- Flussrate: 60 μ l/min
- Temperatur: 60 $^{\circ}$ C
- $V_{\text{injection}}$: 1.0 μ l
- LTQ Orbitrap XL, Auflösung: 15,000 sowie zu Vergleichszwecken Aufnahmen in der linearen Ionenfalle
- Massenbereich: 1,400-3,200 m/z (high mass range)
- Ionisierung: ESI, positiver Modus
- Tuning: Lysozym (m/z= 2,044)
- Kalibrierung der Massenachse: Calmix
- HCD-Kollisionsgas: aus
- High Mass Target Range Compensation
- FT-Detektionsverzögerung (FT-Detection Delay): low
- Dekonvolutionsprogramm: ProMass 2.5 SR-1
- Source Fragmentation: 20 V

Wie in den **Abbildungen 80 und 81** gezeigt, gelang die Analyse von HSA mit hoher Spektrenqualität in der Orbitrap. Zu Vergleichszwecken wurden jeweils drei Replikate isowohl in der Orbitrap als auch in der linearen Ionenfalle gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei konnte die Analyse von BSA mit relativen Standardabweichungen in den Retentionszeiten von deutlich unter 1% sowohl in der Ionenfalle als auch in der Orbitrap realisiert werden. In der Orbitrap betrug die relative Standardabweichung lediglich 0.13%. Was allerdings auffällig erscheint ist die Tatsache, dass die Peakprofile der 3 Messungen stellenweise Unterschiede aufweisen: In der Orbitrap sehen die ersten beiden Läufe vom Peakprofil nahezu identisch aus; man erkennt deutlich die zwei Peakspitzen, wohingegen beim dritten

Lauf der Peak insgesamt ein tendenziell anderes Muster aufweist, da dort die zwei Peakspitzen nicht mehr zu sehen sind.

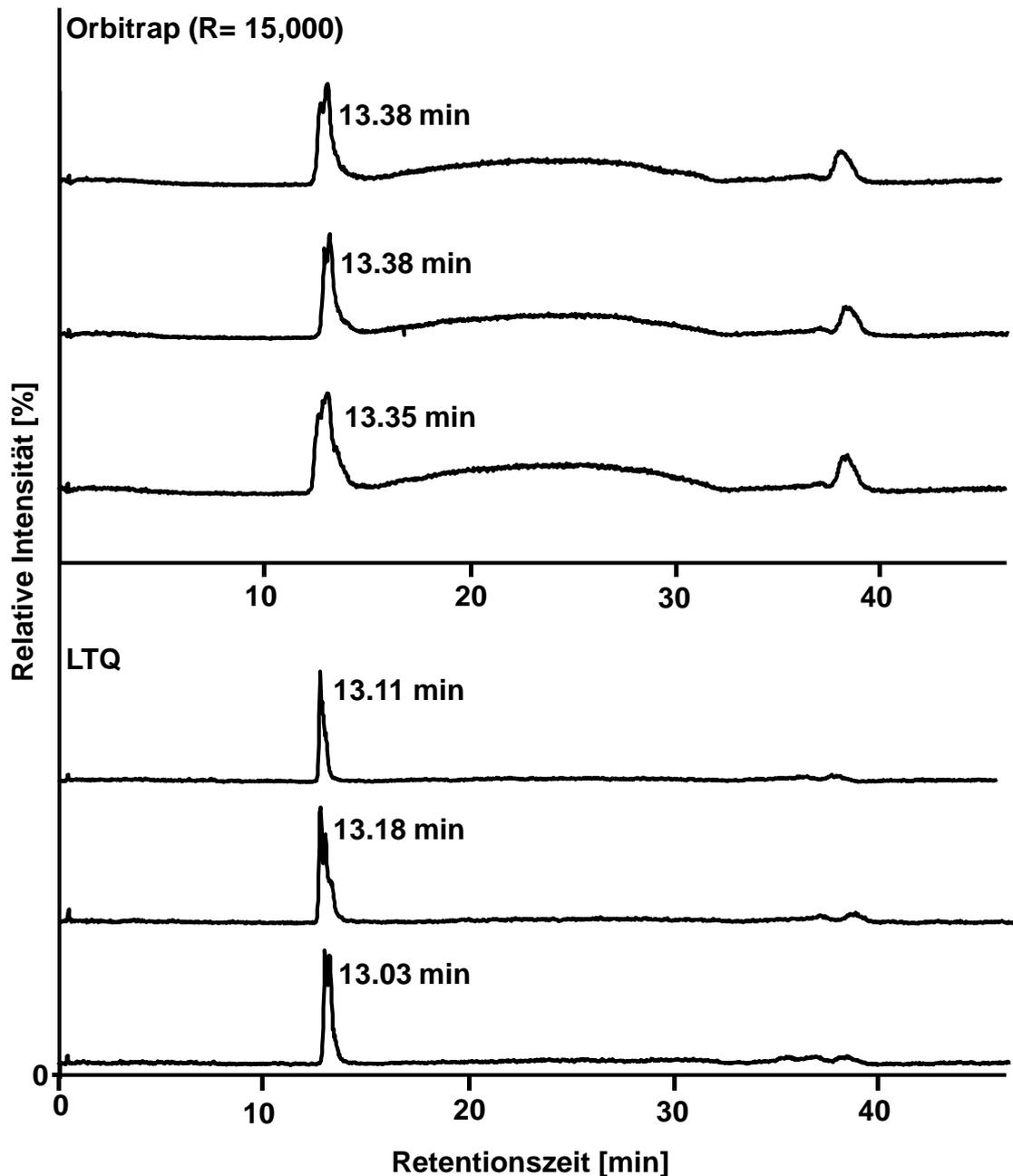


Abbildung 80: Vergleich von jeweils drei aufeinanderfolgenden Injektionen von HSA in der Orbitrap und der linearen Ionenfalle mittels micro-HPLC-MS-Setup. 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 40 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 1,400-3,200 m/z; ESI (positiver Modus), RTICCs.

Was die Spektrenqualität angeht, so sind in **Abbildung 81** zu Vergleichszwecken exemplarisch jeweils ein Spektrum aus der linearen Ionenfalle und der Orbitrap gegenübergestellt.

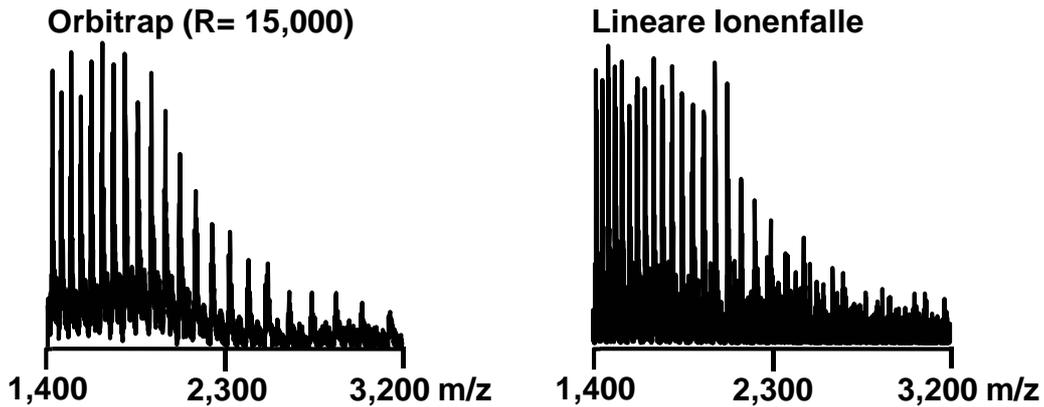


Abbildung 81: Vergleich der Spektrenqualität von HSA in der Orbitrap und der linearen Ionenfalle mittels micro-HPLC-MS-Setup. 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 40 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Injektion von 78 ng Protein (1.2 pmol); Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 1,400-3,200 m/z; ESI (Positiver Modus).

Vergleich man die Nachweisgrenzen, die anhand des intensivsten Ladungszustands des Proteins mittels Verdünnungsreihe und Mitteln von drei Wiederholungsmessungen bestimmt wurden (**Tabelle 43**).

Tabelle 43: Vergleich der Nachweisgrenzen von HSA in der Orbitrap und linearen Ionenfalle. Mittelwert aus 3 aufeinanderfolgenden Messungen; 20-50% Acetonitril in 0.050% TFA in 40 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Injektion von 78 ng Protein (1.2 pmol); Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 1,400-3,200 m/z; ESI (positiver Modus).

Nachweisgrenze von HSA in der Orbitrap [fmol]	Nachweisgrenze von HSA in der linearen Ionenfalle [fmol]
414	174

Hierbei wurde festgestellt, dass die Nachweisstärke der linearen Ionenfalle mit 174 fmol um fast 2.5 mal niedriger war als der entsprechende Wert in der Orbitrap (414 fmol). Nach der Dekonvolution der entsprechenden Spektren wurde die intakte Masse von HSA in der Orbitrap mit 66,599 Da sowie 66,595 Da in der linearen Ionenfalle bestimmt.

3.1.5 Analyse des monoklonalen Antikörpers 5.1 gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 mittels micro-HPLC-FT-MS

Abgesehen von Proteinen wie Transferrin (ca. 80 kDa) oder HSA (ca. 66 kDa) wurde in weiteren Experimenten auch untersucht, ob es möglich ist, intakte monoklonale Antikörper, die eine Größe von ca. 150 kDa besitzen, mittels micro-HPLC-FT-MS zu analysieren. Dies erfolgte hierbei unter der Verwendung der folgenden Parameter:

- Eluent A: Wasser + 0.050% TFA
- Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA
- Gradient: 20-90% B in 20 min
- HPLC-System: Accela HPLC-System
- Säule: 50 x 1.0 mm ProSwift PS/DVB-Monolith
- Flussrate: 60 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Temperatur: 60 $^{\circ}\text{C}$
- $V_{\text{injection}}$: 1.0 μl
- LTQ Orbitrap XL, Auflösung: 7,500 sowie zu Vergleichszwecken Aufnahmen in der linearen Ionenfalle
- Massenbereich: 1,600-4,000 m/z (high mass range)
- Ionisierung: ESI, positiver Modus
- Tuning: Lysozym (m/z= 2,044)
- Kalibrierung der Massenachse: Calmix
- HCD-Kollisionsgas: aus
- High Mass Target Range Compensation
- FT-Detektionsverzögerung (FT-Detection Delay): low
- Dekonvolutionsprogramm: ProMass 2.5 SR-1
- Source Fragmentation: 20 V

Wie in den **Abbildungen 82** und **83** dargestellt ist, gelang die Detektion des monoklonalen Antikörpers in der Orbitrap mit einer sehr hohen Spektrenqualität. Selbst 5.4 fmol des Antikörpers konnten in der Orbitrap und ebenso in der linearen Ionenfalle ohne Probleme detektiert werden mit dem verwendeten micro-HPLC-MS-Setup, was für die Sensitivität und Performance der Methode spricht.

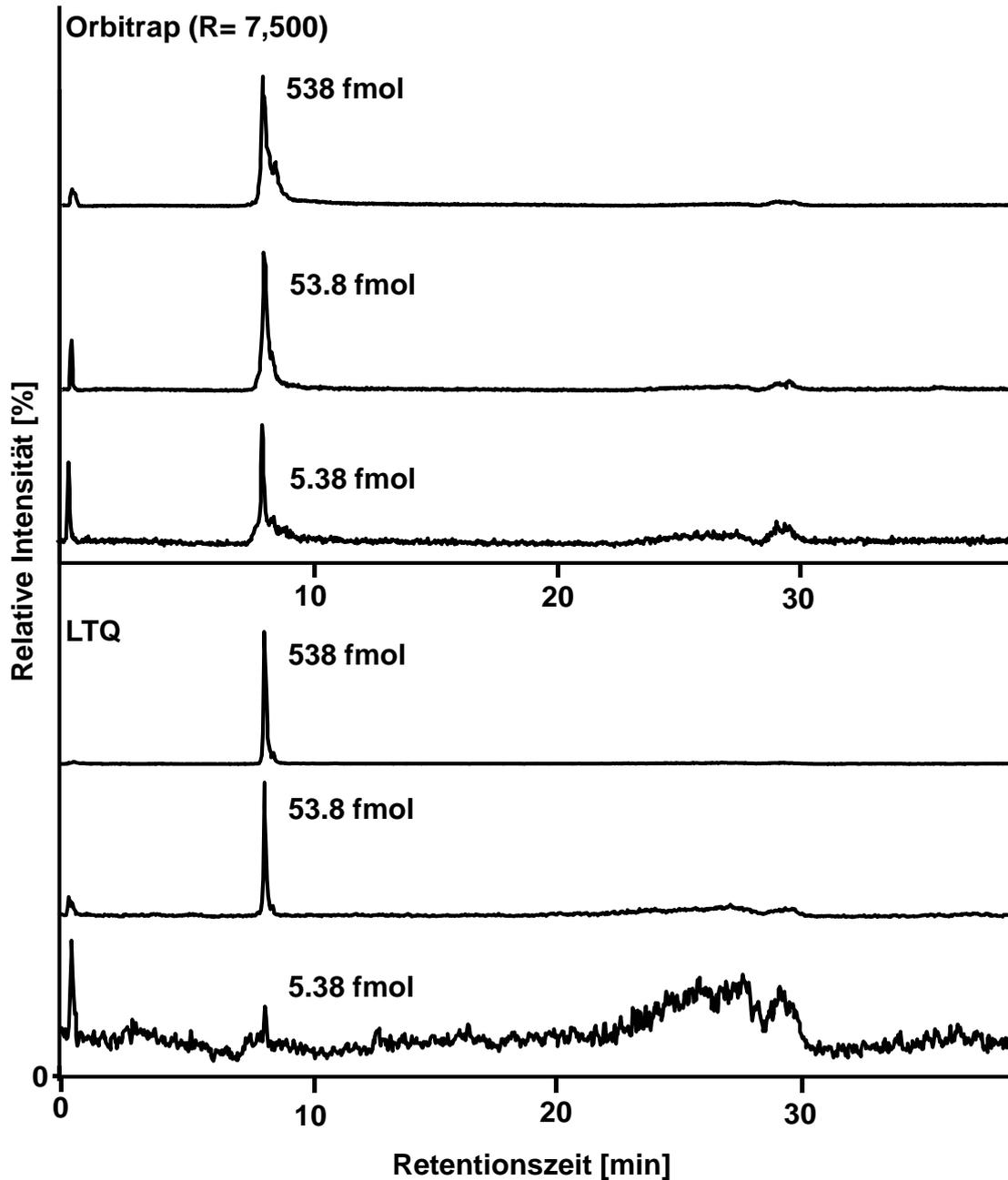


Abbildung 82: Vergleich der Injektion des monoklonalen Antikörpers Bet v 1 5.1 (538; 53.8 sowie 5.38 fmol) in der Orbitrap und in der linearen Ionenfalle mittels micro-HPLC-MS-Setup. 20-90% Acetonitril in 0.050% TFA in 20 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 1,600-4,000 m/z; ESI (positiver Modus), RTICC.

Die Nachweisgrenze wurde aus drei Replikaten der 5.38-fmol-Verdünnung bestimmt und betrug 2.0 fmol in der Orbitrap und 2.7 fmol in der linearen Ionenfalle, was praktikable Werte darstellt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde dabei der intensivste Ladungszustand des Antikörpers benutzt.

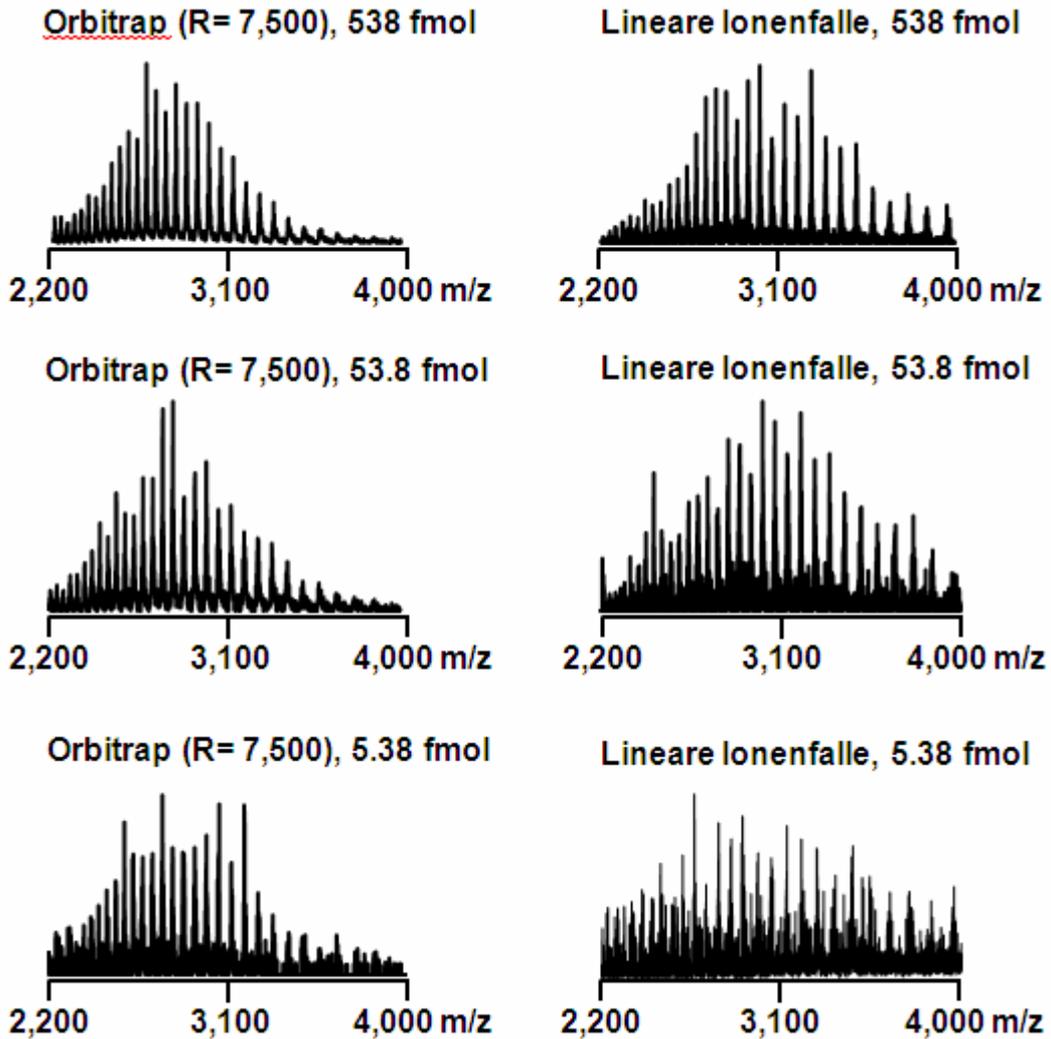


Abbildung 83: Vergleich der Spektrenqualität des monoklonalen Antikörpers Bet v 1 5.1 (538 und 53.8 fmol) in der Orbitrap und in der linearen Ionenfalle mittels micro-HPLC-MS-Setup. 20-90% Acetonitril in 0.050% TFA in 20 min, $60 \mu\text{l min}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1 \mu\text{l}$ (full loop), Säule, $50 \times 1.0 \text{ mm}$ ProSwift RP PS/DVB-Monolith; MS-Detektion, Massenbereich 1,600-4,000 m/z; ESI (positiver Modus).

Die dekonvolutierte Massenspektren aus der Orbitrap ergaben eine intakte Proteinmasse von **150,399 Da** für den monoklonalen Bet-V1-Antikörper 5.1. Im Vergleich dazu lieferte die lineare Ionenfalle eine Masse von **150,430 Da**. Die unterschiedlichen Massen hierbei resultieren demnach unter anderem aus der im Vergleich zur Orbitrap deutlich schlechteren Massengenauigkeit der Linearen Ionenfalle. In den dekonvolutierte Massenspektren erkennt man sowohl in der Linearen Ionenfalle als auch in der Orbitrap lediglich ein diskretes Signal.

3.1.6 Bestimmung der Nachweisgrenzen von Proteinen mittels micro-HPLC-FT-MS

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde eine Proteinmischung (**Tabelle 44**) bei verschiedenen Verdünnungen der Stammlösung (1:10, 1:100 und 1:1000) chromatographiert und mittels Orbitrap-Massenanalysator sowie linearer Ionenfalle detektiert, um die erhaltenen Werte untereinander vergleichen zu können.

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte über den intensivsten Ladungszustand des jeweiligen Proteins. Signale mit einem m/z-Verhältnis von kleiner als 3 galten als nicht mehr nachgewiesen. Pro Verdünnung wurden fünf Replikate gemessen und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

Tabelle 44: Konzentrationen der Proteine in der Stammlösung zur Bestimmung der Nachweisgrenzen.

Protein	Konzentration in der Stammlösung [mg/ml]
Ribonuclease A	1.16
Cytochrom C	0.97
Lysozym	1.17
Myoglobin	1.06
β-Lactoglobulin A	1.01

Die **Abbildungen 84-86** zeigen jeweils beispielhaft eine Trennung für die jeweilige Verdünnung. Um Verschleppungseffekte auszuschließen, wurden den jeweiligen Messungen mehrere Blankläufe vorgeschaltet und die kleinsten Konzentrationen zuerst analysiert.

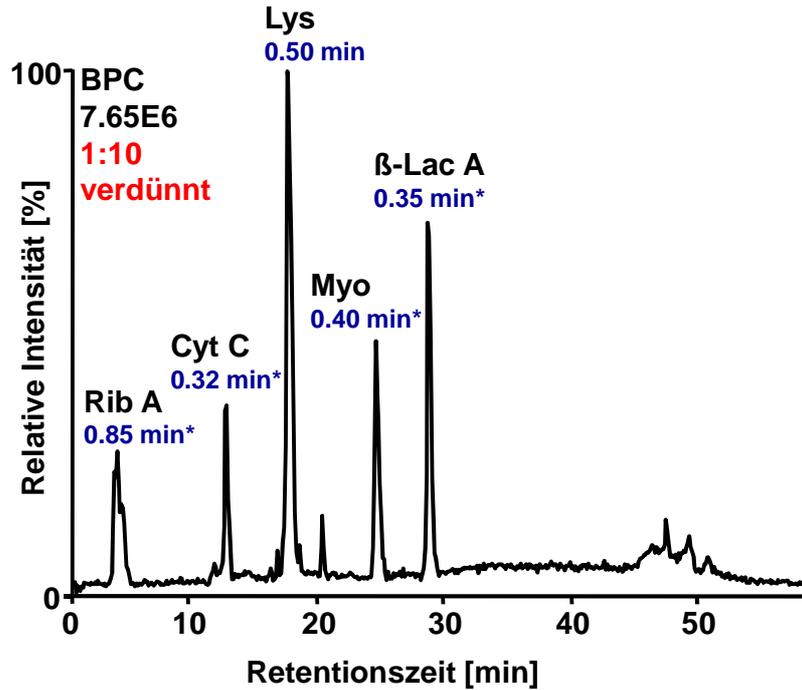


Abbildung 84: Trennung des Proteinstandards zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, 1:10-Verdünnung. PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-50% B in 40 min; 60 µl/min; Injektion von 1 µl Probe; 60 °C. (*Peakhalbwertsbreiten)

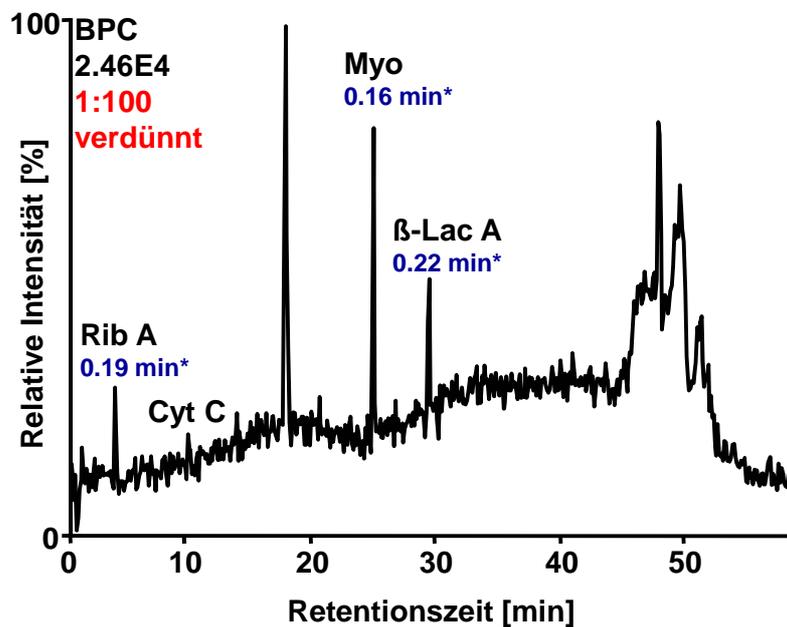


Abbildung 85: Trennung des Proteinstandards zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, 1:100-Verdünnung. PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-50% B in 40 min; 60 µl/min; Injektion von 1 µl Probe; 60 °C. (*Peakhalbwertsbreiten)

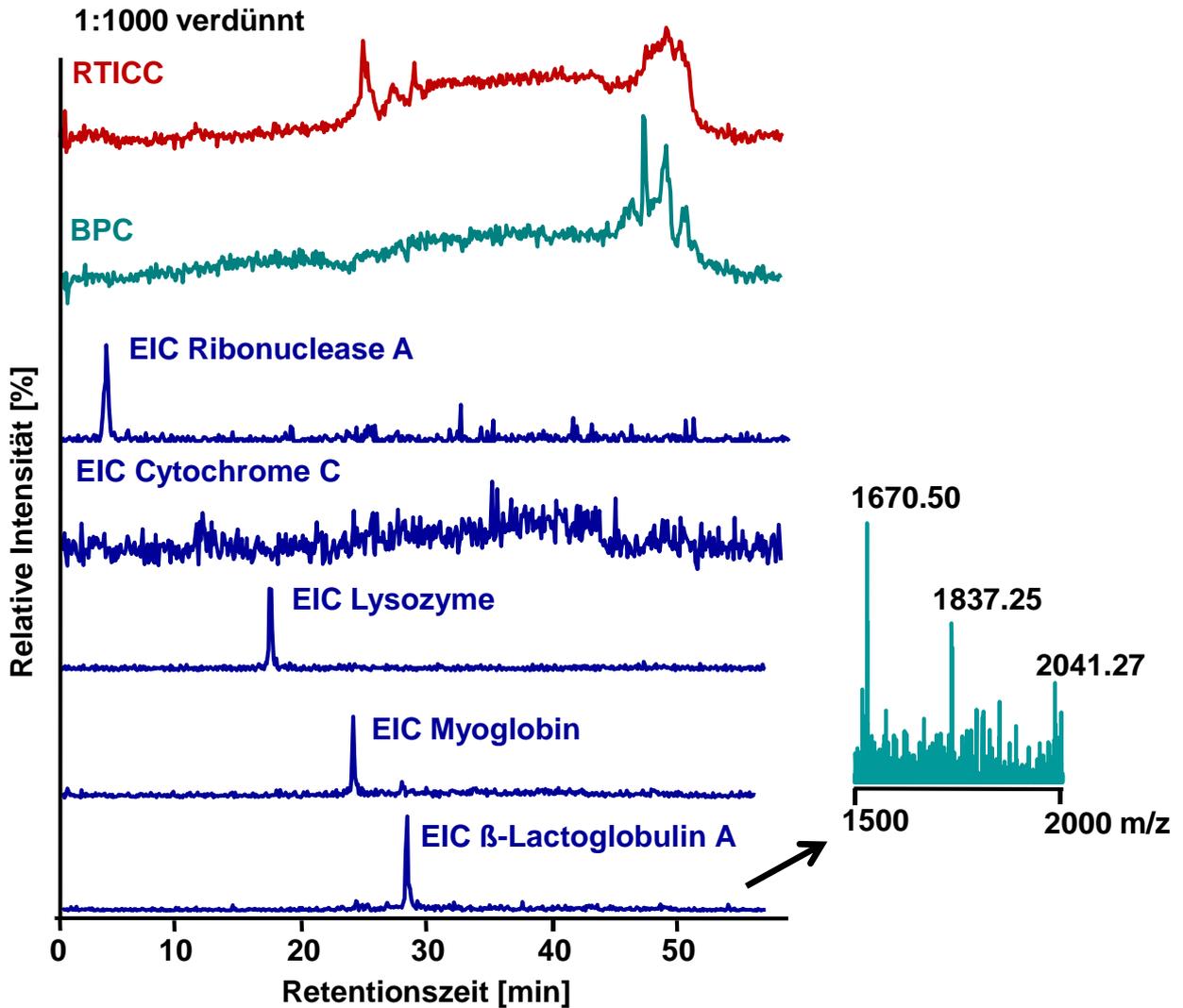


Abbildung 86: RTICC, BPC und EICs der Trennung des Proteinstandards zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, 1:1000-Verdünnung. PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-50% B in 40 min; 60 μ l/min; Injektion von 1 μ l Probe; 60 $^{\circ}$ C. (*Peakhalbwertsbreiten)

Tabelle 45: Vergleich der Nachweisgrenzen von fünf Proteinen in der linearen Ionenfalle (LTQ) und dem Orbitrap-Massenanalysator

Protein	Nachweisgrenze LTQ [fmol]	Nachweisgrenze Orbitrap [fmol]
Ribonuclease A	244	24
Cytochrom C	133	206
Lysozym	50	7
Myoglobin	45	38
β -Lactoglobulin A	49	26

Die ermittelten Nachweisgrenzen (**Tabelle 45**) in der Orbitrap waren bis auf Cytochrom C signifikant besser als die entsprechenden Werte in der linearen Ionenfalle. So konnte zum Beispiel für Ribonuclease A eine Nachweisgrenze von

244 fmol in der Ionenfalle und 24 fmol in der Orbitrap detektiert werden, was einer Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 entspricht. Ähnliche Ergebnisse konnten für Lysozym beobachtet werden (50 fmol in der Ionenfalle im Vergleich zu 7 fmol in der Orbitrap). Myoglobin, Lysozym und β -Lactoglobulin A hatten ähnliche Nachweisgrenzen in der Ionenfalle mit jeweils ca. 50 fmol. In der Orbitrap sah das Ergebnis anders aus: Während Myoglobin (38 fmol) und β -Lactoglobulin A (26 fmol) auch in der Orbitrap ähnliche Nachweisgrenzen zeigten, so lieferte Lysozym den niedrigsten Wert aller Proteine mit 7 fmol. Das einzige Protein, das in der Orbitrap eine schlechtere Nachweisgrenze lieferte als in der Ionenfalle, war Cytochrom C: Hier erhöhte sich die Nachweisgrenze von 133 fmol in der Ionenfalle auf 206 fmol in der Orbitrap. Bestimmte Faktoren können die Sensitivität beeinflussen: Da es sich um Proteine handelt, die eine gewisse Inhomogenität, beispielweise infolge des Herstellungsprozesses besitzen können, kann dies einen Einfluss auf die Nachweisgrenze haben: Inhomogenitäten beim Herstellungsprozess beschleunigen in Kombination mit nicht-fragmentierenden Kollisionen die Dephasierung der Ionenpakete, was zu Signalabschwächungen und demnach schlechteren Nachweisgrenzen führen kann. Da dies von Protein zu Protein verschieden ist, kann dieser Effekt stärker oder schwächer ausgeprägt sein. Diese Phänomene werden ausführlich in den Arbeiten von Makarov [⁴⁹] beschrieben.

3.1.7 Einfluss der Auflösung auf die Peakbreite von Proteinen

Da die Auflösung des Orbitrap-Massenanalysators in unmittelbarem Zusammenhang mit der Scanrate steht, ist es vor allem für chromatographische Trennungen wichtig, den Einfluss der Auflösung des Massenspektrometers auf die Breite der Peaks zu untersuchen. Je schneller die Aufnahmezeit der Datenpunkte, desto mehr Punkte werden pro Peak aufgezeichnet, wodurch der Peak qualitativ besser dargestellt werden kann, was sich in geringeren Peakhabwertsbreiten äußert. Gleichzeitig gilt aber auch: Je schneller die Aufnahmezeit der Datenpunkte, desto größer werden die entsprechenden Dateien, die später auszulesen und auszuwerten sind. In diesem Experiment erfolgte die Untersuchung der Peakverbreiterung mittels HPLC-UV-MS. Dabei kann einerseits der Einfluss des zusätzlichen säulenexternen Totvolumens durch den UV-Detektor als auch die Peakverbreiterung durch unterschiedliche Scanraten des MS ermittelt werden.

In Rahmen dieser Studie wurden die Peakhalbwertsbreiten der UV-Messungen mit den entsprechenden Ergebnissen der massenspektrometrischen Detektion bei Auflösungen von 7,500 und 100,000 verglichen und die Peakverbreiterung berechnet (**Tabelle 46**). Zu Vergleichszwecken wurden in der MS die Peakhalbwertsbreiten aus dem TIC und aus den EICs der fünf intensivsten Ladungszuständen des jeweiligen Proteins bestimmt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Peaks bei UV- bzw. massenspektrometrischer Detektion bei der Verwendung einer 45-nl-UV-Zelle und einer Auflösung von 7,500 je nach analysiertem Protein um 9 bis 13% im Vergleich zur UV-Detektion verbreiterten, wohingegen eine Auflösung von 100,000 die Peaks um 5 bis 44% verbreiterte, wenn man die Peakhalbwertsbreiten aus dem TIC vergleicht. Bei den EICs sind die Peakhalbwertsbreiten generell etwas geringer als in den TICs: Hier verbreitern sich die Peaks in 50% Peakhöhe um lediglich 0.2 bis 14% bei einer Auflösung von 7,500. Bei einer Auflösung von 100,000 verbreiterten sich die Peaks um 5 bis 25% im Vergleich zu den UV-Daten. Die breiteren Peaks bei massenspektrometrischer Detektion können in erster Linie durch das zusätzliche säulenexterne Totvolumen der UV-Detektionszelle erklärt werden. Dazu kommt aber zusätzlich die Peakverbreiterung infolge der geringeren Datenaufnahmerate des MS im Vergleich zum UV-Detektor. Bei der UV-Detektion wurde eine Datenaufnahmerate von 10 Hz gewählt, was deutlich höher ist im Vergleich zur MS ($R= 7,500 \rightarrow 0.5 \text{ Hz}$; $R= 100,000$). Die breiteren Peaks bei $R= 100,000$ können dadurch erklärt werden, dass die Aufnahmerate deutlich erniedrigt ist (0.5 Hz), wodurch der Peak durch eine geringere Anzahl an Datenpunkten dargestellt werden kann. Dies führt letztendlich zu einer größeren Peakhalbwertsbreite. Der direkte Vergleich der Peakhalbwertsbreiten bei einer Auflösung von 100,000 und 7,500 zeigte eine signifikante Verbreiterung der Peaks bei der höchst möglichen Auflösung.

Tabelle 46: Vergleich der Peakhalbwertsbreiten der UV- und MS-Daten (R= 7,500 und R= 100,000) für vier verschiedene Proteine.

Protein	w _h UV [min]	w _h MS (TIC) R= 7,500 [min]	w _h UV [min]	w _h MS (TIC) R= 100,000 [min]
Carboanhydrase	0.519	0.563	0.513	0.737
Cytochrom C	0.303	0.334	0.337	0.437
Lysozym	0.436	0.487	0.538	0.567
β-Lactoglobulin B	0.320	0.363	0.304	0.390
Protein	w _h UV [min]	w _h MS (EIC) R= 7,500 [min]	w _h UV [min]	w _h MS (EIC) R= 100,000 [min]
Carboanhydrase	0.519	0.520	0.513	0.640
Cytochrom C	0.303	0.307	0.337	0.400
Lysozym	0.436	0.467	0.538	0.563
β-Lactoglobulin B	0.320	0.363	0.304	0.380

(Bei den Peakhalbwertsbreiten handelt es sich um die gemittelten Werte aus 3 Replikaten.)

Peakverbreiterung (50% Peakhöhe) beim Vergleich UV und MS (R= 7,500, TIC): **8.5 bis 13.4%**
 Peakverbreiterung (50% Peakhöhe) beim Vergleich UV und MS (R= 7,500, EIC): **0.2 bis 13.4%**
 Peakverbreiterung (50% Peakhöhe) beim Vergleich UV und MS (R= 100,000, TIC): **5.4 bis 43.7%**
 Peakverbreiterung (50% Peakhöhe) beim Vergleich UV und MS (R= 100,000, EIC): **4.7 bis 25.0%**

3.2 Anwendung für die Analyse von Antikörpern

3.2.1 Analyse von f(ab')₂-Fragmenten von zwei monoklonalen Maus-anti-Troponin-I-Antikörpern

Das in **Kapitel II** ausführlich getestete und charakterisierte micro-HPLC-FT-MS-Setup wurde nun zur Analyse von Realproben mit Schwerpunkt auf großen Proteinen eingesetzt. Die erste Realprobe umfasste die Analyse und Reinheitskontrolle der f(ab')₂-Fragmente (ca 100 kDa, 2 leichte Ketten + 2 x 2 halbe schwere Ketten) von zwei verschiedenen monoklonalen Troponin-I-Antikörpern (Maus): mAB IgG TnI MF4 f(ab')₂ sowie mAB IgG TnI 16A11 f(ab')₂.

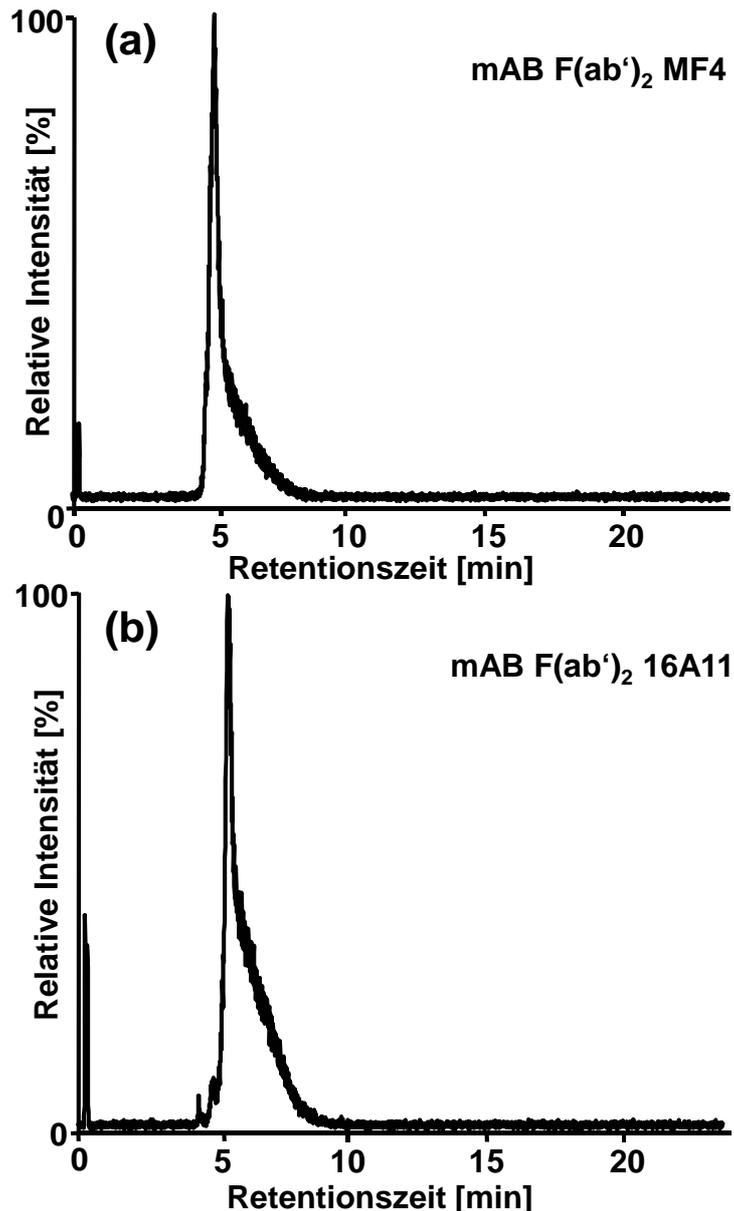


Abbildung 87: micro-HPLC-FT-MS-Analyse von $f(ab')_2$ -Fragmenten zweier monoklonaler Troponin-I-Antikörper (RTICCs): (a) MF4; (b) 16A11; Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-90% B in 20 min; 60 μ l/min; Injektion von 3.0 μ l Probe (250 ng/ μ l); 60 $^{\circ}$ C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 1,900-4,000 m/z), LTQ Orbitrap XL, Auflösung: 7,500.

Wie **Abbildung 87** zu entnehmen ist, sind bei beiden Antikörper-Fragmenten neben dem jeweiligen Hauptpeak keine weiteren Peaks zu erkennen bis auf 2 kleinere Peaks vor dem Hauptpeak in **Abbildung 94B**, die allerdings lediglich auf Schwankungen der Basislinie zurückzuführen sind und keine Verunreinigungen oder Proteinmodifikationen beinhalten. Dies spricht generell für eine sehr hohe Probenreinheit. Hierbei ergaben sich Retentionszeiten von 6.10 min für das $f(ab')_2$ -Fragment MF4 sowie 6.38 min für das $f(ab')_2$ -Fragment 16A11. Das signifikante

Tailing der Peaks kann hierbei darauf zurückgeführt werden, dass große Probenmengen injiziert wurden, um eventuelle Nebenprodukte detektieren zu können. Die Spektrenqualität war in beiden Fällen adäquat (**Abbildung 88**). Man erkennt deutlich die Unterschiede zwischen beiden Antikörper-Fragmenten: Während das f(ab')₂-Fragment 16A11 ein Spektrum mit jeweils einem einzigen Hauptsignal pro Ladungszustand des Proteins ergab bis auf einige im hinteren Teil des Signals erkennbare Signale, bei denen es sich um Addukte handeln könnte, konnten beim f(ab')₂-Fragment MF4 zwei Hauptsignale pro Ladungszustand des Protein detektiert werden. Dieser Unterschied kann mehrere Ursachen haben: Einerseits kann es sich um Isoformen des entsprechenden Fragments bzw. auch posttranslationale Modifikationen handeln. Um genauere Aussagen treffen zu können, mussten zuerst die dekonvolvierten Proteinmassen ermittelt werden (**Tabelle 47**).

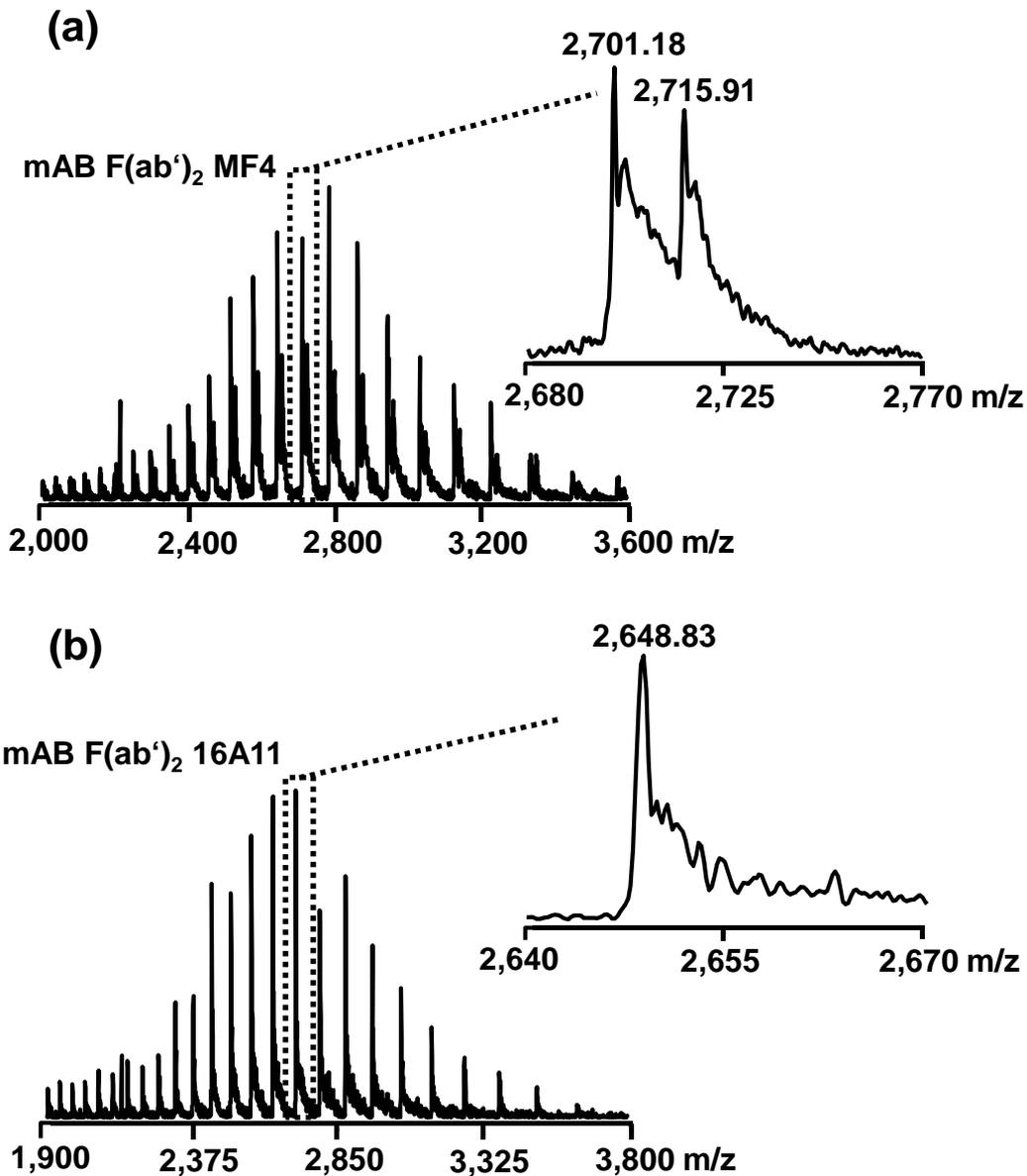


Abbildung 88: micro-HPLC-FT-MS-Analyse von f(ab')₂-Fragmenten zweier monoklonaler Troponin-I-Antikörper in der Orbitrap (Spektren): (a) MF4; (b) 16A11; Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-90% B in 20 min; 60 µl/min; Injektion von 3 µl Probe (250 ng/µl); 60 °C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 1,900-4,000 m/z, Auflösung 7,500; LTQ Orbitrap XL. Aufsummierung des jeweiligen Peaks.

Tabelle 47: Dekonvolutierte Massen der f(ab')₂-Fragmente MF4 und 16A11 in der Orbitrap.

f(ab') ₂ -Fragment	Ermittelte Masse in der Orbitrap [Da]
MF4	94,536 und 95,076
16A11	97,999

Die dekonvolutierte Masse des 16A11-Antikörper-Fragments betrug hierbei 97,999 Da, wohingegen die Dekonvolution des MF4-Fragments zwei Massen (94,536 sowie 95,076 Da) lieferte. Die Massendifferenz zwischen den zwei ermittelten Massen des

MF4-Fragments betrug hierbei 540 Da. Betrachtet man PTMs, so könnte dies beispielsweise einer ADP-Ribosylierung (theoretische Masse: 541.3052 Da) entsprechen, was jedoch äußerst unwahrscheinlich ist. Kombinationen aus anderen PTMs wie beispielsweise Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Glykosylierungen lieferten keine Massen im Bereich um 540 Da.

Nichtsdestotrotz gelang mit dem verwendeten micro-HPLC-FT-MS-Setup die schnelle Analyse mehrerer Realproben, und es konnte gezeigt werden, dass die analysierten Proben in hoher Reinheit und Homogenität vorlagen.

Zu Vergleichszwecken wurden dieselben Antikörper-Fragmente unter identischen Bedingungen in der linearen Ionenfalle analysiert. (**Abbildung 89**). Hier betrugen die dekonvolvierten Massen 98,014 Da für das 16A11-Antikörper-Fragment sowie 94,551 und 95,014 Da für das MF4-Fragment. (**Tabelle 48**).

Tabelle 48: Dekonvolvierte Massen der f(ab')₂-Fragmente MF4 und 16A11 in der Linearen Ionenfalle.

f(ab') ₂ -Fragment	Ermittelte Masse in der Linearen Ionenfalle [Da]
MF4	94,551 und 95,014
16A11	98,014

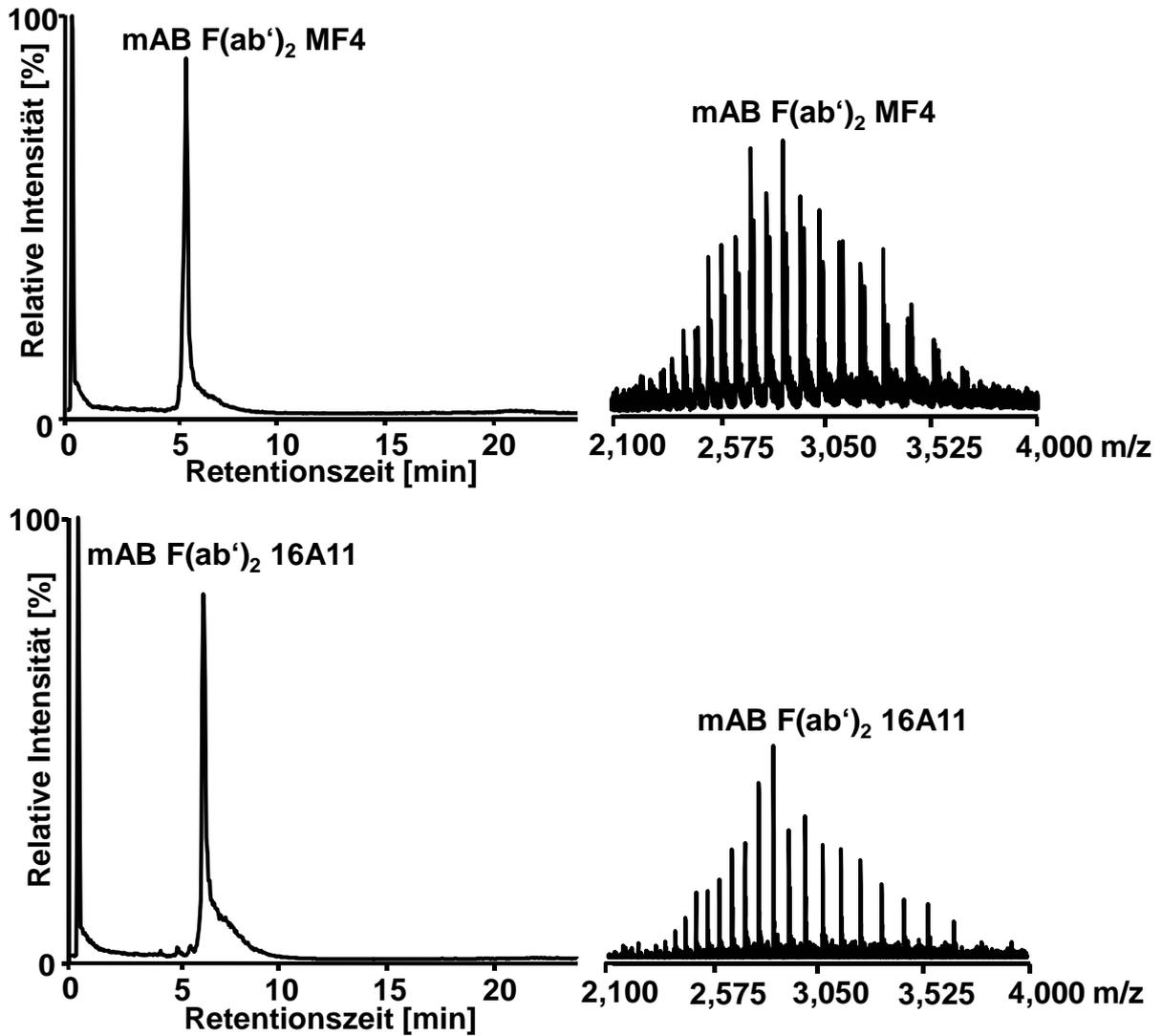


Abbildung 89: micro-HPLC-IT-MS-Analyse von $f(ab')_2$ -Fragmenten zweier monoklonaler Troponin-I-Antikörper (RTICCs): (a) MF4; (b) 16A11; Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-90% B in 20 min; 60 μ l/min; Injektion von 3 μ l Probe (250 ng/ μ l); 60 $^{\circ}$ C; ESI (p positiver Modus), Massenbereich 1,900-4,000 m/z), LTQ (Lineare Ionenfalle).

Ein Vergleich der gemessenen intakten Proteinmassen mit theoretischen Werten war nicht möglich, da die untersuchten Antikörper noch nicht sequenziert wurden.

3.2.2 Analyse der monoklonalen Antikörper 8.3 und 5.1 gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1

Als nächste Realprobe wurden intakte monoklonale Antikörper gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 untersucht. Hierbei lagen zwei verschiedene Antikörper-Präparationen vor (mAB Bet v 1 5.1 und 8.3), die sich beide in ihrer Bindungsaffinität unterscheiden. Aufgrund von Affinitätsstudien [¹²⁹] konnte der monoklonale Antikörper Bet v 1 8.3 als schwach bindend und Bet V1 5.1 als stark bindend eingestuft werden. Abgesehen von strukturellen Unterschieden können auch Verunreinigungen oder nicht mehr intakte Antikörper einen erheblichen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben. Zur genaueren Untersuchung wurden die Antikörper mittels micro-HPLC-FT-MS analysiert, um etwaige Unterschiede zwischen den mABs finden zu können. Wie **Abbildung 90** zu entnehmen ist, wurden während des chromatographischen Laufs drei Peaks detektiert.

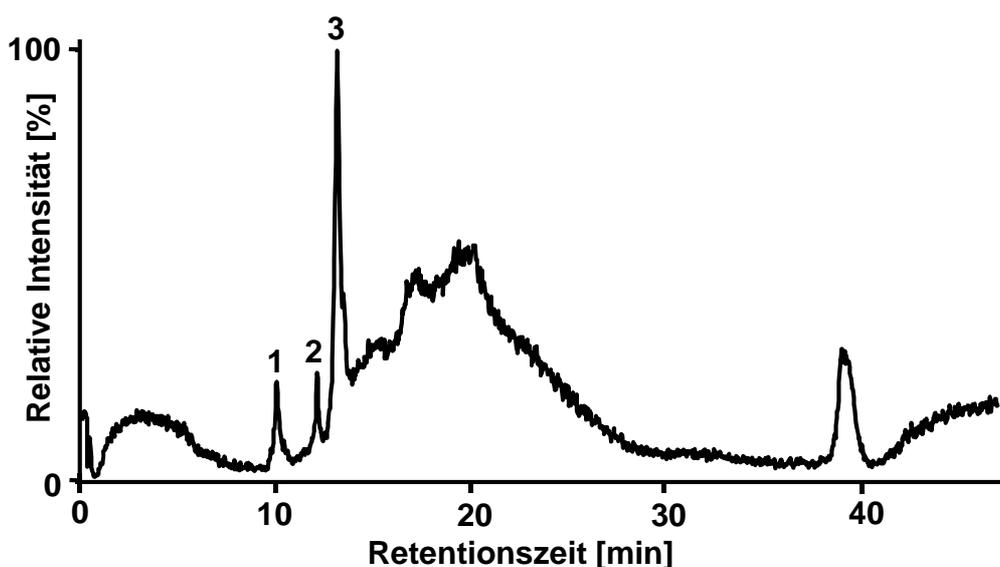


Abbildung 90: Chromatographische Analyse (RTICC) des monoklonalen Antikörpers Bet v 1 8.3 (schwach bindend). Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-80% B in 30 min; 60 µl/min; Injektion von 1 µl Probe (260 ng/µl); 60 °C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 1,600-4,000 m/z, LTQ Orbitrap XL; Auflösung 7,500. Peak 1: mehrere Proteine im Bereich von 25 kDa, Peak 2: Proteine im Bereich von 75 kDa, Peak 3: Proteine im Bereich von 100-150 kDa.

Es wird deutlich, dass der monoklonale Antikörper nicht mehr intakt bzw. verunreinigt ist, was die schlechte Bindungsaffinität erklären könnte. Peak 1 enthält hierbei Proteine im Bereich um 25 kDa (**Abbildung 91**), was für den Zerfall des Antikörpers spricht. Bei Proteinen im Bereich von 25 kDa kann es sich um leichte Ketten bzw.

andere Antikörper-Fragmente wie z.B. fc-Fragmente handeln. Peak 2 beinhaltet mehrere Proteine im Bereich von 75 kDa, was der Summe einer leichten (25 kDa) und schweren Kette (50 kDa) bzw. f(ab)-Fragmenten (50 kDa) und fc-Fragmenten (25 kDa) entsprechen könnte. Auch in Peak 3 sind mehrere Proteinsignale erkennbar, wobei hier nach der Dekonvolution Proteine im Bereich von 100-160 kDa detektiert wurden. Aufgrund der großen Spektreninhomogenität ist es hierbei schwer zu sagen, ob es sich bei einigen Proteinsignalen tatsächlich um echte Signale oder lediglich Dekonvolutionsartefakte handelt. Nichtsdestotrotz ist es offensichtlich, dass der Antikörper nicht mer intakt ist bzw. diverse Verunreinigungen beinhaltet, was die schlechtere Bindungsaffinität erklären könnte.

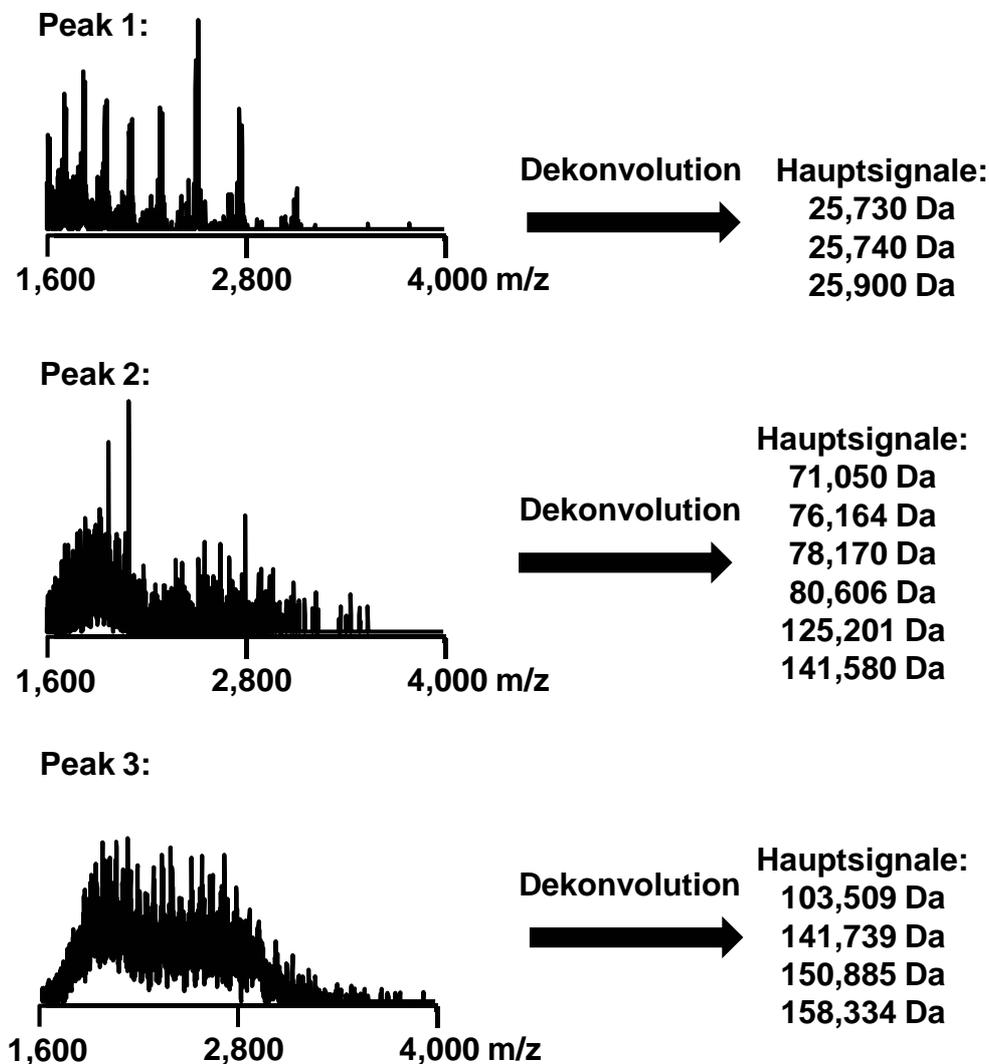


Abbildung 91: Spektren der 3 Peaks der micro-HPLC-FT-MS-Analyse des schwach bindenden monoklonalen Antikörpers Bet v 1 8.3. Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-80% B in 30 min; 60 µl/min; Injektion von 1 µl Probe (260 ng/µl); 60 °C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 1,600-4,000 m/z, LTQ Orbitrap XL; Auflösung 7,500. Peak 1: mehrere Proteine im Bereich von 25 kDa, Peak 2: Proteine im Bereich von 75 kDa, Peak 3: Proteine im Bereich von 100-150 kDa.

Im Anschluss wurde der stark bindende Bet v 1-Antikörper 5.1 ebenfalls mit dem micro-HPLC-FT-MS-Setup untersucht. Es wird deutlich, dass bei der Analyse des mAB Bet v 1 5.1 (**Abbildung 92**) lediglich ein einziger Peak detektiert wurde, was für eine sehr hohe Reinheit des Antikörpers spricht. Wird der Peak aufsummiert, erhält man ein qualitativ hochwertiges Spektrum des monoklonalen Antikörpers in der Orbitrap. Nach der Dekonvolution erhält man eine Masse von 150,399 Da für den intakten monoklonalen Antikörper.

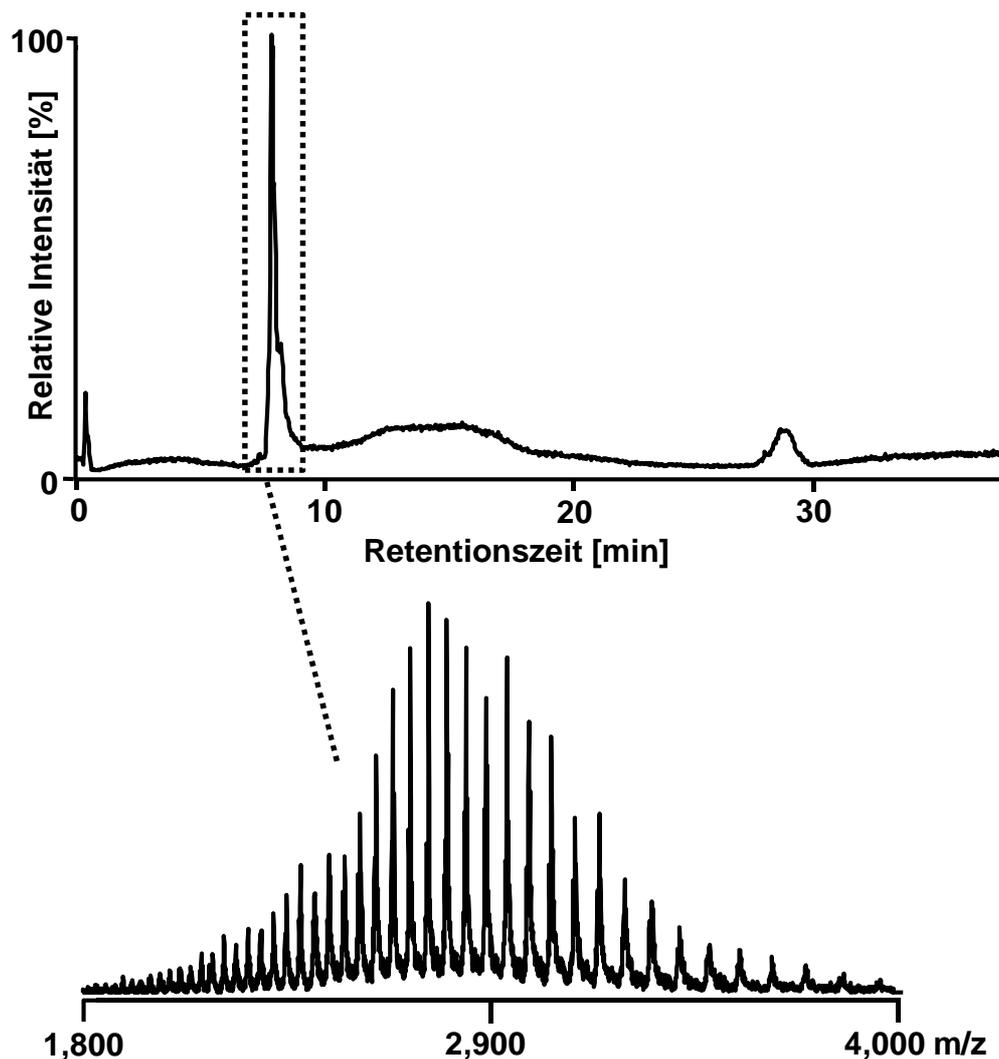


Abbildung 92: Chromatographische Analyse (RTICC) des monoklonalen Antikörpers Bet v 1 5.1 (stark bindend). Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-90% B in 20 min; 60 µl/min; Injektion von 1 µl Probe (720 ng/µl); 60 °C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 1,600-4,000 m/z), LTQ Orbitrap XL; Auflösung 7,500.

Es wird deutlich, dass Affinitätsmessungen nicht ausreichend sind, um monoklonale Antikörper zu charakterisieren. Das hier eingesetzte micro-HPLC-FT-MS-Setup zeigt deutlich, dass der schwach bindende Antikörper 8.3 nicht mehr intakt ist, was sich in mehreren Peaks und charakteristischen Proteinmassen von 25-100 kDa zeigt.

Darüber hinaus zeichnet sich der schwach bindende Antikörper durch eine schlechtere Spektrenqualität trotz großer injizierter Mengen aus. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass der stark bindende Antikörper intakt ist und keine Verunreinigungen beinhaltet, was sich in qualitativ hochwertigen Spektren und keinen weiteren Peaks äußerte. Demnach ist das micro-HPLC-FT-MS-Setup ein leistungsstarkes Tool zur schnellen Antikörperanalytik und Massenbestimmung.

3.3 Analyse des Proteinextrakts aus dem Spulwurm

Ascaris lumbricoides

Bei dem zu den Nematoden gehörenden Spulwurm *Ascaris lumbricoides* [¹⁵¹] handelt es sich um einen Darmparasiten, von dem weltweit fast 1.5 Milliarden Menschen (hauptsächlich Kinder) infiziert sind [¹⁵²]. Der gelblich-rot gefärbte Helminth (**Abbildung 93**) erreicht eine Größe von 15-40 cm und nistet sich im Dünndarm ein. Die Eier der Weibchen werden mit dem Stuhl ausgeschieden und können hierbei über verunreinigte Nahrungsmittel oder Wasser auf andere Menschen übertragen werden. Nach einer Reifungsphase können die Eier bei günstigen Verhältnissen mehrere Jahre infektiös bleiben, was die Gefahr für einen neuen Spulwurmbefall (*Ascariasis*) [¹⁵²⁻¹⁵⁴] drastisch erhöht.



Abbildung 93: *Ascaris lumbricoides* aus einem infizierten Kind aus Kolumbien; Parasit wurde von Prof. Luis Caraballo (Universität Cartagena, Kolumbien) entnommen.

Im Dünndarm angelangt schlüpfen die Larven aus der Eihülle und penetrieren die Darmschleimhaut. Über den Blutstrom gelangen sie in Leber (Larvenstadium 3, L3) und letztendlich in die Lunge, wo sie sich in den Alveolen zu L4 entwickeln. Nach dem Hochhusten der Larve aus der Lunge erreichen sie über die Bronchien und Luftröhre den Kehlkopf. Hier wird die Larve entweder abgehustet oder geschluckt. Durch das Verschlucken gelangt die Larve wieder zurück in den Dünndarm, wo sie sich zum adulten Helminth entwickelt und bis zu 1.5 Jahre alt werden kann. Von der Ascariasis betroffen sind hauptsächlich Bewohner warmer Länder mit relativ schlechten Hygienestandards wie beispielsweise Afrika, Lateinamerika oder Südostasien. Die Wanderung des Spulwurms durch den menschlichen Körper bleibt nicht ohne Folgen [^{153;155-158}]. Die pulmonale *Ascariasis* (Wanderung in die Lunge) verursacht Husten, Fieber, blutigen Auswurf und asthmaähnliche Anfälle. Es kann hierbei zur Ausbildung eines pulmonalen Infiltrats kommen. Die intestinale Ascariasis verläuft in den meisten Fällen symptomlos, kann aber mit unspezifischen Beschwerden wie Bauchschmerzen einhergehen. Typische Komplikation sind beispielsweise Cholangitis, Leberabszesse, Pankreatitis, Appendizitis und mechanischer Ileus infolge zahlreicher Würmer. Die Larven erzeugen in vielen Fällen leichte bis schwere allergische Reaktionen. Erreicht der Parasit die Lunge, kann es zur Ascaris-Pneumonie kommen (lokal begrenzte Lungenentzündungen mit Husten, Fieber, blutigem Auswurf in Kombination mit asthmaähnlichen Anfällen), was in der Literatur auch als Löffler-Syndrom bezeichnet wird [¹⁵⁹⁻¹⁶²]. Bei schweren Fällen von Ascariasis besteht die Gefahr von Darmkoliken bis hin zu Blockierungen der Bauchspeicheldrüsen- oder Gallengängen durch den adulten Wurm. Im Gegensatz zu vielen anderen intestinalen Parasiten besteht bei *Ascaris lumbricoides* der Verdacht, die Ausbildung von Allergien wie Asthma oder Atopien zu begünstigen [¹⁵¹]. Die Diagnose einer *Ascariasis* erfolgt normalerweise durch eine Stuhluntersuchung, bei der die ca. 80 µm großen Eier nachgewiesen werden können. Während der Invasionsphase ist die Stuhluntersuchung allerdings negativ, genauso wie bei einem Befall mit ausschließlich männlichen Ascariden. Hier bietet sich der serologische Nachweis mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) an. Die adulten Formen können auch alternativ mittels Kontrastaufnahmen des Abdomens nachgewiesen werden. Für die Therapie stehen Breitbandhelminthika wie Mebendazol und Pyrantel zur Verfügung.

3.3.1 Micropräparative Fraktionierung eines Proteinextrakts des Spulwurms *Ascaris lumbricoides*

Aufgrund der Säulendimensionen können die in **Kapitel 2** beschriebenen und getesteten 50 x 1.0 mm ProSwift-Monolithen auch in der ersten Dimension von Proteomanalysen eingesetzt werden, was in diesem Fall am Beispiel eines Proteinextrakts des Spulwurms *Ascaris lumbricoides* demonstriert wird (**Abbildung 94**). Da ein Säuleninnendurchmesser von 1 mm einen guten Kompromiss zwischen Beladbarkeit und Sensitivität einer HPLC-Trennung darstellt, wurden die ProSwift-Monolithen für mikropräparative Fraktionierungen eingesetzt.

Der Spulwurm *Ascaris lumbricoides* enthält mehrere potentielle Allergene wie die Proteine Tropomyosin, das Polyprotein ABA-1 oder auch noch nicht in der Literatur beschriebene Proteine wie zum Beispiel ein durch SDS-PAGE bestimmtes Allergen mit der ungefähren Größe von 34 kDa.

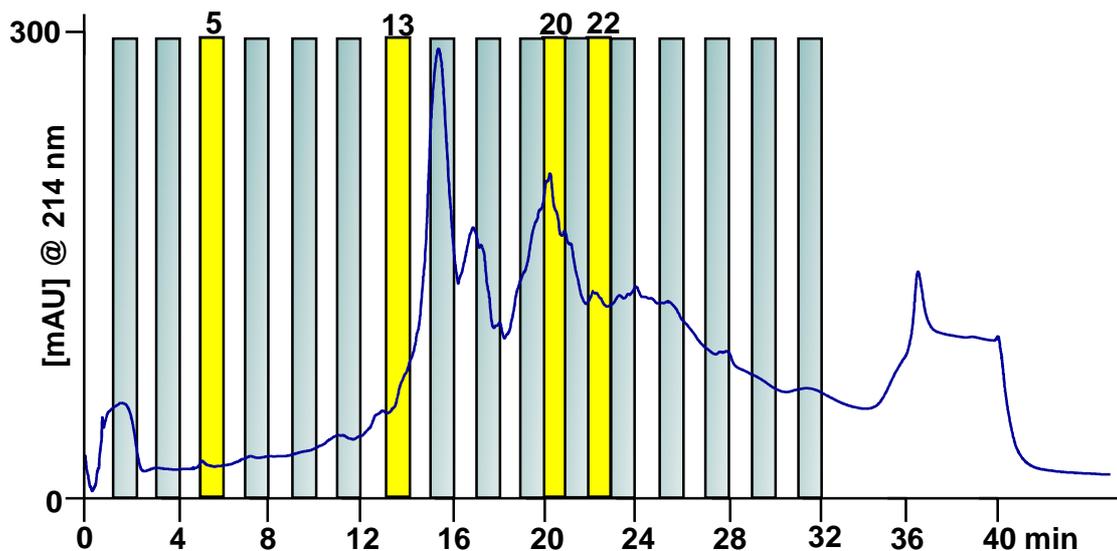


Abbildung 94: Micropräparative Fraktionierung eines Proteinextrakts des Spulwurms *Ascaris lumbricoides*, PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: 0.050% TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 15-60% B in 30 min; 100 µL/min; Injektion von 100 µl Probe (1.45 mg/ml); 20 °C; 30 x 1 min Fraktionen.

Wie **Abbildung 94** zu entnehmen ist, eluieren die Proteine über die gesamte Gradientenzeit. Wie zu erwarten war, sind kaum diskrete Peaks zu erkennen, da es sich um einen komplexen Gesamtproteinextrakt aus *Ascaris lumbricoides* handelt.

Nach der Fraktionierung wurden die einzelnen Fraktionen von *Dr. med. Nathalie Acevedo* durch Immunoblots untersucht, bei denen die Fraktionen 5, 13, 20 und 22 Signale auf dem Immunoblot ergaben. Demnach befinden sich in diesen Fraktionen potentielle Allergene. Hierbei war auffällig, dass die Allergen-Proteine auf spezielle Fraktionen begrenzt sind und nicht über mehrere Fraktionen eluieren, was für die

Trenneffizienz der Monolithen spricht. Somit eignen sich diese Säulen bestens für die Fraktionierung von komplexen Proteinextrakten, beispielsweise in der ersten Dimension einer Proteomanalyse. Ferner konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass der Kompromiss zwischen Beladbarkeit und Massensensitivität der 1.0-mm-Monolithen für schnelle und effiziente Fraktionierungen von komplexen Proteinproben geeignet ist.

3.3.2 Analyse von aufgereinigten Glutathion-S-Transferase-Proben aus *Ascaris lumbricoides*

Bei dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) handelt es sich um ein potentiell allergenes Protein des Nematoden *Ascaris lumbricoides*, welches beim Menschen unter anderem die Entstehung von Krankheitsbildern wie Asthma oder Atopien begünstigen kann. Dabei wurde bereits eine Vielzahl an Allergenen im Spulwurm identifiziert und charakterisiert wie beispielsweise Tropomyosin [163] oder das Polyprotein ABA-1 mitsamt Fragmenten. Glutathion-S-Transferase, ein weiteres Allergen, wurde in der Literatur noch nicht vollständig beschrieben. Eine Möglichkeit zur Charakterisierung von GST besteht darin, es aus dem Gesamtproteinextrakt zu isolieren und dann mittels micro-HPLC-FT-MS auf Verunreinigungen zu untersuchen und die intakte Proteinmasse zu bestimmen. Das Problem liegt hierbei darin, dass das hoch-abundante Protein ABA-1, welches ebenfalls ein Allergen ist, bei der Aufreinigung mit verschleppt wird und bei späteren Immunoblots die Analyse von GST empfindlich stören kann. Bei ABA-1 handelt es sich um ein 150 kDa schweres Polyprotein, dessen Fragmente eine Vielzahl von Massen im Bereich von 10-15 kDa abdecken [164]. Demnach ist eine hohe Reinheit der aufgereinigten Probe von essentieller Wichtigkeit für weitere Studien von GST im Hinblick auf Allergenaktivität und andere Faktoren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden fünf verschiedene aufgereinigte GST-Proben analysiert. Hierbei handelt es sich um affinitätschromatographisch aufgereinigte Proben, die zu jeweils unterschiedlichen Aufreinigungszeiten entnommen wurden. Die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde hierbei von Dr. med. Nathalie Acevedo im Rahmen des Kooperationsprojekts mit der Universität Cartagena (Institut für immunologische Forschung) in Kolumbien durchgeführt. Die aliquotierten Proben wurden hierbei bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Die einzelnen Proben wurden unter folgenden experimentellen Bedingungen analysiert:

- Eluent A: Wasser + 0.050% TFA
- Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA
- Gradient: 20-50% B in 45 min
- HPLC-System: Accela HPLC-System
- Säule: 50 x 1.0 mm ProSwift PS/DVB-Monolith
- Flussrate: 60 $\mu\text{l}/\text{min}$
- Temperatur: 60 $^{\circ}\text{C}$
- $V_{\text{injection}}$: 15 μl
- LTQ Orbitrap XL, Auflösung: 100,000
- Massenbereich: 700-3,500 m/z (high mass range)
- Ionisierung: ESI, positiver Modus
- Tuning: Cytochrom C (m/z= 951), 100 fmol/ μl ??
- Kalibrierung der Massenachse: Calmix
- HCD-Kollisionsgas: aus
- FT-Detektionsverzögerung (FT-Detection Delay): low
- Dekonvolutionsprogramm: Xtract
- Analyse von drei Replikaten pro aufgereinigter Probe

Die theoretische Proteinmasse von GST wurde hierbei aus der auf expasy.org angegebenen Sequenz berechnet aus GST des Schweinespulwurms *Ascaris suum* (**Abbildung 95**), welcher morphologisch von *Ascaris lumbricoides* nicht zu unterscheiden ist. Die theoretischen Massen von GST betragen hierbei **23,454.12 Da** (mittlere Masse) sowie **23,439.35 Da** (monoisotopische Masse).

Sequence **Length** **Mass (Da)** **Tools**

P46436-1 [UniParc]. FASTA 206 23,585 Blast go

Last modified January 23, 2007. Version 3.
Checksum: B8366238A63DF399

```

10      20      30      40      50      60
MPQYKLTYFD IRGLGEGARL IFHQAGVKFE DNRLKREDWP ALKPKTPFGQ LPLLEVDGEV
70      80      90      100     110     120
LAQSAAIYRY LGRQFGLAGK TPMEEAQVDS IFDQFKDFMA ELRPCFRVLA GFEEGDREKV
130     140     150     160     170     180
LKEVAVPARD kHLPLLEKfl aKSGSEYMVG KSVTWADLVI TDSSLASWESL IPDFLSGHLQ
190     200
LkKYIEHVRE LPNIKkWIAE RPKtpy
```

- Chain Glutathione S-transferase 1 at positions 2 - 206 [Theoretical pI: 7.38 / Mw (average mass): 23454.12 / Mw (monoisotopic mass): 23439.35]

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
3441.7940	152-182	0		SVTWADLVIDSLASWESLI PDFLSGHLQLK
2587.3766	46-69	0		TPFGQLPILLEVDGEVLAQSA AIYR
1884.8684	81-96	0		TPMEEAQVDSIFDQFK
1384.6500	97-107	0		DFMAELRPCFR
1083.5833	37-45	0		EDWPALKPK
1064.5258	108-117	0		VLGFEEGDK
1012.5938	20-28	0		LIFHQAGVK
957.4346	143-151	0		SGSEYMVGK
927.4934	6-12	0		LTYFDIR
899.5097	197-203	0		WIAERPK
849.5192	132-138	0		HLPLLEK
816.4362	184-189	0		YIEHVR
741.4253	123-129	0		EVAVPAR
720.4039	74-80	0		QFGLAGK
713.4192	190-195	0		ELPNIK
680.2998	29-33	0		FEDNR
659.3471	13-19	0		GLGEGAR
535.2875	2-5	0		PQYK
508.2878	70-73	0		YLGR

90.7% of sequence covered (you may modify the input parameters to display also peptides < 500 Da or > 10000000000 Da):

```

10      20      30      40      50      60
PQYKLTYFD IRGLGEGARL IFHQAGVKFE DNRLkrEDWP ALKPKTPFGQ LPLLEVDGEV
70      80      90      100     110     120
LAQSAAIYRY LGRQFGLAGK TPMEEAQVDS IFDQFKDFMA ELRPCFRVLA GFEEGDREKV
130     140     150     160     170     180
lkEVAVPARd kHLPLLEKfl aKSGSEYMVG KSVTWADLVI TDSSLASWESL IPDFLSGHLQ
190     200
LkYIEHVRE LPNIKkWIAE RPKtpy
```

Abbildung 95: Theoretische Masse von Glutathion-S-Transferase des Spulwurms *Ascaris suum* (Schweinespulwurm).

Identifizierung von Glutathion-S-Transferase aus *Ascaris lumbricoides*

Zur Identifizierung von GST aus *Ascaris lumbricoides* wurden die mittels micro-HPLC-FT-MS-Analysen bestimmten intakten Proteinmassen der Realproben mit der theoretischen Masse von GST aus dem nahezu identischen Organismus *Ascaris suum* (Schweinespulwurm) verglichen, da das GST aus *Ascaris lumbricoides* noch nicht in der aktuellen Literatur beschrieben wurde.

Tabelle 49: Übersicht über die monoisotopischen und mittleren Massen der aufgereinigten GST-Proben aus *Ascaris lumbricoides*.

Analyselauf	Probe	Mittlere Masse [Da]	Massenabweichung [ppm]	Monoisotopische Masse [Da]	Massenabweichung [ppm]
1	E1-1	23,455.32	51.2	23,439.18	-7.3
2		23,455.33	51.6	23,439.24	-4.7
3		23,455.31	50.7	23,438.26	-46.5
1	E1-2	23,414.25*	-1,700*	23,399.09*	-1,717*
2		23,453.29	-35.4	23,439.31	-1.7
3 (keine Probe injiziert)		/	/	/	/
1	E1-3	23,453.34	-33.3	23,439.33	-0.85
2		23,453.33	-33.7	23,439.24	-4.7
3		23,453.33	-33.7	23,439.24	-4.7
1	E2	23,453.32	-34.1	23,438.30	-44.8
2		23,453.30	-35.0	23,438.18	-49.9
3		23,454.31	8.1	23,439.23	-5.1
1	E3	23,453,31	-34.5	23,439.27	-3.4
2		23,456,29	92.5	23,441.25	81.1
3		23,453,32	-34.1	23,438.44	38.8

*kein GST in der Probe gefunden; die oben angegebene Masse ist die signalintensivste Masse, die bei der Analyse gefunden wurde.

Wie in **Tabelle 49** aufgelistet, betragen die Abweichungen der monoisotopischen Proteinmassen generell weniger als 5 ppm, was für eine sehr gute Massengenauigkeit spricht. Dies impliziert, dass GST aus *Ascaris lumbricoides* und *Ascaris suum* sehr ähnliche, wenn nicht sogar identische Sequenzen besitzen.

Die Abweichungen der mittleren Massen bis auf wenige Ausnahmen lagen in einem Bereich von 8-35 ppm. Im Fall von Probe E1-3 konnte GST mit einer Abweichung von lediglich -0.89 ppm detektiert werden. Wie **Abbildung 96** zu entnehmen ist, wurden in allen analysierten GST-Proben ähnliche Chromatogramme erhalten. Im Zeitfenster von 0 bis 25 konnten keine Proteine oder Verunreinigungen detektiert werden. GST eluierte in allen Proben bei einer Retentionszeit von ca 35 min.

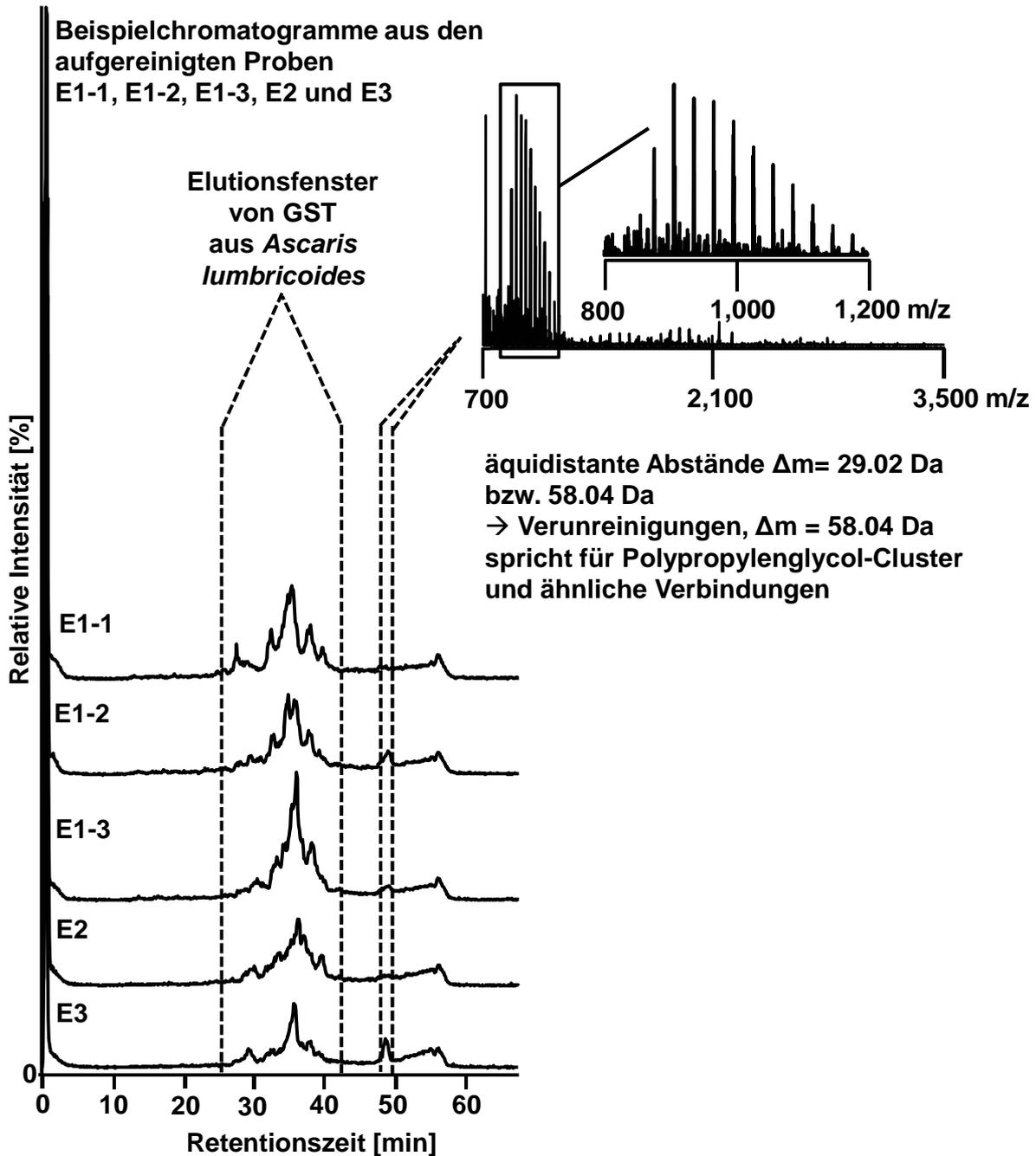


Abbildung 96: Beispielchromatogramme vom allen analysierten GST-Probe. Säule: PS-DVB-Monolith "ProSwift", 50 x 1.0 mm I.D.; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 20-50% B in 45 min; 60 μ l/min; Injektion von 15 μ l Probe (100 ng/ μ l); 60 °C; ESI (positiver Modus), Massenbereich 700-3,500 m/z, LTQ Orbitrap XL; Auflösung 100,000.

Man erkennt deutlich die Inhomogenität der Proben, da es sich nicht um einen einzigen Peak handelt, sondern dass der Hauptpeak über mehrere Minuten mit mehreren Nebenpeaks eluiert. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Signalintensität von GST von Probe E1-1 zu E1-3 zunimmt und danach über E2 zu E3 wieder absinkt. Dies zeigt, dass die Proben zu unterschiedlichen Elutionszeiten entnommen wurden. Die höchste Signalintensität für GST wurde in Probe E1-3 gefunden. Die Spektreninterpretation wird beispielhaft an einer Analyse von Probe E1-3 gezeigt

(Abbildung 97). Prinzipiell beinhalteten alle Proben ähnliche Proteinsignale mit lediglich unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen. Bei einer Retentionszeit von ca. 48 min sind in allen Proben kleine Peaks zu erkennen, die allerdings keine Proteinsignale beinhalten, sondern charakteristische Signalmuster, die für Cluster sprechen, die beispielsweise von den Eluten, Eluentadditiven oder anderen Quellen kommen können.

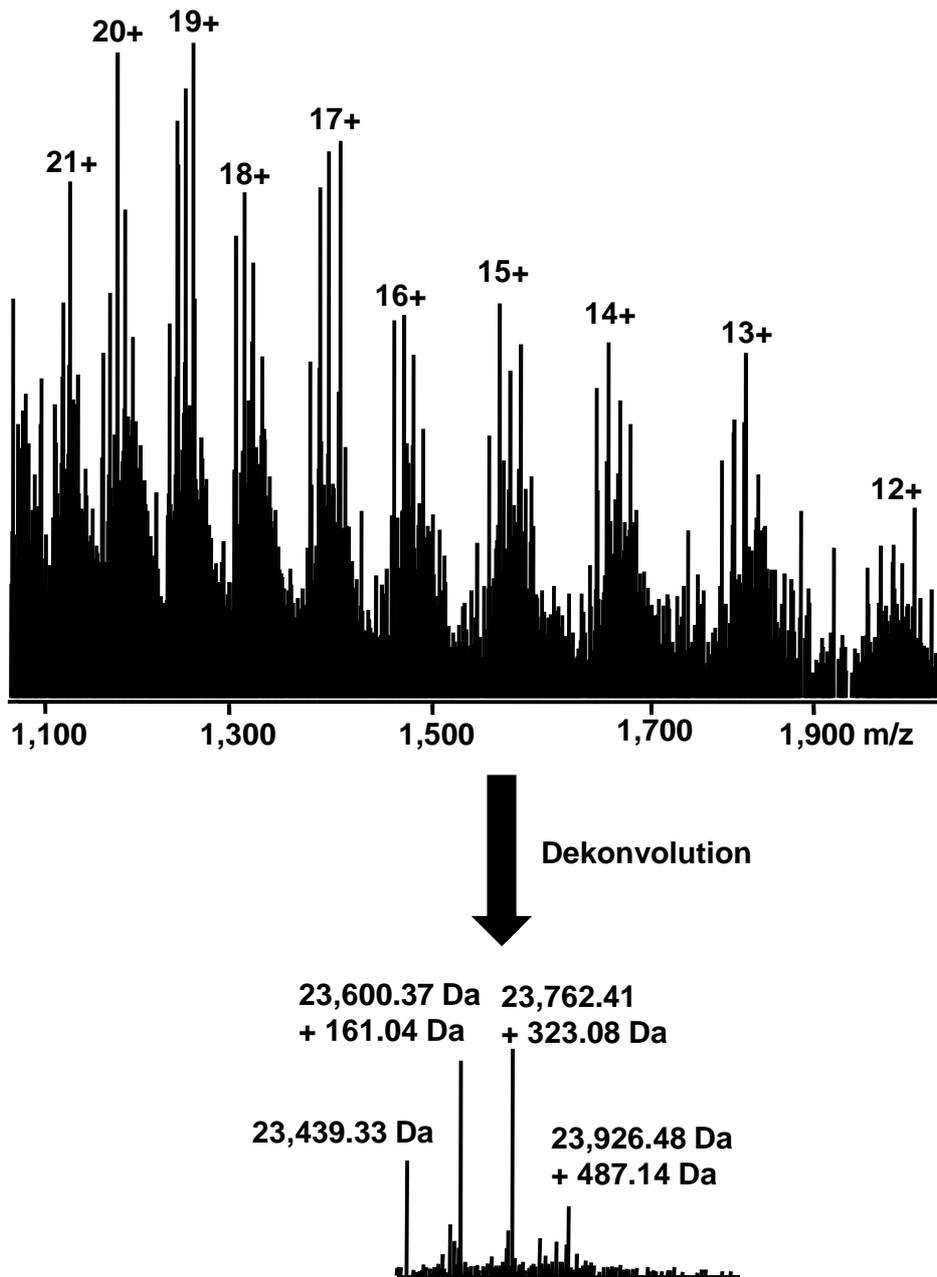


Abbildung 97: Spektrum und dekonvoluiertes Proteinspektrum mit intakten monoisotopischen Massen von Probe E1-3.

Nach näherer Analyse und Aufsummieren der Peaks zeigte sich, dass GST pro Ladungszustand mehrere Signale aufwies. Dies wird in **Abbildung 97** exemplarisch an der Analyse der Probe E1-3 gezeigt. Nach der Dekonvolution des Spektrums ergaben sich vier verschiedene Proteinmassen:

23,439.33 Da, 23,600.37 Da, 23,762.41 Da sowie 23,926.48 Da. Die Differenzen betragen hierbei ausgehend von der kleinsten Masse 23,439.33 Da: 161.04 Da, 323.08 Da sowie 487.14 Da (**Tabelle 50**). Zieht man posttranslationale Modifikationen in Betracht, so entspricht eine Differenz von 161.04 Da einer Hexosamin-Glycosylierung (theoretischer Wert: 161.07 Da). Eine Massendifferenz von 323.08 könnte dabei einer Hexosamin- (theoretische Massendifferenz 161.07 Da) und einer Hexose-Glycosylierung (theoretische Massendifferenz 162.05 Da) entsprechen. Für das vierte Proteinsignal (Massendifferenz 487.15 Da) kommt keine weitere Glycosylierung in Frage.

Alternativ hierzu kann es sich auch um vier Isoformen des GST-Proteins handeln.

Da Immunoblots mit entsprechender Zuckerdetektion keine positiven Ergebnisse lieferten (durchgeführt von Dr. med. Nathalie Acevedo), ist die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit von Isoformen größer. Doch dies muss in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Tabelle 50: Intakte dekonvolutierte Proteinmassen der Probe E1-3 inklusive Massenshifts und möglicher PTMs.

Monoisotopic mass [Da]	Massenshift (monoisotopisch) [Da]	Theoretischer Massenshift (monoisotopisch) [Da]	Kommentare
23,439.33	/	/	unglycosyliert
23,600.37	161.04	161.07 = Hexosamine (GalN, GlcN)	1 x Glycosylierung
23,762.41	323.08 = 161.04 + 162.04	162.05 = Hexosen (Fru, Gal, Glc, Man)	2 x Glycosylierung
23,926.48	487.15 = 161.04 + 162.04 + 164.07	Hexosamin + Hexose + ???	2 x Glycosylierung + ???

Reinheit der Glutathion-S-Transferase-Proben

Vergleicht man alle Proben von E1-1 bis zu E3, so ist in allen Proben hauptsächlich GST vorhanden, was für eine relativ hohe Probenreinheit spricht.

Zusätzlich wurden neben der Hauptkomponente auch Proteine im Bereich von 10-12 kDa in allen Proben detektiert, allerdings mit sehr geringer Intensität verglichen mit GST. Darüber hinaus konnten auch Proteine in einem Massenbereich von 29-50 kDa gefunden werden (**Tabelle 51**). Die Proteine eluierten alle im selben Elutionsfenster wie GST. Sonst konnten keine weiteren Proteine vor oder nach der Elution von GST detektiert werden. Die dabei detektierten Proteine im Bereich von 10-12 kDa könnten ABA-1-Fragmente sein, die in *Ascaris lumbricoides* hoch abundant sind. Hierbei ist die Unterscheidung zwischen Proteinsignal und Dekonvolutionsartefakt als äußerst schwierig einzustufen, da es sich um äußerst komplexe Proteinspektren handelt. Was allerdings auffällig ist, ist die Tatsache, dass das Verhältnis von den 10-12 kDa Proteinen zu GST in allen Proben unterschiedlich ist, was für die Anwesenheit echter Proteinsignale spricht.

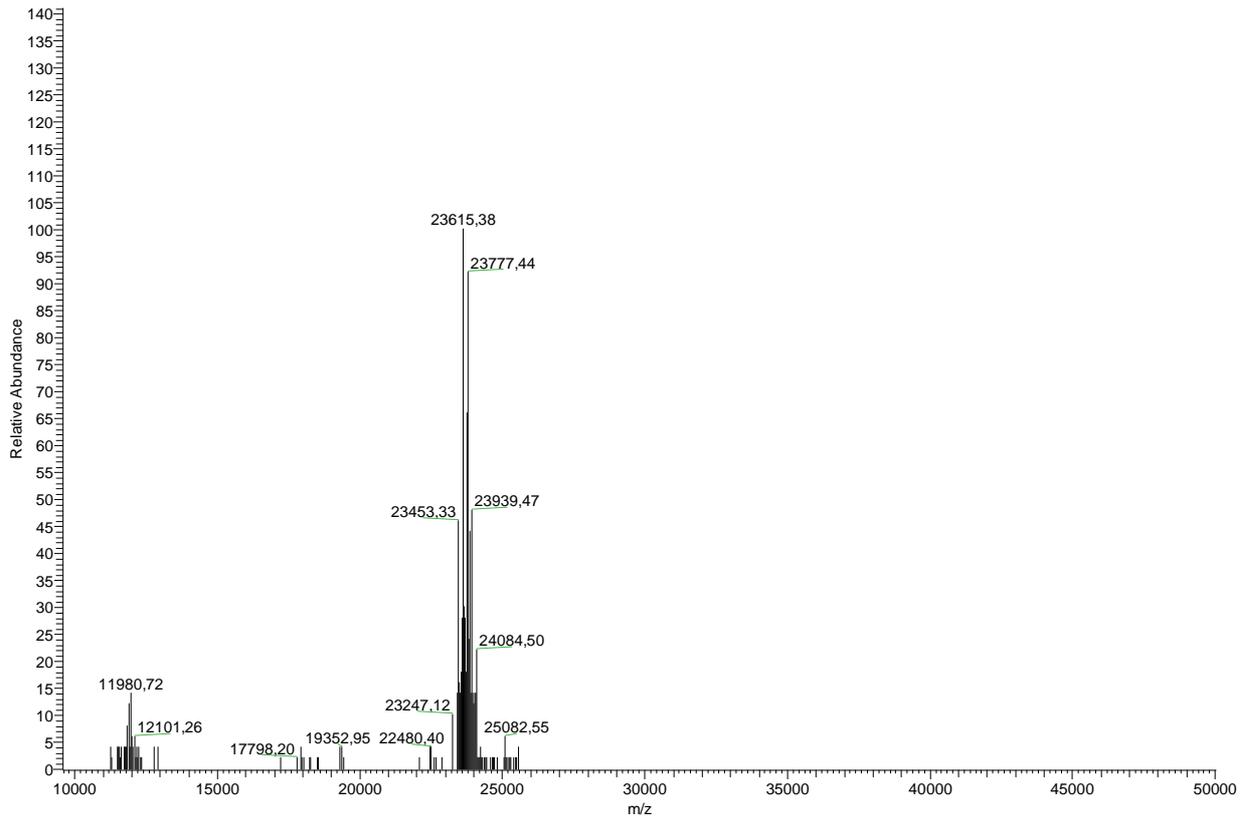
Dies wird in **Abbildung 98** am Beispiel der Proben E1-3 und E3 verdeutlicht. Während bei Probe E1-3 das Verhältnis der Signalintensitäten von GST zu den Verunreinigungen ungefähr 8:1 betrug, so war das Verhältnis in Probe E3 nur noch 2.5:1. Darüber hinaus sind in Probe E3 noch Proteinmassen im Bereich von 29 bis 44 kDa erkennbar. Die darüber hinaus in anderen Proben detektierten Proteine im Bereich von 29-50 kDa sind nur in wenigen Proben zu finden, beispielsweise in Probe E3. Auch hier ist die Unterscheidung zwischen Dekonvolutionsartefakten und echten Proteinsignalen schwierig, da kein Spektrum als Beweis für die Existenz der Proteine vorliegt. Insbesondere große Proteinmassen im Bereich von 40 bis 50 kDa sind hierbei als äußerst unsicher zu bezeichnen, da das Programm Xtract nur hochaufgelöste Proteinspektren zur Dekonvolution verwenden kann. Die Orbitrap selbst kann nach Herstellerangaben Proteine bis maximal 50 kDa isotopenaufgelöst darstellen, weswegen Proteine im Grenzbereich von 40 bis 50 kDa meistens nur äußerst unsichere dekonvolutierte Proteinmassen liefern.

Tabelle 51: Detektierte Proteinmassen (Mittlere und monoisotopische Massen).

Probe	Proteinmassen im Bereich von 29-50 kDa (monoisotopische Massen)	Proteinmassen im Bereich von 29-50 kDa (Mittlere Massen)
E1-1 (Lauf 1)	/	/
E1-1 (Lauf 2)	29,957.69 (++) 49,175.19 (+) 39,350.07 (--) 41,460.28 (--)	29,974.63 (++) 49,205.16. (+) / /
E1-1 (Lauf 3)	28,934.94 (--) 41,114.44 (--)	/
E1-2 (Lauf 1)	31,487.59 (--) 41,709.82 (--)	/
E1-2 (Lauf 2)	29,719.39 (--) 41,047.48 (--) 49,059.82 (--)	/
E1-2 (Lauf 3)	/	/
E1-3 (Lauf 1)	29,547.24 (--) 41,047.48 (--) 36,175.61 (--) 40,968.55 (--) 47,318.90 (--)	/
E1-3 (Lauf 2)	35,192.29 (--) 37,818.03 (--)	/
E1-3 (Lauf 3)	36,492.47 (--) 37,953.34 (--)	/
E2 (Lauf 1)	41,059.55 (--)	/
E2 (Lauf 2)	33,805.54 (--) 37,576.49 (--)	/
E2 (Lauf 3)	36,177.76 (--) 30,134.10 (--) 31,221.54 (--)	/
E3 (Lauf 1)	27,816.82 (++) 29,997.33 (++) 32,099.37 (++) 36,354.41 (++) 38,481.96 (++) 40,698.34 (++)	27,832.08 (++) 30,014.23 (++) 32,120.01 (++) 36,374.67 (++) 38,505.53 (++) 40,721.64 (++)
E3 (Lauf 2)	/	/
E3 (Lauf 3)	29,960.48 (-) 32,085.58 (-) 33,919.86 (-) 44,879.66 (-)	29,978.14 (-) 32,104.37 (-) 33,936.90 (-) 44.906.91 (-)

(Relative Intensität verglichen mit GST: ++ sehr hoch, + hoch, - niedrig, -- sehr niedrig)

2009_12_08_ProbenNathalie_mAB_papVerdau_mAB_IT32_XT_00001_M_#1 RT: 1,00 AV: 1 NL: 5,00E1
T: FTMS + p ESI Full ms [700,00-3500,00]



2009_12_08_ProbenNathalie_mAB_papVerdau_mAB_IT39_XT_00001_M_#1 RT: 1,00 AV: 1 NL: 6,40E1
T: FTMS + p ESI Full ms [700,00-3500,00]

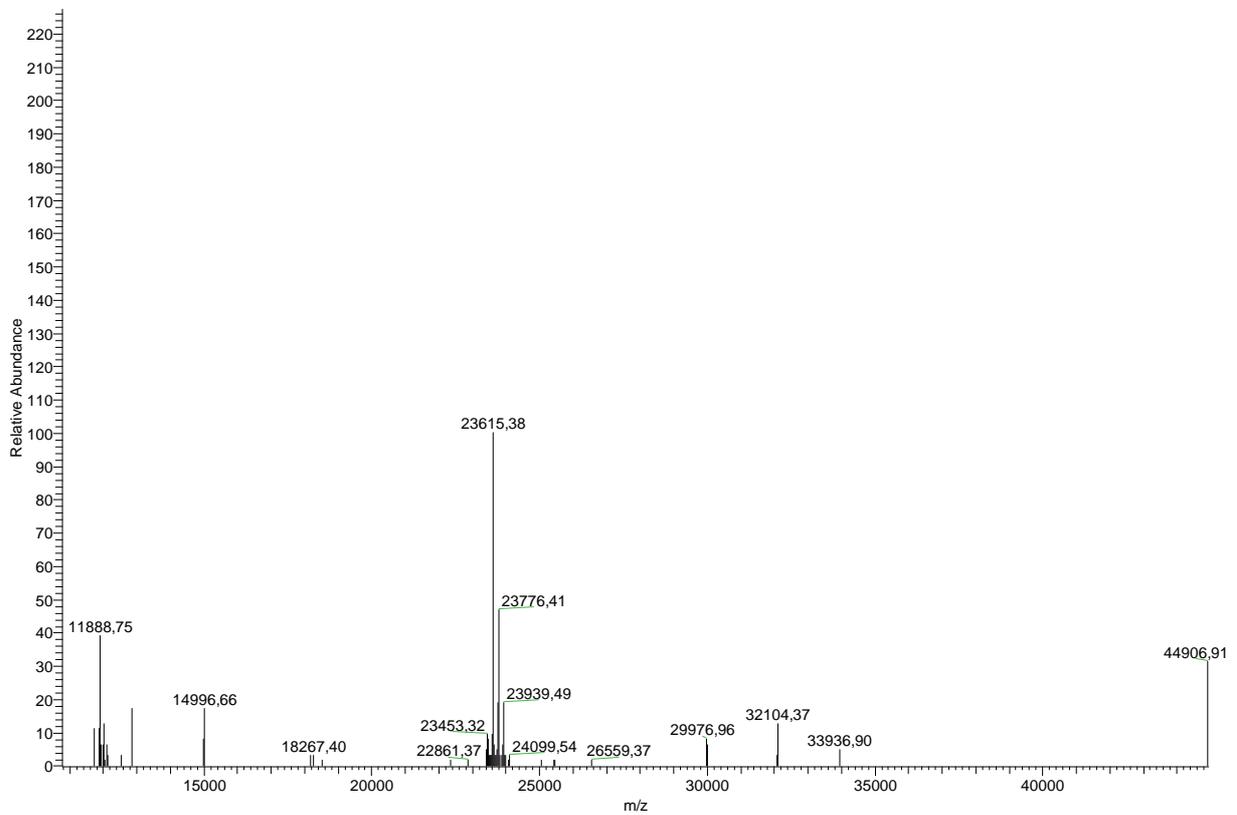


Abbildung 98: Dekonvolutierte Proteinspektren. (a) Probe E1-3, (b): Probe E3.

Zusammenfassung

- GST konnte in jeder aufgereinigten Probe mit hoher Massengenauigkeit (bis auf wenige Ausnahmen) < 5 ppm nachgewiesen werden. Die Proteinmassen von GST aus *Ascaris lumbricoides* korrelieren hierbei sehr gut mit den Proteinmassen von *Ascaris suum*, weswegen davon auszugehen ist, dass GST aus *Ascaris suum* und *Ascaris lumbricoides* ähnliche oder sogar identische Sequenzen besitzen können. Dies muss allerdings in weiteren Experimenten untersucht werden.
- Die Hauptverunreinigungen in jeder Probe bestehen aus Proteinen im Bereich von 10-12 kDa. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ABA-1-Fragmente handeln könnte.
- In Probe E3 konnten auch andere Proteinmassen im Bereich von 15-40 kDa detektiert werden. Ob es sich hierbei lediglich um Dekonvolutionsartefakte oder um reale Proteine handelt, kann aufgrund der hohen Spektrenkomplexität nicht mit Sicherheit beantwortet werden.
- Nach Auswertung der chromatographischen und massenspektrometrischen Daten kann der Reinheitsgrad aller getesteten Proben als hoch eingestuft werden. Die einzige Ausnahme ist hierbei Probe E3, bei der das Verhältnis von GST zu den Verunreinigungen am geringsten war. Dies hängt damit zusammen, dass es sich bei Probe E3 um die letzte Probe handelte, bei der GST in der geringsten Konzentration vorlag.
- Aufgrund der Tatsache, dass in allen Proben GST mit mehreren Signalen pro Ladungszustand detektiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es mehrere Isoformen bzw. PTMs von GST gibt. Aufgrund der charakteristischen Massendifferenzen von 161 bzw. 162 Da könnte es sich bei den GST-Proben um mehrfach glycosylierte Formen von GST handeln. Dies wurde allerdings in weiteren Experimenten mit Glycan-basierten Immunoblots nicht bestätigt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich um GST-Isoformen handeln könnte. Dies muss in weiteren Experimenten allerdings noch bestätigt werden, beispielsweise durch Verdau der entsprechenden GST-Proben, micro-HPLC-MS/MS-Experimenten und darauffolgender de-novo-Sequenzierung.

3.3.3 Analyse des Gesamtproteinextrakts aus *Ascaris lumbricoides* mittels micro-HPLC-ToF-MS und Vergleich der GST-Massen

Nachdem in diesem Kapitel die Analyse eines einzelnen Protein aus dem Proteinextrakt beschrieben wurde sowie ein generelles Allergenscreening mittels RP-HPLC in Kombination mit Immunoblots, wird an dieser Stelle ein Proteinscreening aus dem gesamten Proteinextrakt beschrieben. Um einen generellen Überblick über die Probenkomplexität und Art sowie Menge der Proteine im Extrakt zu bekommen, wurde der Proteinextrakt mittels micro-HPLC-ToF-MS analysiert. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Detektion von Glutathion-S-Transferase. Die mittels ToF-MS ermittelte Proteinmasse konnte dann mit der in **Kapitel 3.3.2** bestimmten Masse von Glutathion-S-Transferase mittels Orbitrap verglichen werden. Ferner erlaubt die eindimensionale Analyse des *Ascaris*-Extrakts ein Protein-Screening und ggf. die Identifizierung weiterer Proteine aus dem Gesamtextrakt.

Wie **Abbildung 99** zu entnehmen ist, eluieren die Proteine des *Ascaris*-Extrakts über einen Zeitraum von 45 min, was die Komplexität der Probe verdeutlicht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte hierbei manuell. Um die Probe on-line zu entsalzen und eine Aufkonzentrierung der Proteine zu erreichen, wurde das in **Abschnitt 3.2.1** diskutierte Trapsäulen-System verwendet. Darüber hinaus lag der Schwerpunkt dieser Analyse auch auf GST und der Diskussion, ob es möglich ist, GST aus dem gesamten Proteinextrakt mittels eindimensionalen μ HPLC-ToF-MS-Experimenten identifizieren zu können.

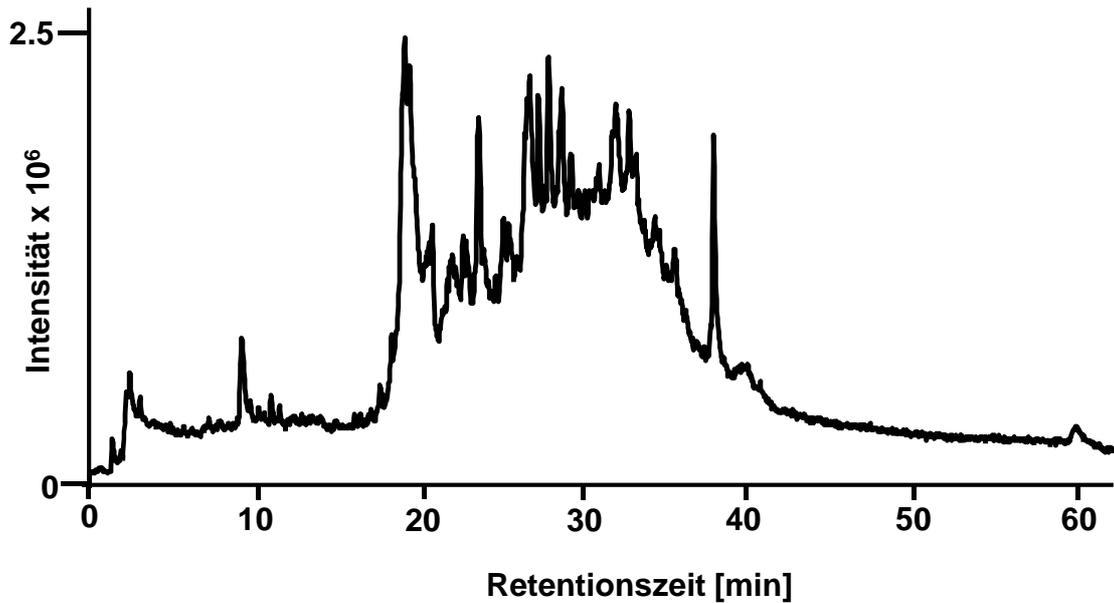


Abbildung 99: micro-HPLC-ToF-MS eines Proteinextrakts aus *Ascaris lumbricoides* (RTICC). Säulen: 200 x 0.1 mm PS/DVB-Monolith mit erhöhtem Anteil an THF, Trapsäule: 10 x 0.2 mm PS/DVB-Monolith mit erhöhtem THF-Anteil; Eluent A: Wasser + 0.050% TFA, Eluent B: Acetonitril + 0.050% TFA; 5-60% B in 60 min; 1.0 μ l/min; Beladung der Trapsäule: 3 min mit 0.10% wässriger Heptafluorbuttersäure; 55 $^{\circ}$ C; Injektion von 6.05 μ g Proteinextrakt; ESI (positiver Modus), Massenbereich 300-4,000 m/z, Bruker MicroTOF.

Wie aus den **Tabellen 52 bis 56** hervorgeht, konnte eine Vielzahl von Proteinen im *Ascaris*-Extrakt gefunden werden. Was sich hierbei äußerst schwierig gestaltete, ist die Zuordnung und Identifizierung der Proteine. Bei den meisten Proteinen in dem Extrakt dürfte es sich um Fragmente des hochabundanten Polyproteins ABA-1 handeln, das charakteristische Fragmente im Bereich bis 14 kDa liefert. Was jedoch eindeutig identifiziert werden konnte, ist Glutathion-S-Transferase. Dieses Protein eluierte bei einer Retentionszeit von 33 min und konnte mit akzeptabler Spektrenqualität dargestellt werden (**Abbildung 100**):

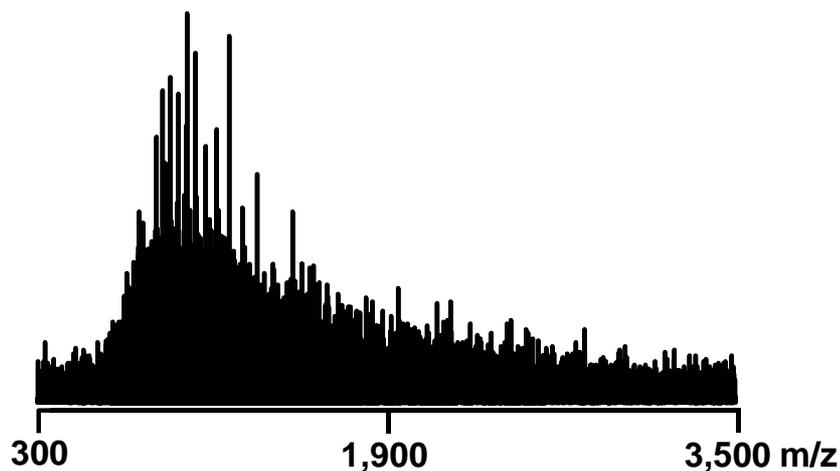


Abbildung 100: Spektrum von Glutathion-S-Transferase, Aufsummierung: 33.0-33.2 min.

Tabelle 52: Gefundene Proteinmassen im Extrakt aus *Ascaris lumbricoides*, Teil 1/5.

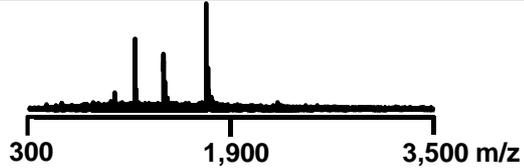
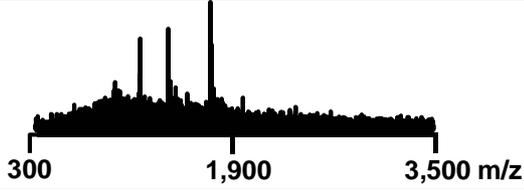
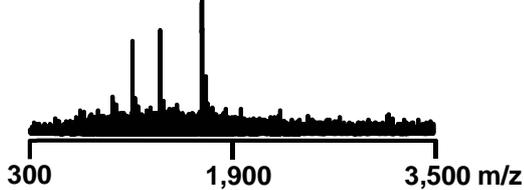
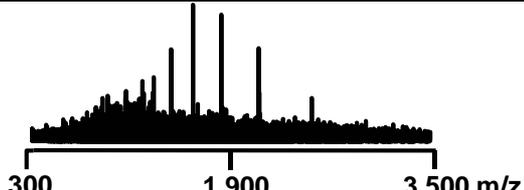
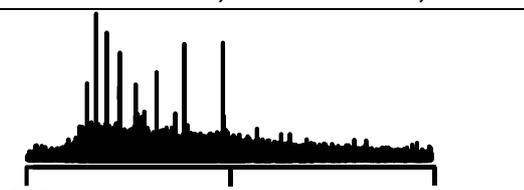
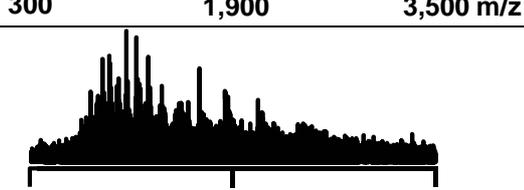
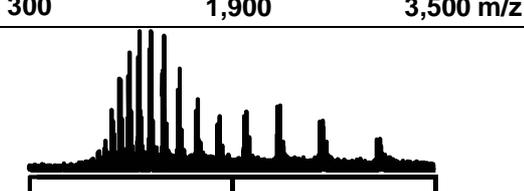
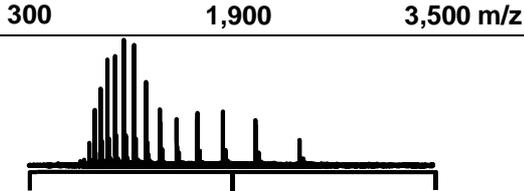
Retentionszeit [min]	Gefundene Massen [Da]	Spektren
8.6-9.6	6,786.4 6,849.7	
10.1-10.8	6,820.6	
10.9-11.1	6,626.7 6,756.8	
17.3-17.8	12,718.30	
18.0-18.3	9,222.4 9,385.4	
18.4-18.7	9,222.9 14,653.4 14,824.8	
18.8-19.0	14,669.4 14,709.2 14,797.7 14,831.3 14,872.5 14,959.4	
19.1-19.2	14,639.2 14,800.9	

Tabelle 53: Gefundene Proteinmassen im Extrakt aus *Ascaris lumbricoides*, Teil 2/5.

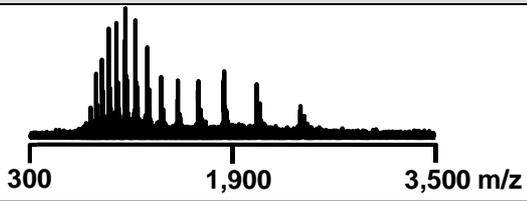
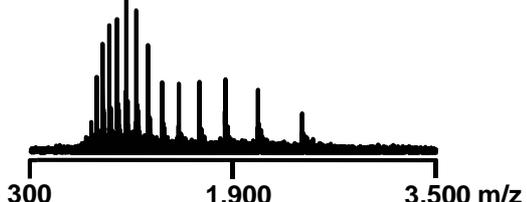
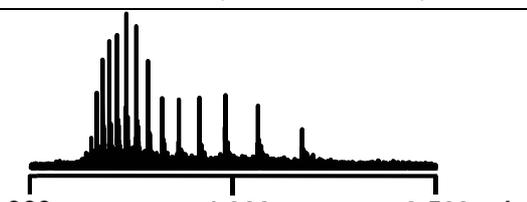
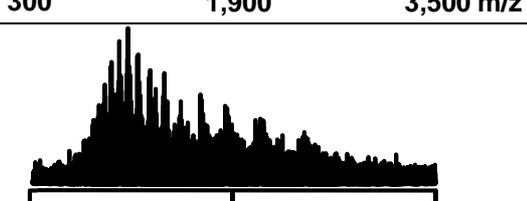
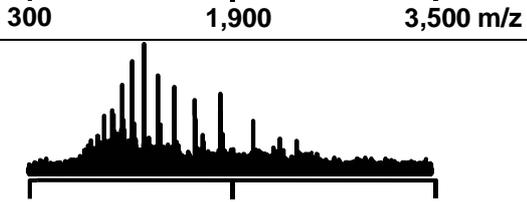
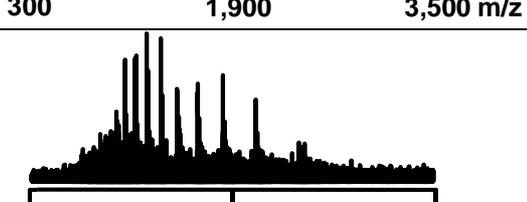
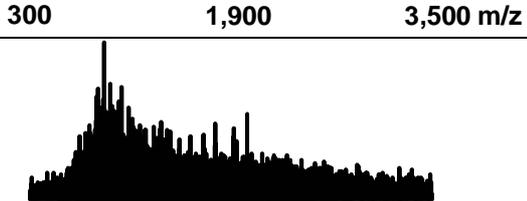
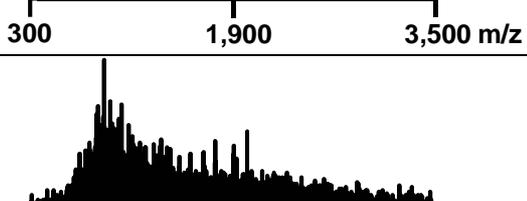
Retentionszeit [min]	Gefundene Massen [Da]	Spektren
19.4-19.5	14,660.0 14,826.2	
19.5-19.6	14,659.8	
19.6-19.9	8,573.9 14,739.9	
19.9-20.2	14,737.0	
20.3-20.4	13,461.0 14,571.1 14,732.9 14,836.1	
20.4-20.6	13,461.6 14,572.7 14,684.2 14,846.0	
20.6-20.9	13,461.7 14,684.4	
21.5-21.7	14,276.9 (Major Sperm Protein Isoform beta ?)	

Tabelle 54: Gefundene Proteinmassen im Extrakt aus *Ascaris lumbricoides*, Teil 3/5.

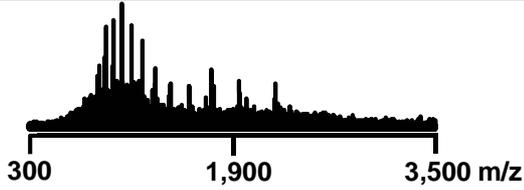
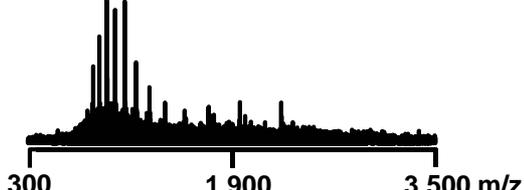
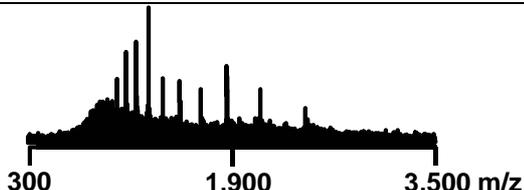
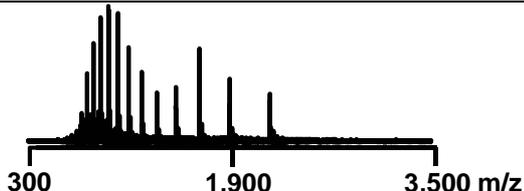
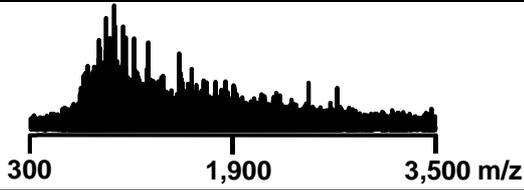
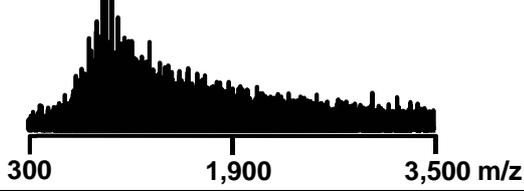
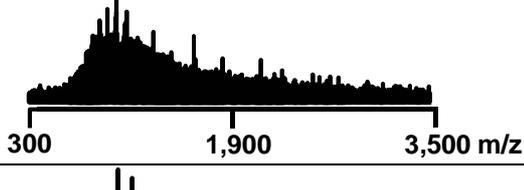
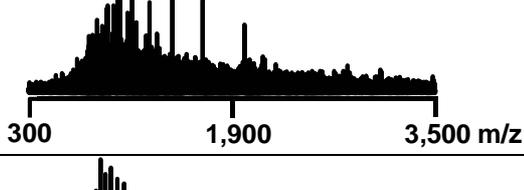
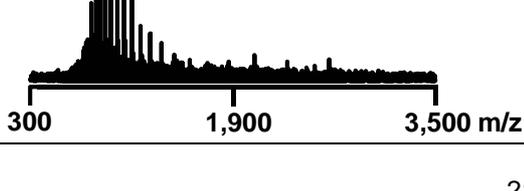
Retentionszeit [min]	Gefundene Massen [Da]	Spektren
21.9-22.3	13,729.6 14,157.3 15,723.8 15,885.4	
22.5-22.8	12,298.7 13,732.6 15,020.5 () 16,029.4	
22.8-23.1	13,370.1 14,857.3	
23.4-23.8	13,353.6	
23.9-24.3	13,353.4	
24.5-24.8	19,995.7	
24.8-25.2	12,904.2	
25.4-25.6	9,979.8 18,272.9	
26.3-26.4	18,611.7	

Tabelle 55: Gefundene Proteinmassen im Extrakt aus *Ascaris lumbricoides*, Teil 4/5.

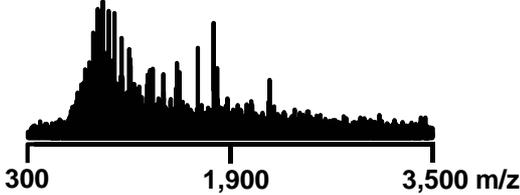
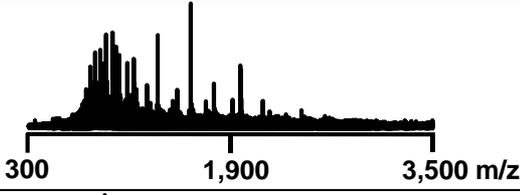
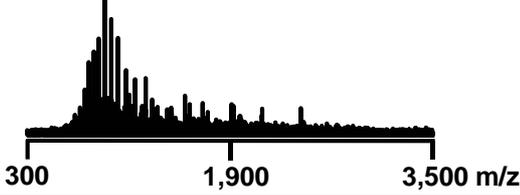
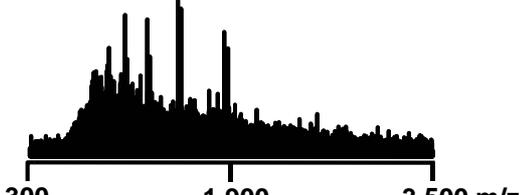
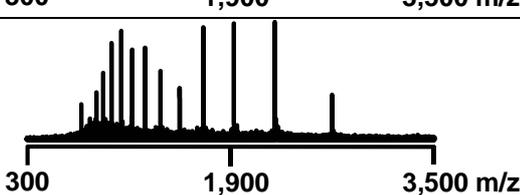
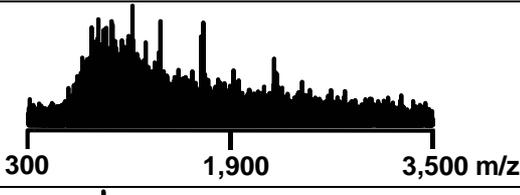
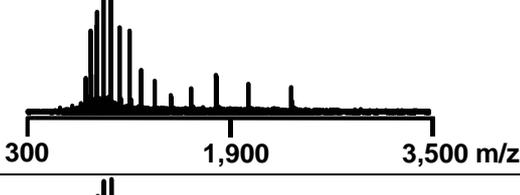
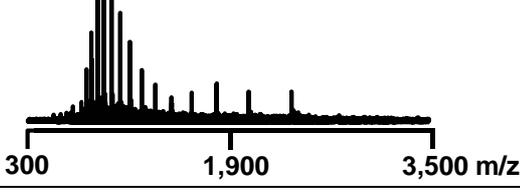
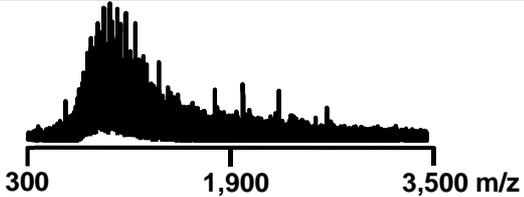
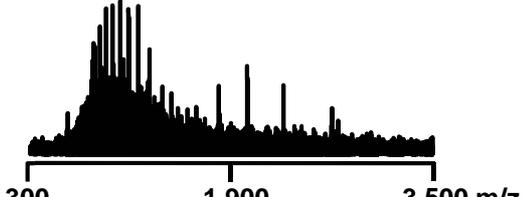
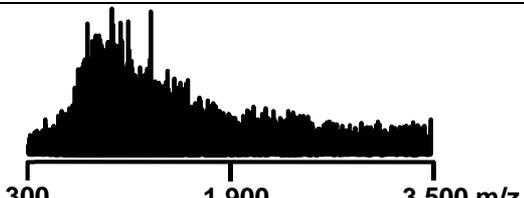
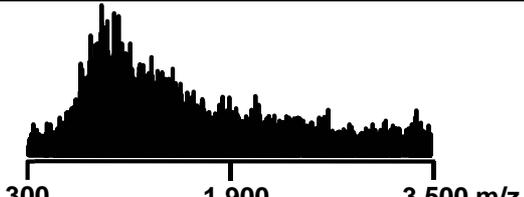
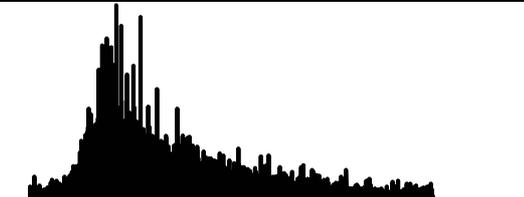
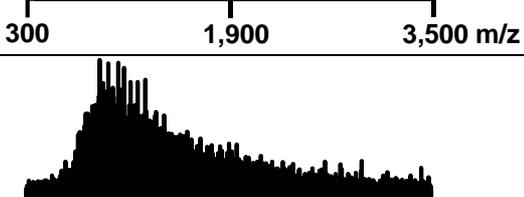
Retentionszeit [min]	Gefundene Massen [Da]	Spektren
26.4-26.5	16,387.9 17,597.5 18,611.9	
26.5-26.7	8,823.8 17,207.1 17,35.7 17,368.9	
26.7-26.8	7,894.9 17,206.6	
26.9-27.0	7,159.3 7,359.6 7,489.0 17,209.3	
27.1-27.3	13,330.5 13,458.4 13,620.0	
27.5-27.6	6,717.4 13,459.3	
27.8	14,410.6	
27.9-28.1	14,410.1 14,508.3 14,572.7 (Myoglobin?)	

Tabelle 56: Gefundene Proteinmassen im Extrakt aus *Ascaris lumbricoides*, Teil 5/5.

Retentionszeit [min]	Gefundene Massen [Da]	Spektren
28.2-28.9	14,507.8 16,167.7 26,931.2 32,337.6 39,600.2 (Tropomyosin?)	
28.4-28.5	16,167.4 26,932.4	
29.1	24,029.7	
29.3-29.5	16,567.3	
33.0-33.2	23,452.4 Glutathion-S-Transferase	
33.3-33.7	23,530.0	

Die intakte Masse von GST (Retentionszeit 33 min) wurde hierbei mittels ToF bestimmt und betrug 23,452.4 Da. Die Masse weicht dabei um 1.7 Da von der Masse von GST aus *Ascaris suum* ab, was -72.5 ppm entspricht. In der Orbitrap betrug die intakte mittlere Masse von GST 23,454.31 Da, was einer Massenabweichung von 8.1 ppm entspricht. Im Vergleich zu den aufgereinigten Proteinproben konnte im Gesamtextrakt keine eindeutigen Hinweise für PTMs oder Isoformen gefunden

werden, abgesehen von einem Protein, das kurz nach GST eluierte mit einer Retentionszeit von 33.3 min. Was die restlichen Proteine im Gesamtextrakt angeht, so könnte es sich bei den meisten Proteinen im Bereich von 10 bis 15 kDa um Fragmente des hochabundanten Polyproteins ABA-1 handeln. Andere Proteine wie z.B. Tropomyosin (~ 40 Da [¹⁶³]) sind nur sehr schwer zu identifizieren. So könnte es sich bei dem Protein mit einer Masse von 39,600.2 Da, welches bei einer Retentionszeit von 28 min eluiert, um Tropomyosin handeln. Insgesamt lieferte die eindimensionale Analyse des Gesamtextrakts von *Ascaris lumbricoides* trotzdem eine wichtige Übersicht über die Proteinmassen des Extrakts. Auffällig ist die Tatsache, dass kaum Proteine mit einem größeren Molekulargewicht wie 40 kDa detektiert werden konnten. Dies kann beispielsweise mit dem Tuning des Flugzeit-Massenspektrometers zusammenhängen, das hauptsächlich für Proteine bis 40 kDa optimiert wurde. Weiterhin ist die Proteinidentifizierung dadurch erschwert, dass von *Ascaris lumbricoides* nur sehr wenige Proteine ausreichend charakterisiert sind, so dass meistens ähnliche Gattungen wie der Schweinespulwurm *Ascaris suum* als Referenz benutzt werden müssen. Nichtsdestotrotz konnte GST aus dem Gesamtproteinextrakt von *Ascaris lumbricoides* identifiziert werden. Hierbei konnte die mittels micro-HPLC-FT-MS bestimmte intakte Proteinmasse aus aufgereinigten GST-Proben aus *Ascaris lumbricoides* als Referenz verwendet werden.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Analyse von intakten Proteinen mittels Orbitrap-Massenanalysator mit hoher Nachweisstärke und Massengenauigkeit möglich ist. Dabei wurden Proteine in einem Massenbereich von 6 bis 150 kDa untersucht, der Proteine von Insulin bis hin zu monoklonalen Antikörpern umfasst. Mit Hilfe des hohen Auflösungsvermögens der Orbitrap (bis 100,000) war es möglich, selbst mittelgroße Proteine wie Carboanhydrase (29 kDa) isotopenaufgelöst darzustellen.

Durch Verwendung der 50 x 1.0 mm ProSwift-Monolithen konnten effiziente und sensitive micro-HPLC-FT-MS-Analysen realisiert werden: Die Nachweisgrenzen der Proteine lagen im Bereich von 400 bis 2 fmol. Die besten Nachweisgrenzen (2 fmol) konnten hierbei für den monoklonalen Antikörper Bet v 1 5.1 bestimmt werden. Andere Proteine wie Lysozym (7 fmol) lieferten ähnlich gute Werte. Generell konnte kein Trend festgestellt werden, ob die Messungen in der Orbitrap oder der linearen Ionenfalle (LTQ) sensitiver waren. Manche Proteine wie Lysozym, mAB Bet V1 5.1, Myoglobin etc. konnten in der Orbitrap deutlich sensitiver dargestellt werden. Dies konnte am Protein Ribonuclease A gezeigt werden, wo die Sensitivität der Orbitrap 10 Mal größer war als in der linearen Ionenfalle. Andere Proteine hingegen wie Cytochrom C, Transferrin oder HSA konnten in der Orbitrap mit geringerer Nachweisstärke dargestellt werden. So betrug die Nachweisgrenze für humanes Transferrin 46 fmol in der linearen Ionenfalle im Gegensatz zu 73 fmol in der Orbitrap. Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss die Auflösung des Orbitrap-Massenanalysators auf die Peakbreiten bei chromatographischen Trennungen hat: Je höher die Auflösung dabei gewählt wird, desto längere Scanzeiten sind in Kauf zu nehmen. Dies hat einen signifikanten Einfluss auf die Datenaufnahmerate und letztendlich auf die Peakform, da bei längeren Scanzeiten weniger Datenpunkte pro Peak aufgenommen werden können, was sich in einer „elektronischen“ Peakverbreiterung äußert. So wurden Peakverbreiterungen von bis zu 15% beim Vergleich der UV-Daten mit MS-Daten bei $R=7,500$ festgestellt. Bei einer Auflösung von 100,000 verbreiterten sich die Peaks sogar um bis zu 45% im Vergleich zu den UV-Daten. Nach ausführlicher Charakterisierung wurde das verwendete micro-HPLC-FT-MS-Setup für die Analyse von Realproben eingesetzt. So wurden zum Beispiel $f(ab')_2$ -Antikörper-Fragmente von monoklonalen Antikörpern gegen cardiales Troponin I in Bezug auf Reinheit untersucht. Hierbei konnte gezeigt

werden, dass der Verdau und die Aufreinigung des Antikörper-Fragments mit sehr hoher Qualität durchgeführt wurde, da lediglich die Fragmente und keine Verunreinigungen detektiert wurden. Ebenso wurden intakte monoklonale Antikörper gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 untersucht. Dabei handelte es sich um mittels Affinitätsmessungen charakterisierte monoklonale Antikörper, von denen einer schwach und einer stark bindend war. Mit dem micro-HPLC-FT-MS-Setup konnte gezeigt werden, dass der schwach bindende monoklonale Antikörper nicht mehr intakt war, da die chromatographische Trennung drei Peaks lieferte. Hierbei wurden neben dem inhomogenen Antikörperspektrum Proteimassen im Bereich von 25 und 75 kDa detektiert, welche charakteristische Proteinmassen für leichte und schwere Ketten bzw. diverse Antikörper-Fragmente darstellen. Der stark bindende Antikörper konnte durch Verwendung des micro-HPLC-FT-MS-Setups als intakter Antikörper ohne Verunreinigungen detektiert werden. Auch die Analyse mehrerer aufgereinigter Glutathion-S-Transferase-Proben aus dem Spulwurm *Ascaris lumbricoides* lieferte hervorragende Ergebnisse in Bezug auf Analysenzeit und Massengenauigkeit. Hier konnte in allen Proben GST mit Massengenauigkeiten unter 10 ppm und stellenweise sogar unter 1 ppm nachgewiesen werden. Da bislang keine intakte Proteinmasse oder eine Sequenz zu GST aus *Ascaris lumbricoides* vorliegt, wurde GST aus dem nahezu identischen Organismus *Ascaris suum* als Referenz genommen. Durch die geringen Massenabweichungen von GST aus *Ascaris lumbricoides* und *Ascaris suum* liegt die Vermutung nahe, dass beide Glutathion-S-Transferase-Typen gleiche, wenn nicht sogar identische Sequenzen besitzen. Dies muss aber durch de-novo-Sequenzierungen in weiteren Experimenten bewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass von GST eventuell vier verschiedene Isoformen existieren. Als Vergleich hierzu wurde GST aus *Ascaris lumbricoides* in einem Gesamtproteinextrakt mittels micro-HPLC-ToF-MS detektiert. Hier gelang es durch Verwendung von 100- μ m-PS/DVB-Monolithen, GST im Gesamtproteinextrakt zu detektieren. Die Massenbestimmung mittels ToF-MS lieferte eine Masse von 23,452.4 Da im Gegensatz zu 23,454.31 Da in der Orbitrap.

So konnte insgesamt eine leistungs- und nachweisstarke micro-HPLC-MS-Methode basierend auf monolithischen Trennmedien und dem Orbitrap-Massenanalysator charakterisiert werden, die zur Analyse komplexer Realproben geeignet ist.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Gilar, M.; Neue, U. D. *J.Chromatogr.A* **2007**, 1169, 139-50.
2. van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. *Chem. Eng. Sci* **1956**, 5, 271-89.
3. Bidlingmeyer, B. A.; Warren; F.V. Jr. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1583A-98A.
4. Pauls, R. E.; Rogers, L. B. *Sep. Sci.* **1977**, 12, 395.
5. Götzinger, W.; Kyranos, J. *American Labaratory (Shelton Connecticut)* **1998**, 8, 30.
6. Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I. *J. Chromatogr.* **1976**, 125, 129-56.
7. Patthy, M. *J. Chromatogr. A* **1994**, 660, 17-23.
8. Delmotte, N.; Lasasosa, M.; Tholey, A. Heinzle E.; Huber, C. G. *J. Proteome Res.* **2007**, in press.
9. Mayr, B.; Hölzl, G.; Eder, K.; Buchmeiser, M. R.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6080-7.
10. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Rickert, A.; Huber, C. G.; Oefner, P. J. *Genomics* **2002**, 79, 793-8.
11. Premstaller, A.; Oefner, P. J.; Oberacher, H.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4688-93.
12. Huber, C. G.; Krajete, A. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 870-7.

13. Huber, C. G.; Krajete, A. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 413-24.
14. Horvath, C. G.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1422-8.
15. Ishii, D.; Asai, K.; Hibi, K.; Jonokuchi, T.; Nagaya, M. *J. Chromatogr.* **1977**, *144*(2), 157-68.
16. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Walcher, W.; Timperio, A.-M.; Zolla, L.; Chervet, J.-P.; Cavusoglu, N.; Van Dorsselaer, A.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2390-96.
17. Walcher, W.; Toll, H.; Ingendoh, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 107-17.
18. Walcher, W.; Timperio, A.-M.; Zolla, L.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6775-80.
19. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675-79.
20. Karlsson, K.-E. ; Novotny, M *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1662-65.
21. Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1128-35.
22. Huber, C. G.; Walcher, W. Timperio A. M.; Troiani, S.; Porceddu, E.; Zolla, L. *Proteomics* **2004**, *4*, 3909-20.
23. Huber, C. G.; Schley, C.; Delmotte, N. *Proteomics and Peptidomics. New Technology Platforms Elucidating Biology*, Marko-Varga, G., Ed.; Elsevier: 2005.
24. Oberacher, H.; Krajete, A.; Parson, W.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2000**, *893*, 23-35.

-
25. Rapp, E.; Bayer, E. *J. Chromatogr. A* **2000**, *887*, 367-78.
 26. Scott, R. P. W. *Adv. Chromatogr.* **1983**, *22*, 246-95.
 27. Hoffmann, S.; Blomberg, L. *Chromatographia* **1987**, *24*, 416.
 28. Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 500A-10A.
 29. Scott, R. P. W. ; Simpson, C. F. *J. Chromatogr. Sci.* **1982**, *20*, 62-66.
 30. Chervet, J. P.; Ursem, M.; Salzmann, J. P. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1507-12.
 31. Shen, Y.; Yang, Y. J.; Lee, M. T. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 628-35.
 32. Beisler, A. T.; Schaefer, K. E.; Weber, S. G. *J. Chromatogr. A* **2002**, *986*, 247-51.
 33. Chervet, J. P; Meijvogel, C. J.; Ursem, M.; Salzmann, J. P. *LC GC* **1992**, *10*, 140-48.
 34. Jorgenson, J. W.; Green, J. S. *J. Chromatogr.* **1976**, *352*, 337-43.
 35. Chervet, J. P. and van Soest, R. E. *J.* 93.
 36. Tao, L.; Kennedy, R. T. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 464-91.
 37. Andren, P. E.; Emmett, M. R.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 867-69.
 38. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-301.
 39. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B.

- J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240.
40. Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Phys. Chem.* **1988**, 88, 4671.
41. Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes* **1994**, 136, 167-80.
42. Tang, K.; Gomez, A. *Phys. Fluids* **1994**, 6, 2317-32.
Notes: English Article.
43. Iribarne, J. V.; Thomson, A. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64(6), 2287-94.
44. Paul, W. *Rev. Mod. Phys.* **1990**, 531-42.
45. Papp, E.; Micu, C. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* **2001**, 64, 056203.
46. McLuckey, S. A.; Berkel, G. J.; Goeringer, D. E.; Glish, G. L. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 737-43.
47. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, 430-43.
48. Hardman, M.; Makarov, A. A. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1699-705.
49. Makarov, A.; Denisov, E. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2009**, 20, 1486-95.
50. Zolla, L.; Timperio, A. M.; Huber, C. G. *Current Proteomics* **2004**, 4, 247-60.
51. Tennikova, T. B.; Horak, D.; Svec, F.; Tennikov, M. B.; Kever, E. E.; Belenkii, B. G. *J. Chromatogr.* **1989**, 475, 187-94.

52. Hjerten, patent number wo 90/07965, 1990.
53. Hjerten, S.; Liao, J.-L.; Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, *473*, 273-75.
54. Wang, Q. C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *J. Chromatogr. A* **1994**, *669*, 230-35.
55. Svec, F.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2100-07.
56. Hjerten, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 1205-14.
57. Liao, J. L.; Zhang, R.; Hjerten, S. *J. Chromatogr.* **1991**, *586*, 21-26.
58. Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7580-82.
59. Svec, F.; Frechet, J. M. J. *Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 326-34.
60. Ericson, C.; Holm, J.; Ericson, T.; Hjerten, S. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 81-87.
61. Viklund, C.; Ponten, E.; Glad, B.; Irgum, K. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 463-71.
62. Wang, Q. C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2243-48.
63. Sinner, F. M.; Buchmeiser, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1433-36.
64. Sinner, F.; Buchmeiser, M. R. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5777-86.
65. Eder, K.; Huber, C. G.; Buchmeiser, M. R. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 2029-32.
66. Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1030*, 201-8.

-
67. Seidl, J.; Malinsky, J.; Dusek, K.; Heitz, W. *Adv. Polymer Sci.* **1967**, *5*, 113-213.
68. Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 707-15.
69. Srinivasan, G.; James, C. M.; Krzycki, J. A. *Science* **2002**, *296*, 1459-62.
70. Beasley, C. A.; Shaw, J.; Zhao, Z.; Reed, R. A. *J Pharm Biomed Anal* **2005**, *37*, 559-67.
71. Lokhnauth, J. K.; Snow, N. H. *Anal Chem* **2005**, *77*, 5938-46.
72. Hasegawa, T.; Kim, S.; Tsuchida, M.; Issiki, Y.; Kondo, S.; Sugibayashi, K. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2005**, *53*, 271-6.
73. Harvey, P. W. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 285-8.
74. Darbre, P. D.; Aljarrah, A.; Miller, W. R.; Coldham, N. G.; Sauer, M. J.; Pope, G. S. *J Appl Toxicol* **2004**, *24*, 5-13.
75. von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-254.
76. Denooz, R.; Charlier, C. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2008**, *864*, 161-7.
77. Kosaka, T.; Hamada, H. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **2002**, *43*, 225-9.
78. Gostomski, I.; Braun, R.; Huber, C. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 279-
79. Heki, N.; Noto, M.; Hosojima, H.; Takahashi, S.; Murata, T. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* **1976**, *52*, 149-57.

-
80. Chang, C. H.; Chen, C. J.; Chuang, Y. C.; Her, G. R. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4303-11.
81. Lin, C. E.; Wang, T. Z.; Huang, H. C.; Hsueh, C. C.; Liu, Y. C. *J Chromatogr A* **2000**, *878*, 137-45.
82. Valko, K.; Slegel, P. *J Chromatogr* **1992**, *592*, 59-63.
83. Borba da Cunha, A. C.; Lopez de Alda, M. J.; Barcelo, D.; Pizzolato, T. M.; dos Santos, J. H. *Anal Bioanal Chem* **2004**, *378*, 940-54.
84. Koeber, R.; Fleischer, C.; Lanza, F.; Boos, K. S.; Sellergren, B.; Barcelo, D. *Anal Chem* **2001**, *73*, 2437-44.
85. Carabias-Martinez, R.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Dominguez-Alvarez, J.; Hernandez-Mendez, J. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 494-501.
86. Hjerten, S.; Li, Y. M.; Liao, J. L.; Mohammad, J.; Nakazato, K.; Pettersson, G. *Nature* **1992**, *356*, 810-11.
87. Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 820-22.
88. Vlakh, E G.; Platonova, G. A.; Vlasov, G. P.; Kasper, C.; Tappe, A.; Kretzmer, G.; Tennikova, T. B. *J. Chromatogr. A* **2003**, *992*, 109-19.
89. Strancar, A.; Barut, M.; Podgornik, A.; Koselj, P.; Josic, D.; Buchacher, A. *LC GC* **1998**, 660-70.
90. Toll, H.; Wintringer, R.; Schweiger-Hufnagel, U.; Huber, C. G. *J. Sep. Sci.* **2005**.
91. Svec, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1419-30.

-
92. Lee, D.; Svec, F.; Frechet, J. M. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1051*, 53-60.
93. Brennen, R. A.; Yin, H.; Killeen, K. P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9302-9.
94. Yin, H.; Killeen, K.; Brennen, R.; Sobek, D.; Werlich, M.; van de Goor, T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 527-33.
95. Mancini, F.; Naldi, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1175*, 217-26.
96. Bartolini, M.; Cavrini, V.; Andrisano, V. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1031*, 27-34.
97. Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *J. Chromatogr. A* **1995**, 89-95.
98. Svec, F.; Tennikova, T.; Deyl, Z. *Monolithic Materials*, Elsevier: Amsterdam, 2003.
99. Liapis, A. I. *Math. Modelling Sci. Comput.* **1993**, *1*, 397.
100. Tholey, A.; Toll, H.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4618-25.
101. Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2002**, *960*, 85-96.
102. Svec, F.; Tanaka, N. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 745.
103. He, C.; Hendrickx, A.; Mangelings, D.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander Heyden, Y. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 3796-803.
104. Cabrera, K. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 843-52.
105. Barroso, B.; Lubda, D.; Bischoff, R. *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 633-42.

-
106. Jaafar, J.; Watanabe, Y.; Ikegami, T.; Miyamoto, K.; Tanaka, N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2551-6.
107. Leinweber, F. C.; Schmid, D. G.; Lubda, D.; Wiesmuller, K. H.; Jung, G.; Tallarek, U. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1180-8.
108. Tang, Q.; Xin, B.; Lee, M. L. *J. Chromatogr. A* **1999**, *837*, 35-50.
109. Luo, Q.; Shen, Y.; Hixson, K. K.; Zhao, R.; Yang, F.; Moore, R. J.; Mottaz, H. M.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5028-35.
110. Oberacher, H.; Huber, C. G. *TRAC* **2002**, *21*, 166-73.
111. Podgornik, A.; Barut, M.; Jancar, J.; Strancar, A.; Tennikova, T. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2986-91.
112. Hjerten, S.; Mohammad, J.; Nakazato, K. *J. Chromatogr.* **1993**, *646*, 121-28.
113. Que, A. H.; Novotny, M. V. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5184-91.
114. Oberacher, H.; Premstaller, A.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 201-8.
115. Huang, X.; Zhang, S.; Schultz, G. A.; Henion, J. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2336-44.
116. Svec, F.; Fréchet, J. M. *Science* **1996**, *273*, 205-11.
117. Wang, Q. C.; Hosoya, K.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1232-38.
118. Leinweber, F. C.; Tallarek, U. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1006*, 207-28.

-
119. Halasz, I.; Endeke, R.; Asshauer, J. *J. Chrom. A* **1975**, 37-60.
120. Guadarrama, P.; Fomine, S.; Salcedo, R.; Martinez, A. *Biophys Chem* **2008**, 137, 1-6.
121. Ye, X.; Tao, L. J.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. *Talanta* **2008**, 76, 865-71.
122. Bandari, R.; Elsner, C.; Knolle, W.; Kuhnel, C.; Decker, U.; Buchmeiser, M. R. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 2821-7.
123. Eschelbach, J. W.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1697-706.
124. Greiderer, A., Ligon, S. C. jr., and Bonn, G. 2009; Vol. 32, pp. 2510-20.
125. Greiderer, A., Trojer, L., Huck, C. W., and Bonn G.K 2009; Vol. 1216, pp. 747-54.
126. Huber, C. G., Premstaller, A., and Oberacher, H.
127. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Huber, C. G. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4386-93.
128. Schley, C.; Swart, R.; Huber, C. G. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1136, 210-20.
129. Dullnig V., Weiss R., Amon S., Rizzi A., and Stutz H. 2009; Vol. 30 , pp. 2337-46.
130. Xie, S.; Allington, R. W.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *J. Chromatogr. A* **1999**, 865, 169-74.
131. Xie, S.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Mater.* **1998**, 10, 4072-78.
132. Maa, Y.-F.; Horváth, C. *J. Chromatogr.* **1988**, 445, 71-86.

-
133. Huber, C. G.; Premstaller, A.; Kleindienst, G. *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 175-89.
134. Huber, C. G.; Kleindienst, G.; Bonn, G. K. *Chromatographia* **1997**, *44*, 438-48.
135. Czerwenka, C.; Maier, I.; Potocnik, N.; Pittner, F.; Lindner, W. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5165-72.
136. Kelleher, N. L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 197A-203A.
137. Wynne, C.; Fenselau, C.; Demirev, P. A.; Edwards, N. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9633-42.
138. Apffel, A.; Chakel, J.; Udiavar, S.; Hancock, W. S.; Souders, C.; Pungor, E. Jr. *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 41-60.
139. Banks, J. F.; Dresch, T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1480-85.
140. Weickhardt, C.; Moritz, F.; Grotemeyer, J. *Mass Spectrom. Rev.* **1996**, *15*, 139-62.
141. Cotter, R. J. *Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research*, American Chemical Society: Washington , DC, 1997.
142. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430-43.
143. Ren, D.; Pipes, G. D.; Liu, D.; Shih, L. Y.; Nichols, A. C.; Treuheit, M. J.; Brems, D. N.; Bondarenko, P. V. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*, 12-21.
144. Zhang, J.; Liu, H.; Katta, V. *J. Mass. Spectrom.* **2010**, *45*, 112-20.

145. Bondarenko, P. V.; Second, T. P.; Zabrouskov, V.; Makarov, A. A. ; Zhang, Z. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2009**, *20*, 1415-24.
146. Ryan, C. M., Souda, P., Bassilian, S., Ujwal, R., Zhang, J., Abramson, J., Ping, P., Durazo, R., Bowie, J. U., Hassan, S. S., Baniulis, D., Cramer, W. A., Faull, K. F., and Whitelegge, J. P. 2010; Vol. 9, pp. 791-803.
147. Yang, F., Bogdanov, B., Strittmatter, E. F., Vilkov, A. N., Gritsenko, M., Shi, L., Elias, D. A., Ni, S., Romine, M., Pasa-Tolic, L., Lipton, M. S., and Smith, R. D. 2005; Vol. 4, pp. 846-854.
148. Everley R.A. and Croley T.R. 2008; Vol. 1192, pp. 239-247.
149. Sanz-Nebot, V. ; Gonzalez, P.; Toro, I.; Ribes, A.; Barbosa, J. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *798*, 1-7.
150. Mason, A. B.; Miller, M. K.; Funk, W. D.; Banfield, D. K.; Savage, K. J.; Oliver, R. W. A.; Green, B. N.; MacGillivray, R. T. A.; Woodworth, R. C. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5472-79.
151. Acevedo, N.; Mercado, D.; Vergara, C.; Sanchez, J.; Kennedy, M. W.; Jimenez, S.; Fernandez, A. M.; Gutierrez, M.; Puerta, L.; Caraballo, L. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *157*, 282-90.
152. Holland, C. V. *Parasitology* **2009**, *136*, 1537-47.
153. Al-Qurashi, A. ; Maklad, K. M.; Al Abdulwahed, O. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **2003**, *33*, 657-62.
154. Bradley, J. E. ; Jackson, J. A. *Parasite Immunol.* **2004**, *26*, 429-41.
155. Poudyal, A. K. ; Jimba, M.; Silwal, R. C.; Murakami, I.; Sherchand, J. B.; Wakai, S. *Trop.Doct.* **2006**, *36*, 16-9.

-
156. Everett, S.; Vezakis, A.; Jackson, R.; Chalmers, D. *Endoscopy* **1998**, *30*, S51-2.
157. Yapi, Y. G.; Briet, O. J.; Vounatsou, P. *West Afr.J.Med.* **2006**, *25*, 124-5.
158. Alam, S.; Mustafa, G.; Ahmad, N.; Khan, M. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* **2007**, *38*, 631-5.
159. Broseta Viana, L.; Calbo Mayo, J. M.; Hermida Lazcano, I.; Solera Santos, J. *Rev. Clin. Esp.* **2005**, *205*, 358.
160. Allen, J. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *27*, 142-7.
161. Aggarwal, B.; Sharma, M.; Singh, T. *Indian . Pediatr.* **2008**, *75*, 296-7.
162. Akhtari, M.; Langston, A. A.; Waller, E. K.; Gal, A. A. *Bone Marrow Transplant.* **2009**, *43*, 155-8.
163. Acevedo, N.; Sanchez, J.; Eler, A.; Mercado, D.; Briza, P.; Kennedy, M.; Fernandez, A.; Gutierrez, M.; Chua, K. Y.; Cheong, N.; Jimenez, S.; Puerta, L.; Caraballo, L. *Allergy* **2009**, *64*, 1635-43.
164. Kalantarov, G.; Acevedo, H. F. *Cancer* **1998**, *83*, 783-7.