

**Entwicklung kapillarelektrophoretischer
Trennungen für die Proteinanalytik in Kombination
mit dem Elektrosprayionisations-Flugzeit-
Massenspektrometer**

der Fakultät für Chemie und Physik
der technischen Universität Bergakademie Freiberg
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt

von: Diplom-Chemikerin Anke Feldmann

geboren am: 28.01.1978 in: Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Otto, Freiberg
Prof. Dr. Werner Engewald, Leipzig
PD Dr. Frank Steiner, Saarbrücken

Tag der Verleihung: 4. März 2005

1.	Einleitung und Zielsetzung	3
2.	Allgemeiner Teil	5
	2.1. Kapillarelektrophorese	5
	2.1.1. Elektrophoretische Wanderung	5
	2.1.2. Elektroosmotischer Fluss	5
	2.2. Trennprinzipien in der Kapillarelektrophorese	8
	2.2.1. Kapillarzonenelektrophorese	8
	2.2.2. Kapillar-Isoelektrische Fokussierung	9
	2.2.3. Isotachophorese	11
	2.3. Injektionsmöglichkeiten	11
	2.4. Charakterisierung von fused silica Kapillaren	12
	2.4.1. Atomkraftmikroskopie	13
	2.5. Modifizierung von fused silica Kapillaren	13
	2.5.1. Radikalische Atomtransferpolymerisation	15
	2.6. ESI-TOF-Massenspektrometrie	16
	2.6.1. Elektrosprayionisierung	17
	2.6.2. Quadrupol-System	18
	2.6.3. Flugzeit-Massenspektrometer	19
	2.6.4. Kopplung der CE mit der ESI-TOF-MS	20
	2.6.5. Proteine und ihre Signale in der ESI-MS	21
	2.6.6. Identifizierung von Proteinen mittels Trypsinverdau	23
3.	Experimenteller Teil	25
	3.1. Beschichtung der fused silica Kapillaren bzw. Wafer	25
	3.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen für die ATRP mit Hilfe von GC-Experimenten	28
	3.3. Methoden	29
4.	Ergebnisse und Diskussion	34
	4.1. GC-Experimente	35
	4.2. Beschichtung und Charakterisierung der CE-Kapillaren	38
	4.2.1. Messung der DMSO-Beweglichkeit	38
	4.2.2. Proteintrennung bei pH 3	41
	4.2.3. Langzeittest bei pH 9	48
	4.2.4. Kapillarisoelektrische Fokussierung CIEF	55
	4.2.5. Atomkraftmikroskopische Aufnahmen	62

4.3.	Kopplung der CE mit der ESI-MS	68
4.3.1.	Proteintrennung mit einem ESI-MS verträglichen Ammoniumformiatpuffer	68
4.3.2.	Zusatz von Hydrochinon zum Trennmedium	70
4.3.3.	Anpassung weiterer Geräte- und Trennparameter für eine erfolgreiche Kopplung	75
4.3.4.	CZE mit einem Ammoniumformiatpuffer und einem Wasser/Ameisensäure-Gemisch als Trennmedium	76
4.3.5.	Auftrennung von Standardproteinen unter Anwendung der isoelektrischen Fokussierung und anschließender Detektion mit der ESI-MS	80
4.3.6.	Identifizierung von Proteinen mittels Trypsinverdau	87
4.4.	Trennungen von Analyten in realen Proben	89
4.4.1.	CZE und CIEF von Hühnereiweiß	90
4.4.2.	Auftrennung einer verunreinigten Staphylococcus Nucleaseprobe mittels CZE und anschließende Identifizierung mit ESI-MS	92
5.	Zusammenfassung	98
6.	Ausblick	101
7.	Literatur	102
8.	Verzeichnisse	106
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	106
8.2.	Abbildungsverzeichnis	107
8.3.	Tabellenverzeichnis	112
8.4.	Material- und Geräteverzeichnis	112
9.	Anhang	I

1. Einleitung und Zielsetzung

Mit der DNA-Sequenzierung (Sanger und Coulson 1975; Maxam und Gilbert 1977) wurden immer mehr Genomdaten zugänglich. Mittlerweile sind die Genome (Gesamtheit der DNA eines Organismus) von 20 Modellorganismen sowie der Großteil des menschlichen Erbgutes sequenziert (Human Genom Projekt). Dabei konnte die Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmente durch den Einsatz der Kapillarelektrophorese (CE) an Stelle der Gelelektrophorese stark beschleunigt werden.

Mit den in Gendatenbanken abgelegten Informationen entwickelt man neue Medikamente oder versucht die Ursache unterschiedlicher Krankheiten zu entschlüsseln. Durch den Ersatz kranker gegen gesunde Gene verspricht man sich in der Gentherapie die Heilung von genetisch verursachten Erkrankungen. Da das Genom den Bauplan der Proteine beinhaltet und diese das Leben, Funktionieren und Reagieren einer Zelle oder eines Organismus bestimmen, ist die weitere Erforschung dieser komplexen Biomoleküle von Bedeutung. Die sogenannte Proteomics-Forschung befasst sich mit der Auftrennung und Identifizierung von Proteinen. Dabei umschreibt der 1995 vorgeschlagene Begriff Proteom die Gesamtheit aller Proteine, die basierend auf dem Genom einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt exprimiert werden können. In der Proteomanalyse werden also Proteine aufgetrennt und identifiziert. Zur Auftrennung wurde bisher vor allem die von Klose und O'Farrel entwickelte 2-dimensionale Gelelektrophorese genutzt. Die halbquantitative Auswertung erfolgt nach der Proteinfärbung durch Gelscanner und spezielle Bildanalyseprogramme. Diese Methode hat jedoch ihre Grenzen, da die Reproduzierbarkeit der Methodik gering ist. Der sehr geringe Probenanteil in den Proteinspots reicht außerdem kaum für die analytischen Techniken wie EDMAN-Sequenzierung oder Aminosäureanalyse. In den 80er Jahren wurde das Nachweisverfahren Western Blot entwickelt. Bei dieser Technik findet ein Transfer der Proteinspots aus dem 2D-Gel auf eine Membran statt, auf der sie dann mit Hilfe spezieller Antikörper identifiziert werden. Durch die Weiterentwicklung der Massenspektrometrie (MS) können heute selbst unbekannte Proteinspots identifiziert werden. Dabei löst man die einzelnen Proteine aus dem Gel, spaltet sie mit einer Protease und überführt die Fragmente nach einer eventuellen Trennung mittels Kapillarelektrophorese oder Flüssigchromatographie (LC) ins Massenspektrometer. Die hohe Massengenauigkeit des Massenspektrometers erlaubt die exakte Suche nach einer bestimmten Masse bzw. die Aufnahme eines Massenbereiches. Die Zuordnung zu einem Protein erfolgt dann mittels Proteindatenbanken. Beim Einsatz von Quarzkapillaren (bzw. fused silica Kapillaren) in der CE gibt es jedoch Probleme, denn durch

die Deprotonierung der Silanol-Gruppen der Kapillarwand ab einem pH-Wert von 2,5 wirkt sich nicht nur der elektroosmotische Fluss (EOF), sondern auch die Adsorption positiv geladener Analytionen auf die Trennung aus. Das bedeutet unterschiedliche Migrationszeiten und Peakverbreiterungen, was schließlich zu Verlusten in der Trenneffizienz führt.

Der Zusatz von Alkalisalzen (Kaliumsulfat) als Konkurrenzionen oder von zwitterionischen Molekülen (Aminosulfonate), die mit der Kapillaroberfläche in Wechselwirkung treten, verringern die Proteinadsorptionen. Eine Zugabe von Tensiden oder Polyaminen wirkt wie ein dynamisches Coating und dient somit zur Blockierung von Adsorptionszentren. All diese Möglichkeiten zeigen gute Trennergebnisse, erhöhen jedoch beim ersteren die Leitfähigkeit des Puffers und machen so eine effiziente Kühlung notwendig oder die zugesetzten Additive sind unverträglich für die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). Die Lösung ist die permanente Modifizierung der Kapillarinnenfläche, um neben der Unterdrückung von Wandadsorptionen auch die Verschmutzung der ESI-Quelle zu vermeiden.

Die bisher entwickelten Belegungsmöglichkeiten haben sich auf unterschiedlichen Einsatzgebieten bewährt, jedoch besteht nach wie vor bei der in situ Polymerisation das Problem der Verstopfung der Kapillaren durch gelöste Oligomere. Wang und Matyjaszewski publizierten 1995 die kontrollierte radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP). Basierend auf diesem Reaktionsmechanismus sollte mit der für Kapillaren optimierten Polymerisation von 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) eine permanente, hydrophile Polymerschicht entwickelt werden, die sich durch gleichmäßige Abdeckung und gute Hydrolysestabilität auszeichnet. Um die Trennleistung und Anwendbarkeit der HEMA-Beschichtung zu testen, standen Vergleichsmessungen unterschiedlicher Trennmethode und Langzeittests auf dem Plan. Zur Bewertung der Polymerschicht sollten jedoch nicht nur chromatographische Trenngrößen ausgewertet werden, sondern es sollte auch eine Betrachtung der Oberflächenmorphologie mittels Atomkraftmikroskopie durchgeführt werden. Weiterhin war eine Kopplung der Kapillarelektrophorese mit dem Elektrosprayionisations-Massenspektrometer geplant, um neben der hohen Trennleistung auch einen leistungsstarken Detektor zur Verfügung zu haben. Wenn es möglich wäre, über einen großen pH-Bereich viele Proteine zu trennen, erhält man durch die Kombination von isoelektrischer Fokussierung in Kapillaren und der ESI-MS ein zur 2D-Gelelektrophorese äquivalentes Verfahren, das sich durch deutlich geringere Analysezeiten sowie Automatisierung auszeichnet.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Kapillarelektrophorese

Die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld wird als Elektrophorese bezeichnet. Findet dies in englumigen Glasröhren mit einem Durchmesser zwischen 25 und 75 μm statt, so spricht man von Kapillarelektrophorese. Durch ihre hohe Trenneffizienz und Automatisierbarkeit stellt sie eine wertvolle Ergänzung zu den klassischen elektrophoretischen Methoden der Biochemie dar. Dabei gewinnt sie immer mehr an Bedeutung für die qualitative und quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen.

2.1.1. Elektrophoretische Wanderung

Die Wanderungsgeschwindigkeit v eines geladenen Analyten im elektrischen Feld wird von seiner elektrophoretischen Mobilität μ_{eo} und der angelegten Feldstärke E bestimmt (siehe Gleichung 2-1).

$$v = \mu_{eo} \cdot E \quad (2-1)$$

Die Mobilität jedes einzelnen Analyten hängt wiederum von seiner Ladung q , dem Radius des hydratisierten Ions r (STOKESScher Radius) und der Viskosität des Puffers η ab (Gleichung 2-2).

$$\mu_{eo} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2-2)$$

Unter der Annahme, dass es sich um ein sphärisches Teilchen größer als die Lösungsmittelmoleküle handelt, gilt die in der Gleichung (2-2) verwendete Zahl 6 [1]. Die elektrophoretische Mobilität ist also eine substanzspezifische Größe und ist vom Masse-Ladungs-Verhältnis des Moleküls abhängig.

2.1.1. Elektroosmotischer Fluss

In unbeschichteten Kapillaren beobachtet man nicht nur eine Wanderung von geladenen Teilchen, sondern auch von elektrisch neutralen Substanzen. Die Ursache hierfür liegt im elektroosmotischen Fluss (EOF), einer Gesamtwanderung der Pufferlösung in der Kapillare. Dieser resultiert aus den Oberflächeneigenschaften des Quarzglases, im folgenden immer als

fused silica bezeichnet. Ab einem pH von 2,5 beginnt die Deprotonierung der Silanolgruppen [2] und führt so zu einer negativen Gesamtladung der Kapillarinnenfläche. Die positiv geladenen Ionen des Puffers kompensieren dies unter Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht bestehend aus einer starren (HELMHOLTZ Schicht) und einer diffusen Schicht (GOUY-CHAPMAN-Schicht). Durch die mechanische Bewegung der geladenen Teilchen in der Elektrolytlösung treten elektrokinetische Erscheinungen auf. Das Potenzial an der Scherebene zwischen dem stationären und dem beweglichen Teil der Doppelschicht wird als Zetapotenzial ζ bezeichnet (Abbildung 2-1).

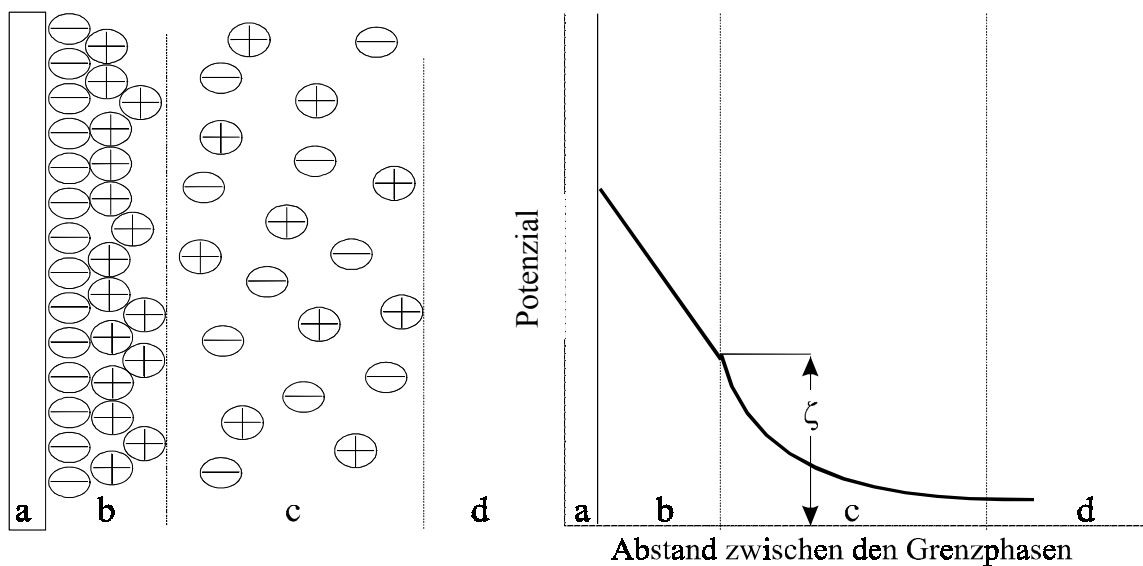


Abbildung 2-1: Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht, des Potenzialverlaufes an den Grenzflächen sowie des Zetapotenzials an der Scherebene:
a: Quarz
b: starre HELMHOLTZ-Schicht
c: diffuse GOUY-CHAPMAN-Schicht
d: Elektrolyt

Der Potenzialverlauf ist abhängig von der Elektrolytart, deren Konzentration und von der Art der Grenzphase [3]. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes E werden nun die Kationen zur Kathode hin induziert und ziehen durch ihre Solvathüllen die gesamte Pufferlösung mit [2]. Das resultierende Strömungsprofil ist sehr flach (stempelförmig), da sowohl die treibende als auch die bremsende Kraft von der Kapillarwand ausgehen. Somit ist die Strömungsgeschwindigkeit über den gesamten Kapillarquerschnitt annähernd gleich groß und es treten wesentlich geringere Peakverbreiterungen aufgrund von Radialdiffusionen auf als bei parabolischen Strömungsprofilen, die durch einen hydrodynamischen Fluss erzeugt werden [1]. Während sich neutrale Teilchen mit dem EOF bewegen, erfahren positiv geladene Analyten neben ihrer elektrophoretischen Mobilität μ_{eo} eine zusätzliche Kraft zum negativen

Pol. Moleküle mit vorwiegend negativer Ladung werden abgebremst oder durch einen ausreichend hohen EOF auch in Richtung Kathode induziert (Abbildung 2-2).

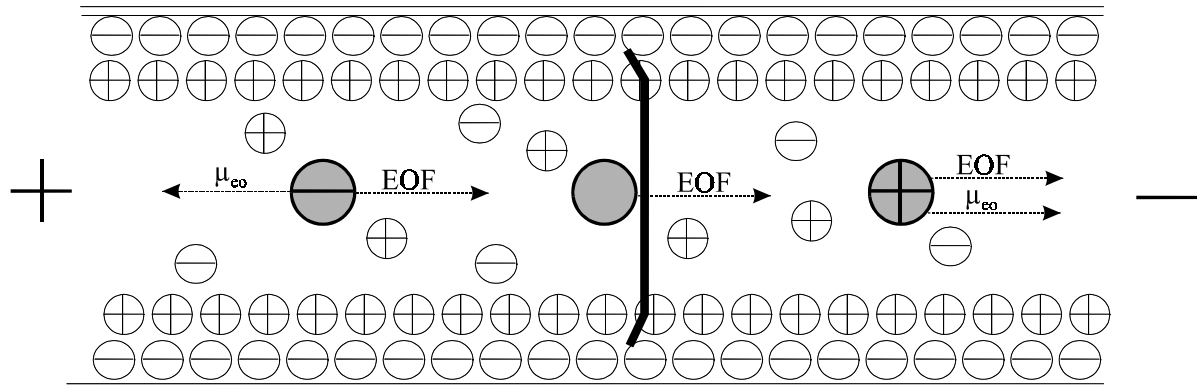


Abbildung 2-2: Darstellung des Elektroosmotischen Flusses mit seinem Strömungsprofil und seine Wirkung auf die Analyten

Die Wanderungsgeschwindigkeit des EOF v_{EOF} kann mit der HELMHOLTZ-SMOLUKOWSKI-Gleichung (Gleichung 2-3) also wie folgt beschrieben werden:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (2-3)$$

Neben der Feldstärke E haben auch die Viskosität η und die Dielektrizitätskonstante ε des Elektrolyten sowie das bereits beschriebene Zetapotenzial ζ Einfluss auf die Geschwindigkeit des EOF v_{EOF} . Das Zetapotenzial wird vor allem durch Eigenschaften der Kapillarwand und der Konzentration c sowie der Dielektrizitätskonstante ε des Elektrolyten beeinflusst. Weiterhin gehen die Temperatur T , die FARADAY-Konstante F , die universale Gaskonstante R und die Ladungsdichte der Kapillaroberfläche σ in die Berechnung ein, so dass das Zetapotenzial wie folgt ausgedrückt werden kann (Gleichung 2-4) [4].

$$\zeta = \frac{\sigma}{\varepsilon \sqrt{\frac{2 \cdot c \cdot F^2}{\varepsilon \cdot R \cdot T}}} \quad (2-4)$$

Durch die Variation unterschiedlicher Parameter kann also die Wanderungsgeschwindigkeit des EOF gezielt beeinflusst werden. Untersuchungen zur Abhängigkeit des EOF vom angelegten elektrischen Feld und unterschiedlichen pH-Werten wurden z. B. von Bello [5] durchgeführt. Weiterhin liegen Untersuchungsergebnisse zur elektroosmotischen Wanderung eines Neutralmarkers in Pyrex-, fused silica- und Teflon-Kapillaren vor [6]. Schwer [7] dokumentierte den Einfluß von organischen Lösungsmitteln und deren Ionenstärke auf das Zetapotenzial und somit auf die Stärke des EOF. Die Abhängigkeit zwischen Stärke des elektroosmotischen Flusses und gewähltem Lösungsmittel in An- und Abwesenheit von

Ammoniumacetat als Untergrund-Elektrolyt untersuchten Steiner und Hassel [4]. Durch eine kationische Beschichtung wie z. B. mit Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) [8] kann der EOF auch umgekehrt werden, wobei eine Gesamtwanderung in Richtung Anode resultiert. Die Messung der Migrationszeit eines Neutralmarkers (DMSO, Phenol u. a.), der sich zwangsläufig mit dem EOF bewegt, stellt die bisher beste Möglichkeit dar, die Stärke der Elektrosmose zu verfolgen. Da viele der in die Gleichungen eingehenden Parameter schwer zu bestimmen sind, erfolgt die Berechnung der elektroosmotischen Mobilität μ_{eof} nach der Wegstrecke vom Kapillareinlass bis hin zum Detektorfenster L_{eff} und der dazu benötigten Migrationszeit t_m . Außerdem spielt die angelegte elektrische Feldstärke E und die Gesamtlänge der Kapillare L_{tot} eine Rolle (Gleichung 2-5).

$$\mu_{eof} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t \cdot U} \quad (2-5)$$

Durch die Messung der elektroosmotischen Mobilität ist somit möglich, den Dissoziationsgrad der Silanolgruppen der Kapillarinnenwand abzuschätzen bzw. Aussagen über den Erfolg einer Polymerbeschichtung auf der Kapillarinnenwand zu machen.

2.2. Trennprinzipien in der Kapillarelektrophorese

2.2.1. Kapillarzonenelektrophorese

Die mit einer Elektrolytlösung gefüllte Kapillare taucht mit beiden Enden in Puffergefäße. Nach Injektion der Probenlösung wird ein elektrisches Feld erzeugt, in diesem wandern die geladenen Analyten in Abhängigkeit von ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis mit einer bestimmten elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Moleküle mit gleichen Mobilitäten finden sich zu Zonen zusammen, die dann den Detektor passieren.

Mit der von Terabe [9] eingeführten *micellarelektrokinetischen Chromatographie (MEKC)* können mit der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) auch neutrale Analyten aufgetrennt werden. Durch den Zusatz von Detergenzien zum verwendeten Puffer bilden sich mit Überschreitung der kritischen micellaren Konzentration geladene Micellen aus. Die Analyten verteilen sich zwischen dem Puffer (Transport mittels EOF) und dem Micellinneren (Transport entsprechend der elektrophoretischen Mobilität der Micelle) und werden dann entsprechend ihrem Verteilungsgleichgewicht im elektrischen Feld getrennt.

Die *Kapillargelelektrophorese (CGE)* findet vor allem für Proteine und Nucleinsäuren Anwendung. Analog zur Plattengelelektrophorese nutzte Cohen [10] als erster quervernetztes Polyacrylamidgele in Kapillaren. Bei dieser Form der CZE liegen oftmals Biopolymere mit

gleichem Oberflächen-zu-Ladungs-Verhältnis vor, jedoch unterschiedlichen Molekülgrößen. Das Polymer dient als molekulares Sieb und trennt die Makromoleküle nach ihrer Größe. Wie auch bei der CZE müssen fused-silica-Kapillaren oberflächenmodifiziert werden, um zu vermeiden, dass der EOF die Polymerfüllung herauspült. Die Herstellung der Gele in den Kapillaren ist nicht ganz einfach, denn um ein konstantes elektrisches Feld zu gewährleisten dürfen sich keine Gasblasen ausbilden. Die CGE wird vor allem zur Trennung von DNA-Molekülen verwendet und erlebte mit dem Beginn der Genom-Forschung einen riesigen Aufschwung.

2.2.2. Kapillar-Isoelektrische Fokussierung

Unter Verwendung der isoelektrischen Fokussierung in Kapillaren (CIEF) kann die Trenneffizienz der CZE weiter erhöht werden. Bei der auch in der 2-D-Gelelektrophorese eingesetzten Technik werden vor allem Proteine und Peptide aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungseigenschaften getrennt. Abhängig von ihrer Aminosäuresequenz besitzen die Polypeptide bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedliche Ladungszustände [11]. Erzeugt man nun über die Kapillarlänge einen pH-Gradienten, wandern die Analyten so lange, bis sie einen pH-Wert erreichen, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist, dem so genannten isoelektrischen Punkt pI [12].

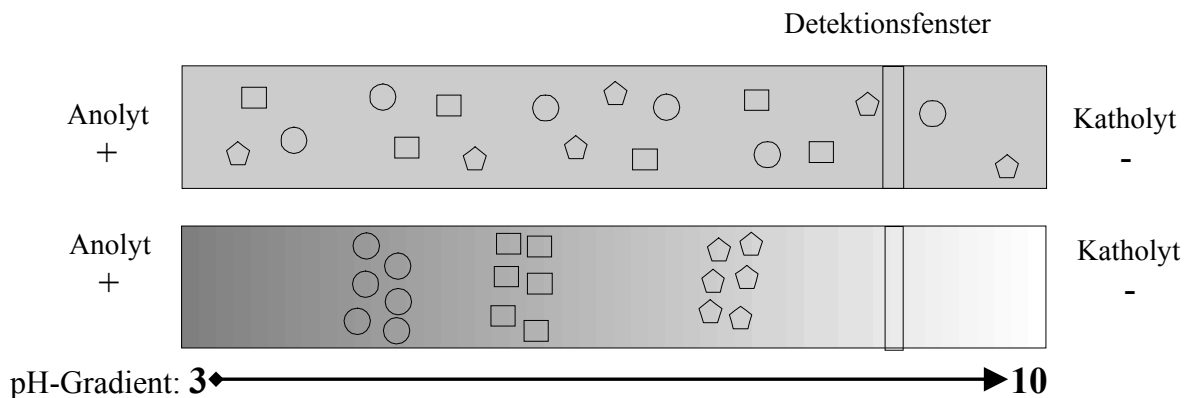


Abbildung 2-3 : Schematische Darstellung des Fokussierungsschrittes bei der CIEF
 oben: vor Fokussierung, Kapillare mit Ampholyt-Analytgemisch gefüllt
 unten: nach Fokussierung, Anordnung der Analyten im pH-Gradienten

Zur Realisierung des pH-Gradienten werden Ampholytlösungen verwendet, in denen die Probe gelöst wird. Diese Ampholyte bestehen aus einer Mischung von homologen amphoterischen Verbindungen unterschiedlicher pI -Werte und Molmassen geringer als 1 kDa. Die mit der Ampholytmischung gefüllte Kapillare taucht mit einem Ende in eine verdünnte Säure (meist Phosphorsäure) und mit dem anderen Ende in eine verdünnte Base (meist

Natronlauge). Entsprechend ihrer pI-Werte ordnen sich die Ampholyten mit dem Anlegen des elektrischen Feldes längs der Kapillare (Abbildung 2-3) an und bilden so den pH-Gradienten aus.

Zur anschließenden Detektion der aufgetrennten Zonen müssen diese zum Detektor transportiert werden. Dies ist z. B. hydrodynamisch möglich. Durch das dabei entstehende HAGEN-POISSEUILLESche Strömungsprofil besteht allerdings die Gefahr von Effizienzverlusten aufgrund von Bandenverbreiterungen. Eine bessere Variante ist die chemische Mobilisierung, dabei wird die Zusammensetzung des Anolyten oder Katholyten verändert [14], so dass der pH-Gradient instabil wird und die Ampholytmoleküle wie auch die fokussierten Proben wieder mit ihrer elektrophoretischen Wanderung hin zum Detektor beginnen. So wird z. B. bei der kathodischen Mobilisierung der typischerweise verwendeten Natronlauge Natriumchlorid zugesetzt. Die Chloridionen wandern in Richtung Anode und stören dabei das sich in der Kapillare eingestellte Gleichgewicht von Anionen und Kationen. Um das Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, muss die Anzahl der Hydroxidionen im zur Kathode gerichteten Kapillarteil abnehmen, was eine Absenkung des pH-Wertes bedeutet und damit zu einer Neueinstellung des pH-Gradienten über die Kapillare führt. Bei der anodischen Mobilisierung wird das gleiche Prinzip angewendet, nur wandern hier eben die Natriumionen als nichtprotische Kationen und führen durch Verdrängung der Protonen zu einem Anstieg des pH-Wertes. Da durch Salzzugaben der Stromfluß wesentlich erhöht wird und sich damit mehr JOULESche Wärme bildet, ist natürlich mit Verlusten in der Trennleistung zu rechnen. Außerdem ist die Änderung des pH-Gradienten begrenzt und es können z. B. bei der kathodischen Mobilisierung nur basische und neutrale Proteine detektiert werden. Deshalb stellten Zhu et al. 1991 [13] die effektive Nutzung von zwitterionischen Substanzen für die chemische Mobilisierung vor. Zunächst wandern die Zwitterionen, wie auch bei der Natriumchloridmobilisation, in die Kapillare und verändern dadurch den pH-Gradienten. Durch ihre Wanderung zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkte entspricht, bildet sich eine immer breiter werdende Zone, welche die bereits fokussierten Analyten weiter in Richtung Detektor verschiebt [13]. Nutzt man also bei der kathodischen Mobilisierung Zwitterionen mit einem pI-Wert zwischen dem pH des Anolyten und dem Analyt mit dem niedrigsten isoelektrischen Punkt, so können alle fokussierten Probenzonen detektiert werden.

2.2.3. Isotachophorese

Bei dieser Trennmethode wird die Probe zusammen mit einem diskontinuierlichen Puffersystem in die Kapillare gefüllt. Die Mobilität der Probeteilchen muss zwischen der des

schnellen Leitelektrolyten und der des Endelektrolyten mit geringer Ionenbeweglichkeit liegen. Durch Einstellen eines konstanten Stromes kommt es zur Ausbildung eines Feldstärkegradienten, in dem die Ionen in direkt aufeinander folgenden Zonen mit gleicher Geschwindigkeit wandern. Dabei nehmen die Mobilitäten von der Zone des Leitelektrolyten über die daran anschließenden Probenzonen bis hin zum Endelektrolyten ab. Die Grenzen zwischen den einzelnen Zonen sind sehr scharf, was darauf zurückzuführen ist, dass in jeder Zone eine konstante Geschwindigkeit herrscht (Gleichgeschwindigkeits-Elektrophorese) [2], denn Geschwindigkeit ist gleich dem Produkt aus Mobilität und Feldstärke (Gleichung 2-1). Kommt ein Ion in eine Zone anderer Feldstärke, so ändert sich seine Geschwindigkeit und es kehrt in seine Zone zurück. Ihren Einsatz findet diese Methode bei der Trennung anorganischer Ionen, organischer Carbonsäuren [1] sowie als Anreicherungsschritt für eine CZE-, MEKC- oder Kapillargelelektrophorese-Trennung [15].

2.3. Injektionsmöglichkeiten

Die Probeninjektionsmenge in der CE sollte nur wenige nl bzw. nur ca. 2 - 3 mm der Kapillare in Anspruch nehmen, um eine hoch effiziente Trennung zu erzielen. Zu diesem Zweck dient hauptsächlich die *hydrodynamische Injektion*. Dabei wird durch Anlegen eines Druckes auf der Inletseite bzw. eines Vakuums auf der Outletseite die Probe in die Kapillare befördert. Bei einer Kapillarlänge von 1 m und einem Kapillarinne Durchmesser von 50 µm wird bei einem gewählten Druck von 50 mbar/s ein Volumen von 0,750 nl injiziert [1]. Dieser Injektionspfropfen enthält dann je nach Konzentration des Analyten im Probengefäß eine festgelegte Menge Moleküle. Bei sehr verdünnten Lösungen kann man zwar durch höhere Injektionsmengen intensivere Signale erhalten, man muss aber in diesem Fall auch mit Verlusten in der Trenneffizienz rechnen. Durch die Erhöhung der Pfropfenlänge kommt es zu einer Verminderung der Bodenzahlen, deshalb gilt als Faustregel: „Die Injektionslänge sollte kleiner sein als die Zone, die durch die Diffusion entsteht...“ [1]. Hier könnte man als Alternative die *elektrokinetische Injektion* nutzen, dabei taucht das Kapillarende in das Probengefäß, aus dem die Analyten im elektrischen Feld in die Kapillare wandern. Der Nachteil dieser Methode ist, dass man aufgrund der spezifischen elektrophoretischen Mobilität unterschiedliche Mengen an Analyten injiziert, dies führt zu einer Diskriminierung weniger mobiler Moleküle und macht außerdem eine quantitative Auswertung schwierig. Bei sehr verdünnten Proben können auch Anreicherungseffekte wie das sogenannte *Sample stacking* genutzt werden. Dabei wird ein größeres Probenvolumen in die Kapillare gebracht. Ist die Leitfähigkeit der Probe geringer als die des Trennpuffers, so führt die gleiche

Spannung zu einer höheren Feldstärke in der Analytzone und diese Ionen wandern damit schneller. Bei Erreichen der Grenzfläche zum Puffer nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit ab und die Analyten werden in einer schmalen Zonen aufkonzentriert. In dieser herrscht ein homogenes elektrisches Feld und damit kann die eigentliche elektrophoretische Wanderung beginnen. Als weitere Anreicherungs-methode soll an dieser Stelle noch die *Feldumkehr* erwähnt werden.

2.4. Charakterisierung der fused silica Kapillaren

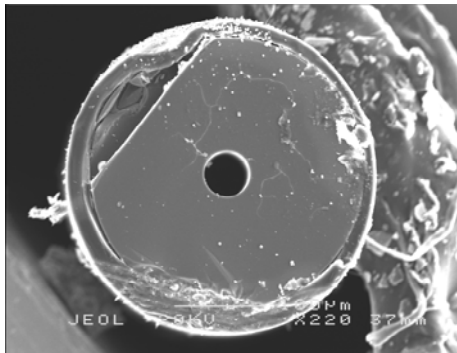


Abbildung 2-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Kapillarquerschnittes

Die eingesetzten fused silica Kapillaren haben einen Innendurchmesser von 50 μm und einen Außendurchmesser von 360 μm (Abbildung 2-4). Sie sind zur Stabilisierung mit einer 4 - 10 μm dicken Polyimidschicht ummantelt. Das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis ist mit $79:1 \mu\text{m}^{-1}$ sehr groß und gewährleistet eine schnelle Abführung von Wärme. Dadurch können Bandenverbreiterungen infolge von Diffusionen optimal unterdrückt werden. Das Kapillarvolumen einer 1 m langen Kapillare dieser Art

beträgt 2,0 μl . Je nach Injektionsdauer und der Höhe des angelegten Druckes werden zwischen 3,5 und 5,7 nl injiziert, dies entspricht 1,8 bzw. 2,8 mm der Gesamtkapillarlänge. Wie bereits schon erwähnt ist der elektroosmotische Fluss auf die Oberflächeneigenschaften des fused silica zurückzuführen. Das Kapillarmaterial besteht aus eckenverknüpften SiO_4 -Tetraedern, die im idealisierten Zustand einen Si-O-Abstand von 161 pm [16] und einen Si-O-Si-Winkel von 144° aufweisen. Durch die Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität vom Zetapotenzial (Gleichung 2-3), welches wiederum mit der spezifischen Oberflächenladung σ (Gleichung 2-6) korreliert, konnte Kohr [17] eine Gesamtkonzentration an Silanolgruppen von $0,8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ (entspricht $0,48 \text{ Gruppen}/\text{nm}^2$) ermitteln.

$$\sigma = 11,7\sqrt{c} \sinh(19,5z\zeta) \quad (2-6)$$

mit z : Ladungszahl und c : Konzentration der Lösung (mol/l)

Bei der theoretischen Berechnung der Silanolkonzentration wurden je nach Bestimmungsmethode und SiO_2 -Typ zwischen 4 und 10 Hydroxylgruppen pro nm^2 (entspricht ca. 6 bzw. 16 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) errechnet [18]. Ein Grund für den über eine Zehnerpotenz kleineren Wert an Silanolgruppen in Kapillaren ist die unvollständige Hydroxylierung nach der

Herstellung, daher sollte das Material vor der eigentlichen Beschichtung mit Natronlauge aktiviert werden.

2.4.1. Atomkraftmikroskopie

Zur visuellen Darstellung von Oberflächenbeschaffenheiten im Nanometerbereich bietet sich die Atomkraftmikroskopie (AFM) an. Bei dieser Technik macht man sich Wechselwirkungen zwischen der AFM-Spitze und der Probe zu nutze. Durch anziehende oder abstoßende Kräfte kommt es beim Abrastern der Oberfläche zur Auslenkung einer weichen Biegefeder, dem sogenannten Cantilever. Die Messung dieser Auslenkung gibt Aufschluss über die Topographie der Probe. Als Material für den Cantilever wird meist Silicium oder Siliciumnitrid verwendet. Durch Funktionalisieren der Spitze kann man sogar Moleküle auf der Probe spezifisch erkennen.

Mit der AFM lassen sich auch Verläufe von chemischen Reaktionen verfolgen. So konnte der Adsorptionsprozess von Octadecyltrichlorsilan als Polysiloxan auf Kaliglimmer mit Hilfe von Flüssigkeitszellen dokumentiert werden [19]. Außerdem ist es möglich, die Einflüsse von Versuchsparametern wie Konzentration und Reaktionszeit auf die Entwicklung der Oberflächenabdeckung zu untersuchen [20].

Auch zur Charakterisierung von chemisch modifizierten fused silica Kapillaren kam die AFM schon zum Einsatz, so z. B. bei Kapillaren, die mit 1-Octadecen derivatisiert wurden. [21]. Bei einer dynamischen Beschichtung mit Reagenzien, die leicht von der negativ geladenen Kapillarwand adsorbiert werden, konnte mit Hilfe der AFM [22] die Wirkung von pH-Wert, Ionenstärke und Detergenzienkonzentration auf die Struktur der entstehenden Schicht untersucht werden. Selbst die Adsorption von Proteinen auf der Kapillarinnenseite von fused silica Kapillaren kann mit der Atomkraftmikroskopie veranschaulicht werden [23].

2.5. Modifizierung von fused silica Kapillaren

Eine sehr wichtige Problemstellung auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese nimmt die permanente Belegung der fused silica Kapillaren ein. Da durch die Deprotonierung der Silanolgruppen auf der Kapillarinnenwand eine negative Ladung resultiert, kommt es bei der Trennung von positiv geladenen Analyten oft zu Adsorptionserscheinungen. Diese führen zu Bandenverbreiterungen und bewirken somit Verluste in der Trenneffizienz. Weiterhin beeinflusst der typische EOF in Abhängigkeit vom pH-Wert die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen. Aus diesen Gründen versuchen Forscher seit vielen Jahren, durch die

Modifizierung der fused silica Kapillaren die Einsatzmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese zu erweitern. Anlehnend an die Flüssigchromatographie erfolgte zunächst das Belegen mit funktionellen Silanen unterschiedlicher Kettenlänge entsprechend der klassischen Silanchemie. Da die Siloxan-Bindungen nur über eine begrenzte Hydrolysestabilität verfügen, wurde das Verfahren erweitert. Es entwickelte sich eine grundlegende Technik, die aus drei Schritten besteht: dem Aktivieren (meist mit NaOH), der Einführung einer Doppelbindung z. B. durch ein bifunktionelles Silan [24] und schließlich die Anbindung des Polymers. Durch das Ersetzen der Siloxanbindung gegen eine Si-C-Bindung mittels GRIGNARD-Chemie kann die Hydrolysestabilität weiter erhöht werden [25]. Zur eigentlichen Polymerisation werden die Kapillaren mit einer Lösung bestehend aus Monomer, Katalysator, Radikalstarter und Lösungsmittel gefüllt. Nach Auswahl der entsprechenden Reaktionsparameter wie Konzentration, Temperatur und Zeit erfolgt die Polymerisation dann häufig nach dem Prinzip der freien Radikalpolymerisation. Somit ist es möglich Polymerschichten unterschiedlichster Eigenschaften zu erhalten. Zum Beispiel sind neutrale hydrophile Beschichtungen wie Poly(acrylamid) (PAA) [24] und „tentacle-like“ Oligourethane [26] oder auch geladene hydrophile Beschichtungen wie mit dem positiven Copolymer Vinylimidazol [27] entwickelt worden. Einigen Beschichtungsmethoden liegt keine Silantechnik zugrunde. Bei diesen erfolgt die direkte Adsorption des Polymers unter Einwirkung von Wärme. Als Standardbeispiel sind hier die mit Poly(vinylalkohol) (PVA) belegten Kapillaren [28, 29] aufzuführen. Im Falle von Polymethylglutamat (PMG) [30] erfolgt zunächst die Adsorption vom monomeren N-Carboxyanhydrid des α -Methylglutamates. Dieses polymerisiert dann in einer thermischen Reaktion unter Abspaltung von Kohlendioxid. Weitere Beschichtungsmöglichkeiten sind in dem Review von Horváth und Dolnik aufgeführt [31].

Neben der Belegung der Kapillarinnenwand wird auch häufig die gesamte Kapillare mit Packungsmaterial gefüllt. Da diese Technik die hohe Effizienz der Kapillaronenelektrophorese mit der Selektivität der Flüssigchromatographie verbindet, bezeichnet man sie als Kapillarelektrochromatographie (CEC). Dabei haben sich vor allem Monolithen durch ihre einfachere Herstellung als Packungsmaterial bewährt [32, 33]. Derartige Modifizierungen verfolgen heutzutage jedoch nicht mehr nur das Ziel einer leistungsstarken Trennung, sondern sind teilweise sogar mit Enzymaktivität [34] ausgestattet. In einer Veröffentlichung von Kato [35] wurde unter Verwendung der Sol-Gel-Chemie Pepsin in einen photopolymerisierten Sol-Gel-Monolith (Methacryloxypropyltrimethoxy-silan) eingeschlossen. Somit konnten in einem Teil der Kapillaren Proteine mittels Verdau in Peptide zerlegt werden, um sie dann im pepsinfreien Kapillarteil zu trennen.

Die beschriebenen Modifizierungsmethoden stellen nur einen Ausschnitt aus einer breiten Palette an Möglichkeiten vor. Oftmals sind jedoch die pH-Bereiche, in denen effektiv und reproduzierbar mehrere Trennungen durchgeführt werden können, eingeschränkt. Da es bei in-situ Polymerisationen häufig zu Kapillarverstopfung infolge von freien Oligomeren kommt, sollte die Anwendbarkeit der radikalischen Atomtransferpolymerisation bei der Belegung der Kapillaren näher untersucht werden.

2.5.1. Radikalische Atomtransferpolymerisation

Der Begriff „radikalische Atomtransferpolymerisation“ oder auch kurz als ATRP bezeichnet, wurde 1995 von Wang und Matyjaszewski [36] eingeführt. Es handelt sich dabei um eine Polymerisation, der die radikalische Atomtransferaddition (ATRA) zugrunde liegt. Das Prinzip von ATRA und wie man damit zur ATRP gelangt soll mit Abbildung (2-5) kurz erläutert werden.

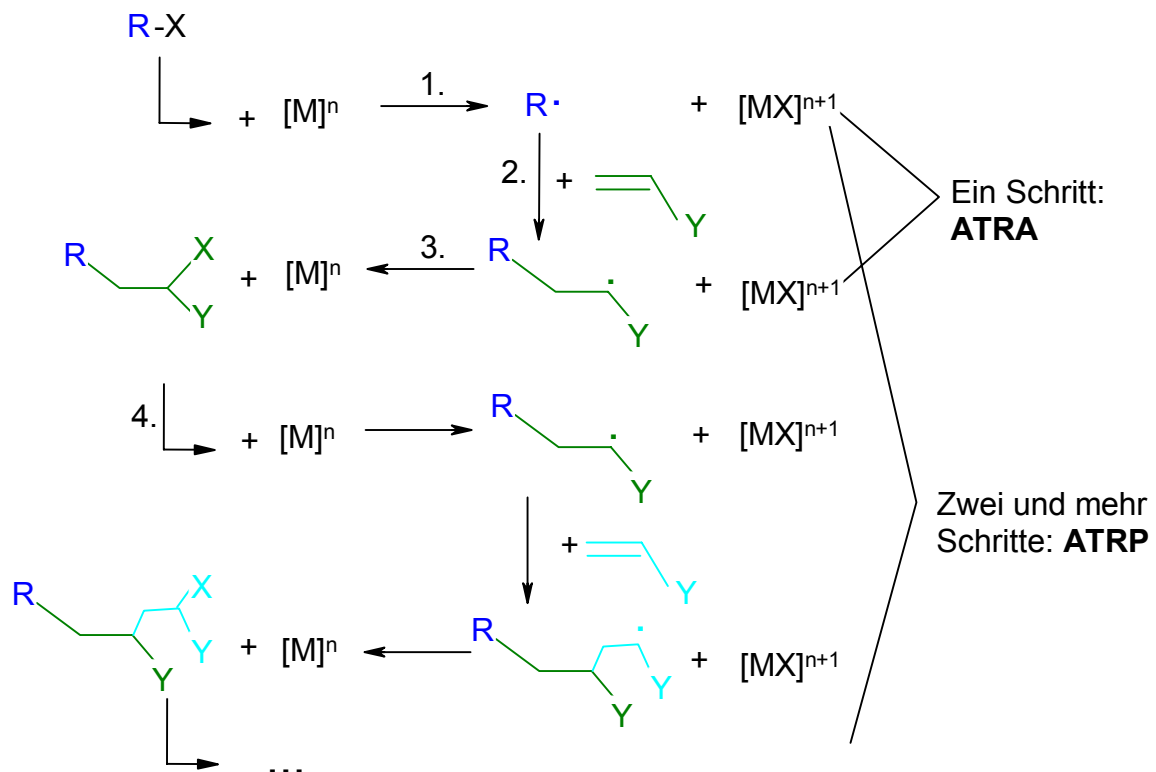


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der ATRA und der sich davon ableitenden ATRP

In einem ersten Schritt (1.) erfolgt mit Hilfe eines Übergangsmetallkomplexes $[M]^n$ die Entfernung eines Halogenatoms aus einem organischen Molekül (Initiator) $R-X$. Dadurch entsteht ein oxidiertes Metallkomplex $[M]^{n+1}$ und ein freies Radikal $R\cdot$, welches in einer zweiten Reaktion (2.) mit einem Alken reagiert. In einer Rückübertragungsreaktion (3.) des

Halogens auf das neu entstandene Kohlenstoffgerüst erhält man den ursprünglichen Übergangsmetallkomplex zurück und ein um eine Einheit verlängertes Molekül. Der Prozess kann nun von vorn beginnen (4.) so dass längere Ketten entstehen, es tritt also eine Polymerisation ein. Da durch die Konzentration des als Katalysator fungierenden Übergangsmetallkomplexes die Reaktion gesteuert wird, spricht man von einer „lebenden“ kontrollierten radikalischen Polymerisation.

Der Übergangsmetallkomplex setzt sich aus einem Katalysator und einem Komplexliganden zusammen, wobei verschiedene Variationen möglich sind. Eine Zusammenfassung zur ATRP mit allen bis dahin beschriebenen Systemen liefert ein Review von Matyjaszewski [37]. Darin werden auch Metallkomplexe mit anderen Übergangsmetallen außer Kupfer beschrieben. Die Liganden können neben Stickstoff ebenso gut auf Phosphor basieren oder ein Sauerstoffzentrum besitzen wie z. B. Phenole. Für den Fall, dass das gewünschte Polymer nicht in seinem Monomer löslich ist, muss ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden. Außerdem unterstützt das Lösungsmittel (z. B. DMF, Toluol, Alkohole, Wasser...) den Kettentransfer sowie die Löslichkeit und Struktur des Katalysatorkomplexes. Die ATRP wurde bald dazu genutzt, Polymere gezielt an Oberflächen anzubinden. Durch die Verwendung eines bifunktionellen Initiators können so Silicateilchen z. B. mit Polystyren [38, 39], Poly(methylmethacrylat) [39, 40] oder eben auch Quarzkapillaren mit z. B. Polyacrylamid [41] beschichtet werden. Der Vorteil dieser Technik ist, dass diese kontrollierte Kettenreaktion direkt von der Oberfläche aus startet. Dadurch entstehen kaum gelöste Polymere, die bei der Anwendung in englumigen Kapillaren zu Verstopfungen führen könnten.

2.6. ESI-TOF-Massenspektrometrie

Um die Auftrennung der Analyten in den beschichteten Kapillaren verfolgen zu können, kann man außer der direkten UV-Detektion auch ein extern angeschlossenes Massenspektrometer nutzen. Dabei eignet sich die Elektrospray-Ionisierung-Massenspektrometrie neben der Matrix unterstützten Laser Desorption und Ionisierung-Massenspektrometrie (MALDI-MS) am besten zur Massenanalyse von Peptiden und Proteinen. Da die Biomoleküle bei diesem „schonenden“ Ionisierungsverfahren nicht zerstört werden, können einfach und schnell Molmassebestimmungen durchgeführt werden.

Doch auch die Weiterentwicklung des Massenanalysators zur Quadrupol-Massenspektrometrie oder Time-of-flight-Massenspektrometrie (TOF-MS) führten zu einer weiteren Verbesserung in Empfindlichkeit und Auflösung sowie schnelleren Analysezeiten. Schließlich erhält man durch Tandem-MS-Geräte außer der Molmasse weitere (Sequenz-) Informationen. Mit dem Massenspektrometer als Detektor verfügt man über einen großen dynamischen Bereich und es liefert auch bei absoluten Mengen von wenigen Femtomol Sequenz-Spektren hoher Qualität [42]. Zur Bearbeitung dieses Themas stand ein Mariner ESI-TOF-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems zur Verfügung. Anhand des gerätespezifischen Aufbaus (Abbildung 2-6) sollen das Wirkprinzip und die Funktionsweise der einzelnen Bauteile im nachfolgenden näher erläutert werden.

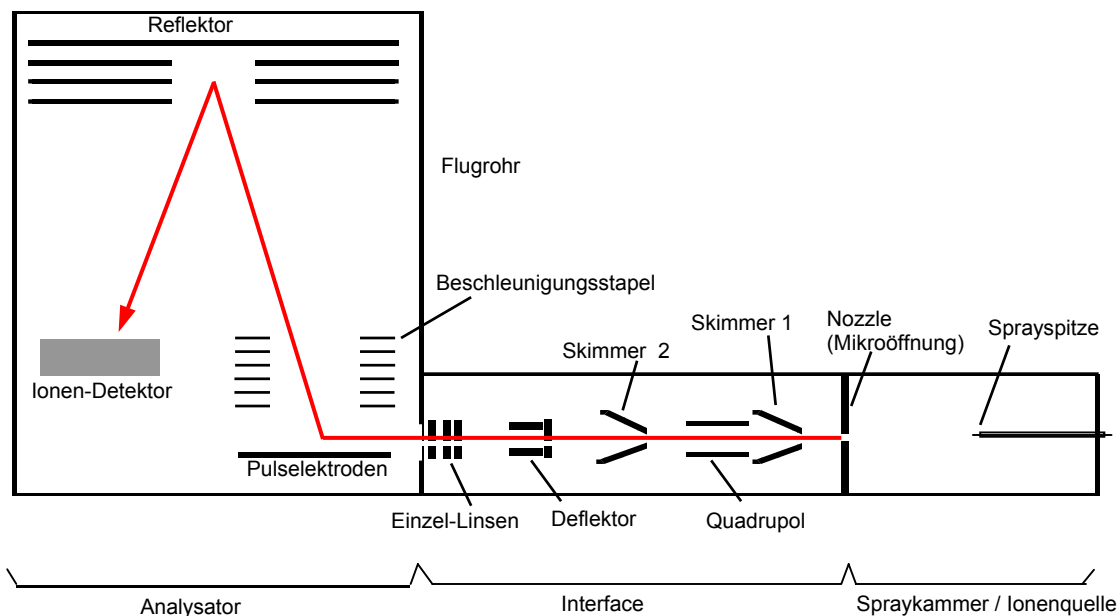


Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau des verwendeten Mariner ESI-TOF-Massenspektrometers [43]

2.6.1 Elektrosprayionisierung

Bei der Elektrosprayionisierung wird die Probenlösung beim Austritt aus einer dünnen Kapillare in einem elektrostatischen Feld von einigen Kilovolt in einen feinen Nebel zerstäubt (Abbildung 2-7). Dabei bildet sich am Ende der Kapillare ein Flüssigkeitskegel (Taylor-Konus) aus, der in ein feines aus Tröpfchen bestehendes Filament übergeht. Durch das Verdampfen von Lösungsmittel kommt es zu einer Schrumpfung der Tröpfchen und einem damit verbundenen Ladungsanstieg. Für den weiteren Verlauf der Reaktion bis zur Bildung von desolvatisierten Ionen existieren zwei Theorien [44]:

- Beim *Charged-Residue Model, CRM*, geht man davon aus, dass die Tröpfchen zerplatzen sobald die Coulomb-Abstoßung zwischen den Ionen das Gleichgewicht zur Oberflächenspannung erreicht hat. Durch mehrere aufeinanderfolgende Coulomb-Explosionen erhält man sehr kleine Tröpfchen (Radius ca. 1 nm), die eine oder mehrere Überschussladungen, aber nur ein Analytmolekül tragen.
- Das Vorliegen hochgeladener Tröpfchen, die eine große Anzahl an Analytionen enthalten, ist die Theorie des *Ion Evaporation Model, IEM*. Durch Verringerung des Tröpfchen-Radius kommt es zur Überschreitung des RAYLEIGHT-Limits, was wiederum zur Emission freier Ionen in die umgebene Gasphase führt.

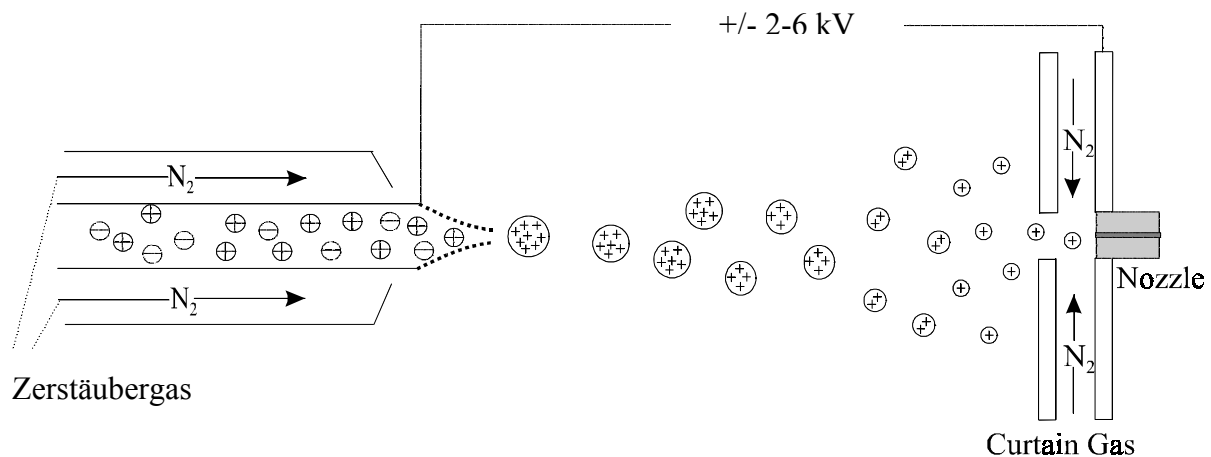


Abbildung 2-7: Ionenbildung bei der Elektrospray-Ionisation

Ein konzentrisch gleichgerichteter Stickstoffstrom (Zerstäubergas) führt zu einer effektiven Vernebelung der Analysenflüssigkeit. Die Desolvatisierung wird durch einen dem Spray entgegen gesetzten warmen trockenen Stickstofffluß (Curtain Gas) unterstützt. Außerdem hindert dieser Luft oder Lösungsmittel am Eintritt in den Analysator, welche zu Kontaminationen und damit zu einer Empfindlichkeitsreduzierung führen.

Voraussetzung für die Ionisierung der Analyten ist ihre Löslichkeit in einem Lösungsmittel geeigneter Leitfähigkeit. Durch den Zusatz von Elektrolyten in Form von Säuren oder Basen wird die Molekülionenbildung gefördert.

2.6.2 Quadrupol-System

Das Quadrupol-System gehört zum Interface und bewirkt eine Fokussierung des Ionenstroms, bevor dieser weiter zum Analysator transportiert wird. Der Quadrupol besteht aus vier parallelen Metallelektroden, wobei die gegenüberliegenden Stäbe jeweils die gleiche Polarität an Gleichspannung und die selbe Phase der Wechselspannung aufweisen. Durch den Wechsel

an Polarität und der um 180° versetzten Wechselspannung beschreiben die Ionen beim Durchqueren der Stäbe Oszillationen. Nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis bewegen sich auf stabilen Bahnen, die anderen stoßen mit den Metallstäben zusammen und werden so aussortiert. Durch Änderung der Gleichspannung bzw. Wechselspannung können die gewünschten Ionen in den stabilen Bereich des Quadrupols gebracht werden (Abbildung 2-8).

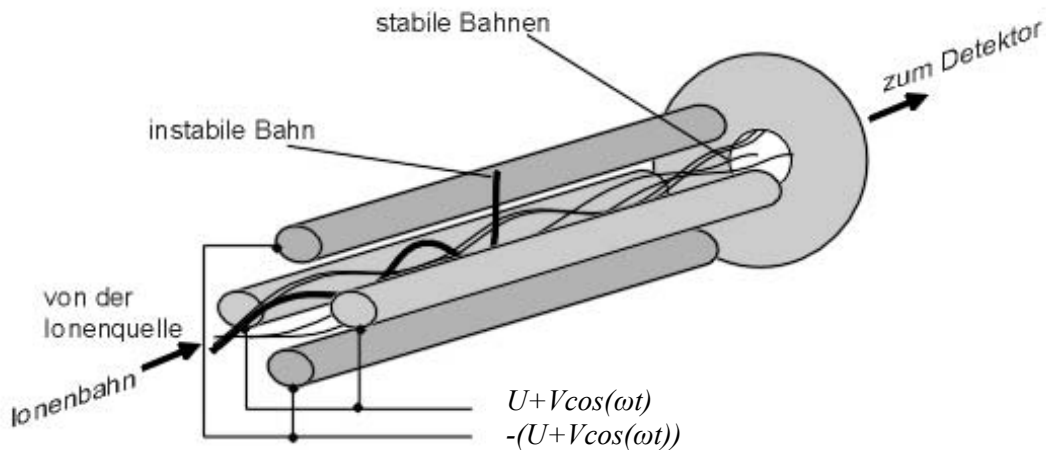


Abbildung 2-8: Aufbau des Quadrupol-Systems [45], mit U = Spannung; ω = Kreisfrequenz; t = Zeit; V = magnetische Spannung

Das Quadrupol-System kommt auch selbst als Analysator zum Einsatz. Da allein das vorgegebene Feld entscheidet, welche Ionen passieren dürfen, wirkt er wie ein Massefilter.

2.6.3. Flugzeit-Massenspektrometer

Beim Flugzeit- oder auch Time-of-Flight-Massenspektrometer wird die Zeit t gemessen, die die Ionen für eine festgelegte Wegstrecke s benötigen. Dazu werden alle Ionen mit einer gleichen kinetischen Energie E_{kin} versehen. Die Auftrennung von der Quelle bis zum Detektor erfolgt entsprechend dem Verhältnis von Masse m zur Anzahl der Ladungen z nach Gleichung 2-7 [46].

$$t = s \cdot \left(\frac{m}{(2E_{kin})z} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2-7)$$

Durch das Addieren von Einzelmessungen kann das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Da die Driftstrecke der Ionen von der Größe des Massenspektrometers abhängt, ist die Auflösung der Spektren begrenzt. Durch den Einsatz von Reflektoren kann die Wegstrecke verlängert werden und damit verbessert sich auch die Peaktrennung. Im Reflektor

herrscht ein homogenes elektrisches Feld. Dieses bremst die Ionen ab und reflektiert sie schließlich in Richtung Detektor. Je höher die Geschwindigkeit oder kinetische Energie der Ionen ist, umso weiter dringen sie in den Reflektor vor. Damit benötigen sie mehr Zeit als langsamere Ionen, die den Reflektor zwar später erreichen, jedoch kaum in das Innere des Reflektors gelangen (Abbildung 2-9).

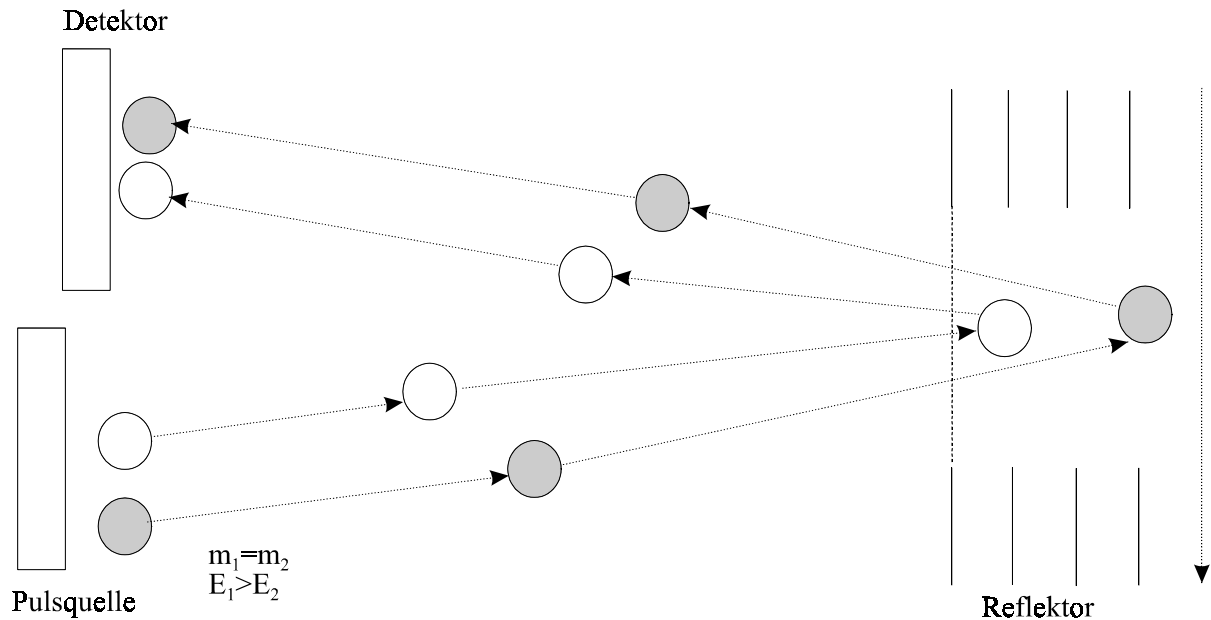


Abbildung 2-9: Wegstrecke von Ionen im Reflektor-TOF-Flugrohr

Ionen gleicher Masse aber unterschiedlicher Energie können so gebündelt werden [46]. Somit dient der Reflektor nicht nur zur Verlängerung der Wegstrecke, sondern er kann auch Energieunterschiede kompensieren und dadurch die Auflösung weiter verbessern.

2.6.4. Kopplung der CE mit der ESI-TOF-MS

Für die Kopplung der CE mit der MS stehen unterschiedliche instrumentelle Systeme zur Verfügung. Generell unterscheidet man in sheath-flow Interfaces und sheathless Interfaces. Beim sheath-flow Interface [47] steckt die CE-Kapillare in einem Metallröhrchen (Elektrospraynadel) mit festgelegtem Potenzial. Durch dieses Röhrchen fließt eine Flüssigkeit (sheath-flow), die sich am Kapillarende mit der Analytlösung vermischt und ein stabiles Spray bildet [48]. Vorteilhaft ist die leichte Instrumentierung und einfache Durchführung, nachteilig wirkt sich der Verdünnungseffekt der Probe durch den zusätzlichen sheath-flow aus. Das sheathless Interface [49] verfügt über eine besonders hohe Sensitivität, denn die Analytlösung wird nicht verdünnt. Die elektrische Verbindung des Kapillarauslasses wird durch den direkten Kontakt von Flüssigkeit und Metall gewährleistet. Dies geschieht entweder mit

metallbeschichteten (meist vergoldete) Kapillarenden oder dem Einführen eines Drahtes in die Kapillare. Dies kann jedoch zur Bildung von Gasblasen aufgrund der Redoxreaktion des Wassers führen [50]. Die metallbeschichteten Kapillarenden verfügen nur über eine begrenzte Lebensdauer. Als Alternative dazu bietet Chang eine Beschichtung aus Graphit an [51].

2.6.5. Proteine und ihre Signale in der ESI-MS

Proteine entstehen durch die lineare Kondensation von Aminosäuren. Die Anzahl der entstandenen Peptidbindungen $-CO-NH-$ sowie die räumliche Anordnung der Aminosäuren bestimmen die Eigenschaften des Makromoleküls. So gibt die Primärstruktur die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein wieder. Die geometrische Faltung der Polypeptidketten wird durch die Sekundärstruktur ausgedrückt. Die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturbestandteile zueinander beschreibt wiederum die Tertiärstruktur. Da viele Proteine mit einer molaren Masse über 100 kDa aus mehr als einer Polypeptidkette bestehen, wird ihre Anordnung als Quartärstruktur bezeichnet [52]. Entscheidend für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren sind die möglichen Ladungen des Proteins, welche durch die Seitenketten der Aminosäuren bestimmt werden. So sind Histidin, Lysin und Arginin im physiologischen pH-Bereich (pH ca. 7) positiv geladen, während Glutaminsäure und Asparaginsäure negativ geladen sind [52]. Die Anzahl dieser Aminosäuren bestimmt also den maximal möglichen Ladungszustand des Proteins je nachdem, ob im positiven oder negativen Ionenmodus gemessen wird. Die Entstehung der beobachteten Mehrfachladungen im ESI-MS-Spektrum von Peptiden bzw. Proteinen (Abbildung 2-10) soll kurz erläutert werden.

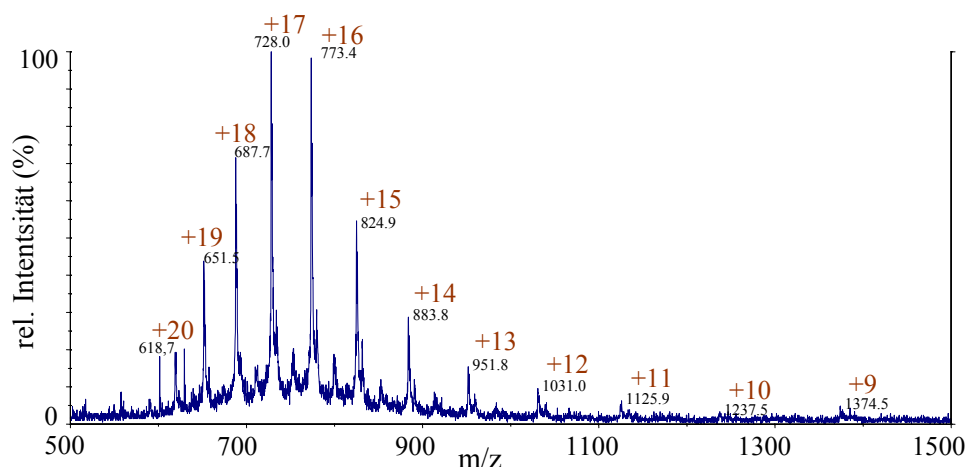


Abbildung 2-10: ESI-MS Spektrum von Cytochrom c, braune Zahlen über den Peaks geben den Ladungszustand wieder

Auf die beschriebenen funktionellen Gruppen sowie auf die terminale Aminogruppe können vom protonierten Lösungsmittelmolekül der wässrigen Phase Protonen übertragen werden. Durch unvollständige Protonierung der biologischen Analyten entstehen mehrere Massepeaks, die sich nur durch die Anzahl der aufgenommenen Protonen unterscheiden. So sind für ein Molekül der Masse $M = 1500$, welches dreifach geladen sein kann, Peaks folgender Masse/Ladungsverhältnisse möglich (Gleichung 2-8) [44]

$$\begin{array}{rclcl}
 & & & \underline{m/z} & \\
 (M+1H)^{1+}: & (1500+1)/1 & = & 1501 & \\
 (M+2H)^{2+}: & (1500+2)/2 & = & 751 & (2-8) \\
 (M+3H)^{3+}: & (1500+3)/3 & = & 501 &
 \end{array}$$

Anhand der resultierenden Massenspektren kann man durch die Betrachtung der Massen m_1 und m_2 zweier direkt benachbarter Peaks, welche ein und demselben Molekül angehören und sich nur um eine Ladung unterscheiden, auf deren Ladungszustand z_2 schließen (Gleichung 2-9) [44].

$$z_2 = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1} \quad (2-9)$$

Weiterhin lässt sich bei bekannter Ladung schließlich auch die molare Masse M des Analyten bestimmen (Gleichung 2-10).

$$M = z_2(m_2 - 1) \quad (2-10)$$

Diese als Deconvolution bezeichnete Entschlüsselung der ESI-Massenspektren kann oftmals auch direkt mit der Software des MS ausgeführt werden und ist besonders bei der Identifizierung der Analyten hilfreich. Die Intensität und Verteilung der einzelnen Massepeaks ist neben den zur Verfügung stehenden Protonen auch von der Konzentration des Analyten abhängig. Im Zusammenhang mit der IEM-Theorie (Abschnitt 2.6.1) wird davon ausgegangen, dass die Ladung der Ionen von der Ladung des Tropfens im Moment der Gasphasenumwandlung abhängig ist. Durch die Abnahme der Tröpfchengröße während der Verdampfung nimmt die Ladungsdichte zu. Je nach Verdampfungsgrad und Anzahl der im Tröpfchen befindlichen Analyten stehen also unterschiedliche Mengen an Ladungen pro Molekül zur Verfügung. Diese Tatsache führt zu höher und niedriger geladenen Ionen und bewirkt somit ebenfalls eine Ladungsverteilung [53].

Einen weiteren Einfluss auf die Spektrensignale übt die Isotopie der Elemente aus. Durch die unterschiedliche Anzahl an Neutronen im Atomkern resultieren unterschiedliche molare Massen. In Abbildung 2-11 wird die theoretisch erwartete Isotopenverteilung des Molekülions $(M+3H)^{3+}$ für das Peptid Angiotensin dargestellt.

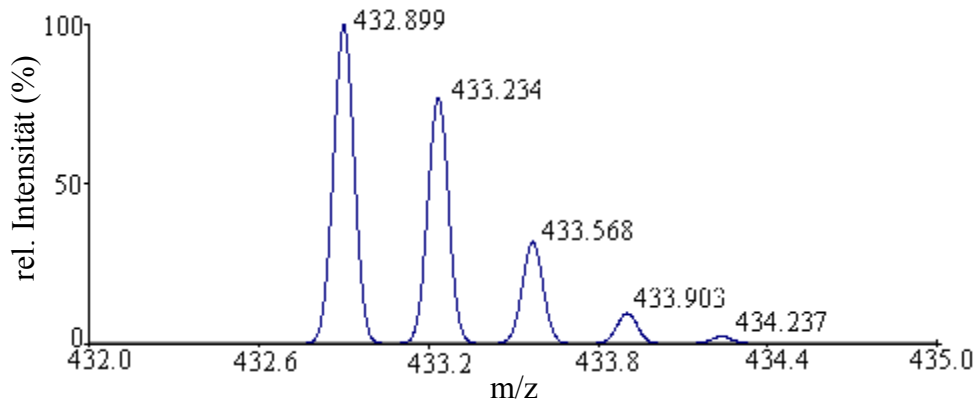


Abbildung 2-11: Berechnete Isotopenverteilung für das dreifach geladene Molekion des Peptides Angiotensin I (DRVYIHPFHL)

Der Isotopeneffekt wirkt sich vor allem auf die Spektren größerer Bio-Moleküle aus, denn durch die natürliche Häufigkeit des ^{13}C -Isotops von 1,1% erhält man eine breitere und stärker symmetrische Verteilung des Signals. Allerdings beobachtet man auch mit steigender molarer Masse der Moleküle eine abnehmende Basislinientrennung zwischen den Isotopenpeaks in den ESI-MS-Spektren. Dies liegt an der maximal möglichen Auflösung R , die vom eingesetzten MS-Gerät abhängig ist. Die Molekülmassen werden unterteilt in nominelle, monoisotopische und durchschnittliche Masse. Dabei berechnet sich die erste aus den ganzzahligen Massen des häufigsten Isotops eines Elementes, die zweite aus den exakten Massen dieses Isotopes. Die durchschnittliche Masse bezeichnet die exakte Atommasse aller Isotope in ihrer natürlichen Häufigkeit.

2.6.6. Identifizierung von Proteinen mittels Trypsinverdau

Um bekannte wie auch neu entdeckte Proteine zu identifizieren bzw. zu charakterisieren, ist die Abfolge ihrer Aminosäuresequenzen von grundlegender Bedeutung. Zu diesem Zweck führt man eine Microsequenzierung mit Hilfe des EDMAN-Abbau's [54] durch. Dabei erfolgt durch sukzessiven Abbau der endständigen Aminosäure die Entschlüsselung der Sequenz. Diese Methode arbeitet jedoch nur bis zu einer Sequenzlänge von 50 Resten zuverlässig. Aus diesem Grund muss man länger-kettige Polypeptide zunächst mit chemischen oder enzymatischen Methoden spezifisch spalten. Ein häufig verwendetes Enzym ist das Trypsin. Diese Protease kommt im Magen vieler Säugetiere vor und hydrolysiert Peptidketten immer an der carboxyterminalen Seite von Arginin- oder Lysinresten (Abbildung 2-12), außer nach einem Prolinrest.

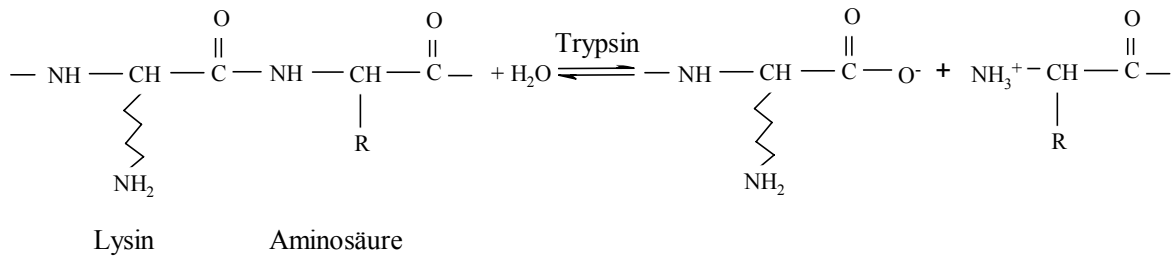


Abbildung 2-12: Tryptische Spaltung einer Peptidbindung

Auf diese Weise erhält man eine festgelegte Menge an Peptiden, mit denen man nach chromatographischer Trennung einen EDMAN-Abbau durchführen kann. Alternativ zur chemischen Abspaltung wird zur Sequenzierung auch eine Kombination von Leitersequenzierung und MALDI-TOF-MS eingesetzt [55]. Dabei wird in aufeinanderfolgenden Zyklen immer die N-terminale Aminosäure abgespalten, so dass man schließlich ein Gemisch von Peptiden mit n, n-1, n-2, n-3... Aminosäuren und ein Restpeptid mit freiem N-Terminus erhält. Mit dem MALDI-TOF-MS werden dann schließlich die Massen der verkürzten Peptide detektiert, wobei man anhand der auftretenden Massendifferenzen auf die abgespaltenen Aminosäuren und damit die Primärsequenz schließen kann. Ein noch geringerer Aufwand ist bei der Tandem-MS notwendig. Hierbei erfolgt die Sequenzierung der Peptide in der Kollisionszelle des Massenspektrometers. Es entstehen typische Ionenserien (y- und b-Fragmente) aus denen die Sequenz rekonstruiert werden kann, heutzutage auch schon durch MS-Software unterstützt.

3. Experimenteller Teil

3.1. Beschichtung der fused silica Kapillaren bzw. Wafer

Aktivierung der Kieselglasoberfläche

Vor der eigentlichen Beschichtung muss die Oberfläche der fused silica Kapillaren mit Natronlauge aktiviert werden. Dieser Schritt bewirkt neben der Reinigung auch eine vollständige Hydroxylierung der Silanolgruppen.

Zu diesem Zweck wurden 1 bis 2 m lange Kapillarstücke zunächst 10 min mit 1 M NaOH gespült, mit Siliconsepten verschlossen und für 2 h auf 110 °C erhitzt [56]. Anschließend spült man für ca. 30 min mit deionisiertem Wasser, 15 min mit 0,2 M HCl und nochmals 15 min mit deionisiertem Wasser [42]. Diese Reihenfolge ist wichtig, damit es nicht zur unerwünschten Salzbildung und damit zur Verstopfung der Kapillare kommt. Nach einem kurzen Spülen mit Aceton wurden die Kapillaren unter Stickstofffluss bei 120 °C getrocknet. Der 10'' Wafer wurde vor der Behandlung zunächst mit einem Glasschneider in ca. 1 - 2 cm² große Stücke zerteilt, nebeneinander in eine mit 1 M NaOH gefüllte Glasschale gelegt und im Ölbad für 2 h auf 110 °C erhitzt.

Silanisierung

Die aktivierten Kapillaren werden auf die gewünschten Größen zugeschnitten und per Glühdraht einer Widerstandsheizung wird ein ca. 3 mm langes optisches Fenster in die Polyimidschicht gebrannt. Dann erfolgt die kovalente Anknüpfung eines Alkylhalogenides an die Kapillarinnenwand, von wo aus dann die eigentliche Polymerisation nach dem ATRP-Mechanismus gestartet wird.

Bei den Silanisierungsreagenzien handelte es sich um Trichlorsilyl-(m/p-chlormethylphenyl)-ethan bzw. 11-(2-Brom-2-methyl)propionyloxy)undecyltrichlorsilan (Abbildung 3-1). Letzteres wurde in einer Kooperation mit dem Institut für Anorganische Chemie an der TU Bergakademie Freiberg nach der Vorschrift von Matyjaszewski [57] hergestellt, wobei die Syntheseanleitung für den dafür notwendigen KARSTEDT's Katalysator einer Veröffentlichung von Lewis entnommen wurde [58]. Diese bifunktionellen Silane verfügen über funktionelle Gruppen, die zum einen mit den Silanolgruppen der Quarzoberfläche reagieren und zum anderen als Startmolekül für die ATRP dienen. Die Silanisierungsreagenzien wurden im Verhältnis 1:3 in wasserfreiem Toluol gelöst, in die vorbereitete Kapillare gefüllt, diese mit Siliconsepten verschlossen und für 18 h bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss daran

erfolgte ein ca. 15 minütiges Spülen mit trockenem Toluol. Im Falle des Bromalkylsilans war der Silanisierungsschritt mit dem Spülen von Aceton für 5 min und dem einstündigen Trocknen bei 120 °C unter Stickstofffluss abgeschlossen.

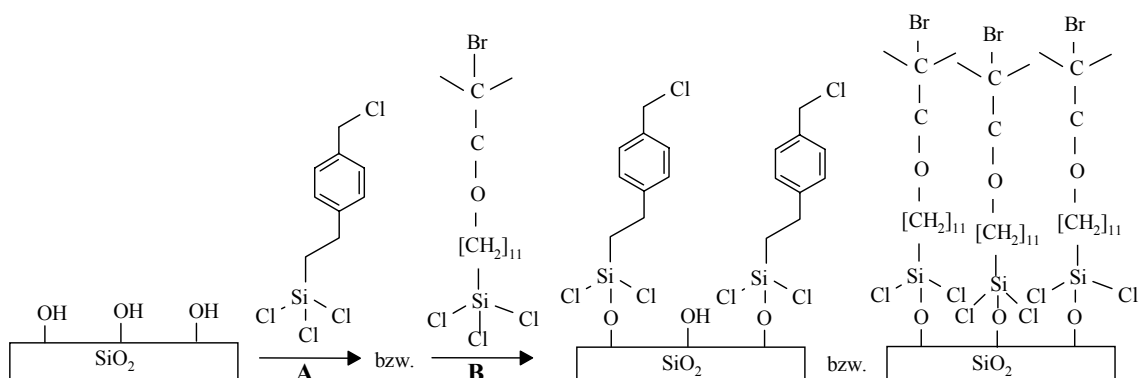


Abbildung 3-1: Silanisierung der fused silica Oberfläche mit dem Chloralkylsilan (Schritt A) oder dem Bromalkylsilan (Schritt B)

Beim Chloralkylsilan wurde ein zweiter Silanisierungsschritt mit 3-Chlorpropyltrichlorsilan analog zum Trichlorsilyl-(m/p-chlormethylphenyl)-ethan durchgeführt. Dieses im Molekülumfang kleinere Reagenz sollte mit freien Silanolgruppen zwischen dem bereits gebundenen Trichlorsilyl-(m/p-chlormethyl-phenyl)-ethan reagieren. In einer weiteren Reaktion erfolgt dann die Hydrolyse der verbleibenden Si-Cl-Bindungen mit 0,1 M Essigsäure bei 80 °C, um die Sauerstoffverbrückung zwischen den einzelnen Silanisierungsreagenzien zu gewährleisten (Abbildung 3-2).

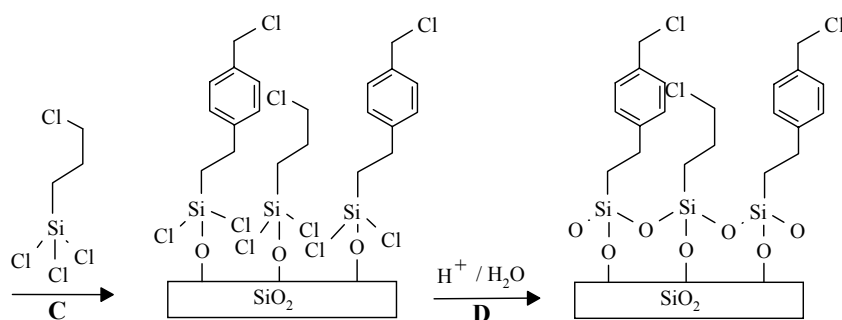


Abbildung 3-2: Silanisierung mit einem weniger raumfüllenden 3-Chlorpropyltrichlorsilan (Schritt C) und Hydrolyse mit verdünnter Essigsäure (Schritt D)

Außerdem konnten mit Durchführung dieses Schrittes reproduzierbarere Migrationszeiten erhalten werden [59]. Zum Schluss erfolgten Spülschritte mit Wasser (ca. 15 min) und Aceton (5 min) sowie die Kapillartrocknung unter Stickstofffluss bei 120 °C. Durch die Hydrolyseempfindlichkeit der Silane war die Silanisierung der Wafer etwas schwieriger. Damit die Bruchstücke während der Reaktion nicht aneinander haften, wurden sie nebeneinander in eine mit Reagenz gefüllte Kristallisationsschale gelegt. Das Abkleben der

Öffnung mit Parafilm und anschließendes Spülen mit Stickstoff sollte eine möglichst feuchtigkeitsarme Luft gewährleisten. Zusätzlich wurde die so präparierte Kristallisationsschale für die 18 h Reaktionszeit in einen Exsikkator gestellt. Nach abgeschlossener Silanisierung zeigten die Wafer einen merklich hydrophoben Charakter, d. h. flach auf wässrige Lösungen gelegt schwammen sie auf deren Oberfläche.

In-situ-Polymerisation

Nach der Anbindung des bifunktionellen Silanisierungsreagenzes kann nun mittels radikalischer Atomtransferpolymerisation (ATRP) das Polyacrylamid aufgebracht werden. Dies erfolgte je nach Silan und gewähltem Lösungsmittel auf unterschiedliche Weise und wird mit der nachfolgenden Tabelle 3-1 näher erläutert.

Tabelle 3-1: Reaktionsbedingungen für die Polymerbeschichtung von Kapillaren und Wafern

Alkylsilan	Lösungsmittel	Katalysatormenge/-art	Menge Ligand	Reaktionstemperatur	Reaktionszeit
Chloralkylsilan	DMF	2 mg CuCl	6,32 mg Bipyridin	80 °C	4 h
Chloralkylsilan	Wasser/ Methanol	14,7 mg CuCl	40 mg Bipyridin	RT	2 h
Bromalkylsilan	DMF	2,9 mg CuBr	6,32 mg Bipyridin	80 °C	4 h
Bromalkylsilan	Wasser/ Methanol	2 mg CuCl	6,32 mg Bipyridin	RT	2 h

Zur Herstellung der Reaktionslösung wurden die jeweiligen Mengen an Katalysator und Bipyridin in 500 µl Lösungsmittel unter Zuhilfenahme des Ultraschallbades gelöst. Der in allen Fällen entstandenen roten Lösung wurde 500 µl HEMA zugesetzt und diese Mischung in die Kapillaren gefüllt (Abbildung 3-3). Nach den entsprechenden Reaktionszeiten bei den optimalen Reaktionstemperaturen erfolgte das Ausspülen der Reaktionslösung aus den Kapillaren mit dem gewählten Lösungsmittel. Dem folgte ein 20 minütiges Spülen mit Wasser, um die polymerbeschichtete Kapillare von den Reagenzien aus dem Herstellungsprozess zu reinigen.

Zur Beschichtung der Waferbruchstücke wurden diese in die Reaktionslösungen getaucht und bei den entsprechenden Temperaturen zur Reaktion gebracht. Nach anschließendem Spülen mit Lösungsmittel und Wasser waren sie für nachfolgende AFM-Aufnahmen fertig modifiziert.

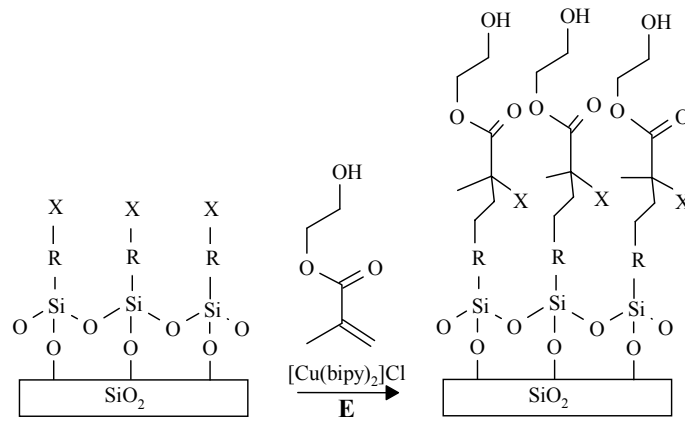


Abbildung 3-3: Anbindung des HEMA an die mit Startermolekülen modifizierte Kapillareninnenwand (Schritt E)

3.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen für die ATRP mit Hilfe von GC-Experimenten

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die bromalkylsilanisierten Kapillaren zu ermitteln, wurde ein Versuchsplan erstellt, der die Variation folgender Bedingungen enthielt:

- Temperatur: Änderung zwischen 20 °C, 40 °C, 60 °C und 80 °C
 - Zeit: Änderung zwischen 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h
 - Lösungsmittel: 100 % DMF oder 30 % / 70 % Wasser/Methanol (Erhöhung von 50 % auf 70 % war notwendig, da mit einem wasserunempfindlichen Flammenionisationsdetektor gemessen wurde)
 - Katalysator: CuCl oder CuBr
 - Katalysatorzusammensetzung: CuX : Bipyridin = 20 mol : 40 mol
oder CuX : Bipyridin = 149 mol : 256 mol
- | | | |
|-----------------------|----------------|----------------------|
| Konzentration pro ml: | CuCl/Bipyridin | 2 mg / 6,32 mg |
| | | bzw. 14,7 mg / 40 mg |
| | CuBr/Bipyridin | 2,9 mg / 6,32 mg |
| | | bzw. 21,3 mg / 40 mg |

Um den Umsatz an HEMA-Monomer zu ermitteln, wurden 9 cm lange Kapillarstücke mit dem Bromalkylsilan silanisiert und anschließend unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen polymerisiert. Danach wurde der Kapillarinhalt für 3 min mit Iso-Propanol (wenn Lösungsmittel = DMF) bzw. DMF (wenn Lösungsmittel = Wasser) in ein Gläschen gespült, in dem sich bereits 20 µl des betreffenden Spülreagenzes befanden. Nach der gaschromatographischen Untersuchung konnten die erhaltenen Peakflächen des HEMA-

Monomers FE_{HEMA} im Verhältnis zu einem inneren Standard (entweder DMF oder Methanol) $FE_{Standard}$ verglichen werden und der HEMA-Umsatz nach Gleichung (3-1) berechnet werden.

$$Umsatz = 100 - \left(100 \frac{\left(\frac{FE_{HEMA}}{FE_{Standard}} \right)_{Probe}}{\left(\frac{FE_{HEMA}}{FE_{Standard}} \right)_{Blindwert}} \right) \quad (3-1)$$

Die Ermittlung der Ausgangskonzentration des HEMAs in der Reaktionslösung erfolgte mit nicht silanisierten Kapillarstücken (Blindwert), in denen keine Polymerisation möglich war.

Es wurde eine 25 m lange GC-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm verwendet. Bei der stationäre Phase handelte es sich um quervernetztes Methylsilicon mit einer Filmdicke von 0,11 μm .

Messbedingungen für die GC:

- isotherme Ofentemperatur von 80 °C
- Grenzwert für Ofentemperatur 230 °C
- Temperatur des Injektionssystems 270 °C
- Temperatur des Detektorsystems 300°C

3.3. Methoden

Herstellung der Pufferlösungen

Für einen Liter 100 mM Phosphatpuffer:

Man löst entweder 137 g NaH_2PO_4 (pH 4,4; für die Pufferlösungen mit einem gewünschten pH von 3 - 6) oder 177,99 g Na_2HPO_4 (pH 8,8; für die Pufferlösungen mit pH-Werten > 6) in ca. 800 ml destilliertem Wasser. Unter Rühren erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit NaOH (0,1 M oder 1 M) oder Phosphorsäure (0,1 M oder 1 M). Anschließend überführt man die Lösung in einen Messkolben und füllt bis zum Eichstrich auf. Nachdem der Puffer filtriert und im Ultraschallbad entgast wurde, wird er im Kühlschrank aufbewahrt. Die Verdünnung auf die für die Trennung benötigte Konzentration erfolgte erst kurz vor dem Gebrauch direkt im Vial.

Für einen Liter 100 mM Formiatpuffer:

Man löst 63,03 g Ammoniumformiat (pH 6,4) in 800 ml destilliertem Wasser. Unter Rühren erfolgte die Einstellung des pH-Wertes unter Zugabe von verdünnter Ameisensäure. Danach wurde die Lösung in Maßkolben überführt, aufgefüllt, filtriert, entgast und im Kühlschrank gelagert.

Messung der DMSO-Beweglichkeit

Zur Bestimmung der Stärke des elektroosmotischen Flusses wurde in den Kapillaren die Beweglichkeit der Neutralsubstanz DMSO bestimmt. Dabei wurden unter folgende Messbedingungen gearbeitet:

Kapillarlänge $L_{\text{eff}}/L_{\text{tot}}$:	24,5 cm / 32,5 cm
Spannung	:	30 kV
Konzentration von DMSO/Wasser	:	1 μl / ml
Injektionsmenge	:	40 mbar \cdot 3 s
Trennpuffer	:	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 3 – 10
Kassettemperatur	:	25 °C
Detektionswellenlänge	:	200 nm

Proteintrennung bei pH 3 mittels CZE

Zum Vergleich der Trennleistungen unterschiedlich beschichteter Kapillaren wurden 5 Proteine 10 mal hintereinander bei pH 3 unter folgenden Messbedingungen getrennt:

Kapillarlänge $L_{\text{eff}}/L_{\text{tot}}$:	56 cm / 64 cm
Spannung	:	30 kV
Proteine	:	Cytochrom c, Lactoglobulin A + B, Lysozym, Chymotrypsinogen
Konzentration je Protein in Wasser	:	1 mg / ml
Injektionsmenge	:	40 mbar \cdot 3 s
Trennpuffer	:	20 mM Phosphatpuffer pH 3, immer nach 3 Trennungen erneuert

Da eine Kopplung zwischen der CE und der ESI-MS geplant war, musste der Phosphatpuffer gegen einen leicht verdampfbaren Formiatpuffer ersetzt werden. Dazu wurde die Trennleistung bei unterschiedlichen Ammoniumformiatpufferkonzentrationen (20, 50, 70 oder 100 mM) bei pH = 3 näher untersucht. Als Trennkapillaren wurden chloralkylsilanierte Kapillaren, mit anschließender HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF bzw. im Wasser/Methanol-Gemisch, verwendet. Die übrige Bedingungen entsprachen den zuvor beschriebenen Trennung im 20 mM Phosphatpuffer.

Proteintrennung bei pH 9 mittels CZE

Die Durchführung von Langzeittestesst im basischen Bereich sollten Informationen über die Stabilität der Polymerschicht liefern. Die weiteren Messbedingungen waren wie folgt:

Kapillarlänge $L_{\text{eff}}/L_{\text{tot}}$:	56 cm/ 64 cm
Spannung	:	-12 kV + hydrodynamischer Fluss von 20 mbar nach 10 min Trennung
Proteine	:	Lactalbumin und Lactoglobulin A+B
Konzentration je Protein in Wasser	:	1 mg / ml
Injektionsmenge	:	50 mbar · 4 s
Trennpuffer	:	100 mM Phosphatpuffer pH 9, nach 3 Trennungen durch das Replenishment-system der CE erneuert
Kassettemperatur	:	25 °C

Isoelektrische Fokussierung

Eine Auftrennung von Analyten durch die Anwendung der kapillarisoelektrischen Fokussierung erfolgt meist in zwei Schritten: erstens der Fokussierung der Zonen bezüglich ihrer isoelektrischen Punkte und zweitens der Mobilisierung der Zonen in Richtung Detektor. Dabei wurden die unterschiedlich beschichteten Kapillaren und drei verschiedene Mobilisierungstechniken näher untersucht. Folgende Messbedingungen wurden gewählt:

Kapillarlänge $L_{\text{eff}}/L_{\text{tot}}$:	24,5 cm / 32 cm
Spannung	:	15 kV
Fokussierzeit	:	2 min
Anolyt	:	20 mM Phosphorsäure
Katholyt	:	40 mM NaOH
Ampholytkonzentration	:	2 % Ampholin 3-10
Mobilisierung	:	<i>hydrodynamisch</i> : 20 mbar bzw. <i>chemisch</i> : mit kathodischem Mobilizer von Bio-Rad oder 80 mM NaCl in 40 mM NaOH
Proteine	:	Myoglobin, Chymotrypsinogen
Konzentration der Proteine in Ampholytsg.	:	ca. 4 - 6 $\mu\text{mol/l}$
Kassettemperatur	:	25 °C
Detektionswellenlänge	:	280 nm

Bei der Durchführung der CIEF in unterschiedlichen Kapillaren blieben die gerade aufgeführten Messbedingungen gleich. Als Mobilisierung der fokussierten Zonen diente der

„CE-IEF kathodische Mobilizer“ von Bio-Rad. Die Längen der verwendeten Kapillaren waren wie folgt:

$L_{\text{eff}}/L_{\text{tot}}$:	Chloralkylsilan/HEMA in DMF; 26 cm / 34 cm
	Chloralkylsilan/HEMA in Wasser/Methanol; 24,5 cm / 32,5 cm
	Chloralkylsilan/HEMA in Wasser; 24,5 cm / 32,5 cm
	Bromalkylsilan/HEMA in DMF; 23,5 cm / 31,5 cm

AFM

Für die Wafer war keine besondere Probenvorbereitung notwendig. Geräteparameter sind im Geräteverzeichnis Kapitel 8 zu finden. Die Kapillaren wurden mit Epoxykleber auf einen Träger geklebt und gebrochen. In einzelnen Fällen konnten so die Innenflächen der Kapillaren in brauchbarer Weise freigelegt und die Oberflächenmorphologie mit Hilfe der AFM untersucht werden.

CZE mit Kopplung CE/ESI-MS

Um intensive Spektren zu erhalten, musste die optimale Sprühposition der Spraynadel eingestellt werden. Dazu wurde eine Lösung von je 20 mM Angiotensin, Bradykinin und Neurotensin mit einem Druck von 50 mbar durch die Kapillare geschoben. Ein Spraytip-Potenzial von 4500 V gewährleistet ein optimales Versprühen von Probe und Sheath-flow (Flussrate nach Split = 2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Mit der manuellen Einstellung der Sprühnadelposition unter Beachtung der erhaltenen Signale am Auswertecomputer des ESI-Massenspektrometers konnte so die Position eingestellt werden, bei der man das beste Signal-Rauschverhältnis erhielt. Mit dem so justierten Spraykopf konnten dann die Messungen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt werden:

Kapillarlänge L_{tot}	:	ca. 80-90 cm
Spannung CE	:	30 kV
Hydrodynamischer Fluss	:	50 mbar nach 8 min Trennung
Trennpuffer	:	Wasser + 1,5 % Ameisensäure + 20 mM Hydrochinon oder 20 mM Ammoniumformiatpuffer + 20 mM Hydrochinon
Flussstärke Sheath-flow, Split	:	200 μl / min, 1:100
Sheath-flow Zusammensetzung	:	1/30/70 (v/v/v) Ameisensäure/Wasser/Methanol

Spraytip-Potenzial	:	1500 V
Nozzle-Potenzial und -temperatur	:	140 V und 140 °C

CIEF mit Kopplung CE/ESI-MS

Bei der CIEF muss während der Fokussierung ein pH-Gradient erzeugt werden. Dazu muss die Kapillare einerseits in eine Base und andererseits in eine Säure tauchen. Um dies zu verwirklichen, wurde der Kapillarauslass auf Seiten des Massenspektrometers ein Stück in die Sprühnadel hereingezogen. Am Sprühkopf erfolgte dann ein Austausch des von der HPLC kommenden Flusses, des Sheath-flow, gegen eine Spritzenpumpe, die eine ammoniakalische Lösung (Katholyt) beförderte und damit den Kapillarauslass umspülte. Nach erfolgter Fokussierung wurde die Kapillare zunächst 2 mm aus der Spraynadel geschoben und der Katholyt wieder gegen den Ameisensäure-Sheath-flow ersetzt. Eine Wartezeit von 3 min sollte gewährleisten, dass die ammoniakalische Lösung möglichst vollständig aus dem Sprühkopf gespült wurde. Dann begann die Mobilisierung der fokussierten Zonen mit Hilfe eines hydrodynamischen Flusses. Die übrigen Messbedingungen wurden wie folgt gewählt:

Kapillarlänge L_{tot}	:	85 - 90 cm
Ampholytkonzentration	:	0,5 %, 1 % oder 2 %
Proteinkonz. in Ampholytlösung	:	3 – 6 $\mu\text{mol/l}$
Anolyt	:	20 mM Phosphorsäure
Katholyt	:	1 % Ammoniak
Fokussierzeit	:	15 min
Mobilisierung	:	50 mbar
Zusammensetzung Sheath-flow	:	1/29/70 (v/v/v) Ameisensäure/Wasser/Methanol
Flussrate Sheath-flow, Split	:	200 $\mu\text{l/min}$, 1:100
Spraytip-Potenzial	:	4000 V
Nozzle-Potenzial	:	140 °C

Trypsinverdau

Für die Herstellung des Trypsinverdaus von Proteinen wurde 1 mg Protein in 1 ml 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung (pH 8,1) gelöst und mit 20 μl Trypsin (1 mg gelöst in 1 ml 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 4 h bei einer idealen Temperatur von 35 - 40 °C wurde die Lösung untersucht [11].

4. Ergebnisse und Diskussion

Am Institut für Analytische Chemie der TU Bergakademie Freiberg fanden im Arbeitskreis von Prof. Otto bereits Untersuchungen zur Anwendbarkeit von HEMA als Kapillarbeschichtung statt. So entwickelte Leinweber [56], anlehnend an Arbeiten von Wirth [41], eine Polymerisation von HEMA in DMF für CE-Kapillaren. Dabei stellte er fest, dass durch eine Quervernetzung der HEMA-Polymere eine Beschichtung resultiert, die bei Langzeittests bei pH 9 zu sehr reproduzierbaren Migrationszeiten führt. In weiterführenden Arbeiten konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit [59] durch zusätzliche Capping- und Hydrolyseschritte den resultierenden elektroosmotischen Fluss für linear polymerisierte HEMA-Beschichtungen weiter senken und somit den Abdeckungsgrad an Polymer auf der Kapillarinnenfläche steigern. Die entwickelten Kapillarbeschichtungen zeigten sehr gute Trenneigenschaften und konnten sich mit kommerziell erhältlichen PVA-Kapillaren in den Trennergebnissen durchaus messen. Von der Vorbereitung der fused silica Kapillaren bis hin zur fertigen Beschichtung ist jedoch ein Zeitaufwand von ca. 3 Tagen notwendig. Dabei bestand bei jedem Behandlungsschritt die Gefahr des Kapillarbruches. Außerdem kam es in manchen Fällen beim Wechsel der Spülreagenzien zu Lufteinschlüssen an den Kapillarenden, welche sich oftmals nur durch Kürzen der Kapillare entfernen ließen. Aus diesen Gründen wurde über die Änderung einiger Reaktionsschritte nachgedacht, um eventuell in kürzerer Zeit und unter milderer Bedingungen gleichwertige oder sogar bessere Beschichtungen aus HEMA herzustellen. So sollte die Anwendbarkeit einer HEMA-Beschichtung untersucht werden, deren Polymerisation in einem Wasser/Methanol-Gemisch statt gefunden hatte. Nach Untersuchungen von Robinson [60] sowie Peruchot [40] war diese Reaktion bei Raumtemperatur bereits nach 1 - 2 Stunden abgeschlossen.

Eine Erleichterung des Radikalstarts sollte mittels (11-(2-Brom-2-methyl)propionyloxy)-undecyltrichlorsilan [57] erreicht werden. Der Ersatz des Chloratoms durch ein Brom und die damit verbundene schwächere Halogen-Kohlenstoffbindung erhöht die Geschwindigkeit des Halogentransfers und damit der gesamten ATRP. Beim Einsatz von CuCl als Katalysator erhält man ein gemischtes Halogeninitiatorsystem [61], welches neben schnellerem Austausch auch eine gute Polymerisationskontrolle gewährleistet. Da die erwähnten Veröffentlichungen nur die Polymerisation an Silicapartikeln oder die Homopolymerisation des HEMA-Monomers beschreiben, musste nach optimalen Bedingungen für die Polymerisation in Kapillaren gesucht werden. Der Umsatz an HEMA unter den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sollte dabei mit Hilfe der GC verfolgt werden.

4.1. GC-Experimente

Um die bestmöglichen Reaktionsbedingungen für einen maximalen Umsatz an HEMA-Monomer zu ermitteln, wurden systematische Experimente durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden 8 cm lange Kapillarröhrchen mit dem Bromalkylsilan modifiziert und dann mit HEMA im entsprechenden Lösungsmittel polymerisiert. Anschließend erfolgte das Herausspülen des Kapillarinhaltes mit Iso-Propanol (wenn Polymerisationslösungsmittel DMF) bzw. DMF (wenn Polymerisationslösungsmittel Wasser/Methanol) und dessen gaschromatographische Untersuchung [62]. Der resultierende Umsatz an HEMA-Monomer gab Aufschluss über den Reaktionsverlauf der Polymerisation. Durch die Variation von Zeit, Temperatur, Lösungsmittel sowie Art und Konzentration des Katalysators ergaben sich bei Durchführung von Doppelbestimmungen insgesamt 64 Messungen. Die erhaltenen Ergebnisse sind für Untersuchungen am gemischten Halogeninitiatorsystem, d.h. mit CuCl als Katalysator in Tabelle 4-1 und bei Verwendung von CuBr als Katalysator in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Mittlerer Umsatz an HEMA-Monomer in % unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Katalysator CuCl (geringe Konzentration = 2 mg/ml CuCl und hohe Konzentration = 14,7 mg/ml CuCl)

Für CuCl		Wasser/Methanol		DMF	
ϑ /°C	t/min	Geringe Konz.	Hohe Konz.	Geringe Konz.	Hohe Konz.
20	30	46	10	13	4
	60	56	38	0	10
40	30	42	6	11	0
	60	28	38	1	0

Wie man der Tabelle 4-2 entnehmen kann, konnte mit einer niedrigen Katalysatormenge im Lösungsmittel-Gemisch Wasser/Methanol der höchste Umsatz an HEMA-Monomer verzeichnet werden. Dazu war nur eine milde Temperatur von 20 °C und eine Reaktionszeit von 60 min notwendig. Im Reaktionsmedium DMF schien das Katalysatorsystem unter den gewählten Bedingungen nur wenig aktiv zu sein. Wie schon Leinweber [56] in Untersuchungen an Kapillaren mit dem Chloralkylsilan als Startermolekül feststellte, wird mit dem CuCl/Bipyridin Komplex erst bei 80 °C und 4 h Reaktionszeit ein bestmöglicher Umsatz an HEMA-Monomer erreicht. Die GC-Experimente, bei welchen entsprechend zum gewählten Bromalkylsilan CuBr als Katalysator eingesetzt wurde, ergaben ein völlig anderes Ergebnis.

Tabelle 4-2: Mittlerer Umsatz an HEMA-Monomer in % unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Katalysator CuBr (geringe Konzentration = 2,9 mg/ml CuBr und hohe Konzentration = 21,3 mg/ml CuBr)

Für CuBr		Wasser/Methanol		DMF	
ϑ /°C	t/min	Geringe Konz.	Hohe Konz.	Geringe Konz.	Hohe Konz.
20	30	0	0	50	0
	60	28	16	36	22
40	30	0	10	45	19
	60	0	12	46	18

Die Tabelle 4-2 zeigt deutlich, dass dieser Katalysator kaum im wässrigen Medium wirkt, dafür jedoch besonders gut in DMF. Da die Struktur des Katalysators vom entsprechenden Lösungsmittel abhängig ist [37], wird die Aktivität des CuBr/Bipyridin-Komplexes offensichtlich wesentlich besser vom DMF unterstützt. Mit den geringeren Konzentrationen an CuBr werden bei 20 °C wie auch bei 40 °C ähnliche Umsätze erzielt. Auf dieser Grundlage wurden die Untersuchungen verfeinert, d.h. die Reaktionsbedingungen mit dem höchsten Umsatz an HEMA Monomer wurden erweitert. Die Verlängerung der Reaktionszeiten sowie die Erhöhung der Reaktionstemperatur bei Verwendung des DMF als Lösungsmittel sollte zeigen, ob sich die Umsätze noch weiter verbessern lassen.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass die Reaktion nicht eindeutig temperatur- oder zeitabhängig verläuft. Innerhalb der durchgeführten Doppelbestimmung unterschieden sich die ermittelten Umsätze teilweise sehr stark (Abbildung 4-1).

Die Verwendung des CuBr in DMF zeigt bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min in allen Temperaturbereichen einen guten Umsatz und dieser änderte sich dann auch kaum. Nur bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C lässt sich der Umsatz nach 2 h nochmals erhöhen und bleibt auch so über die Versuchsreihe relativ konstant. Die Umsätze bei 60 °C variieren ebenfalls kaum, sind jedoch zu gering. Bei den niedrigen Temperaturen konnten zwar teilweise sehr gute Umsätze an HEMA gemessen werden, jedoch schwankten die Messwerte sehr stark. Aufgrund dieser sehr unterschiedlichen Umsätze an HEMA ist es unmöglich, reproduzierbare Polymerschichten herzustellen, deshalb kamen diese Reaktionstemperaturen für weitere Untersuchungen nicht in Frage.

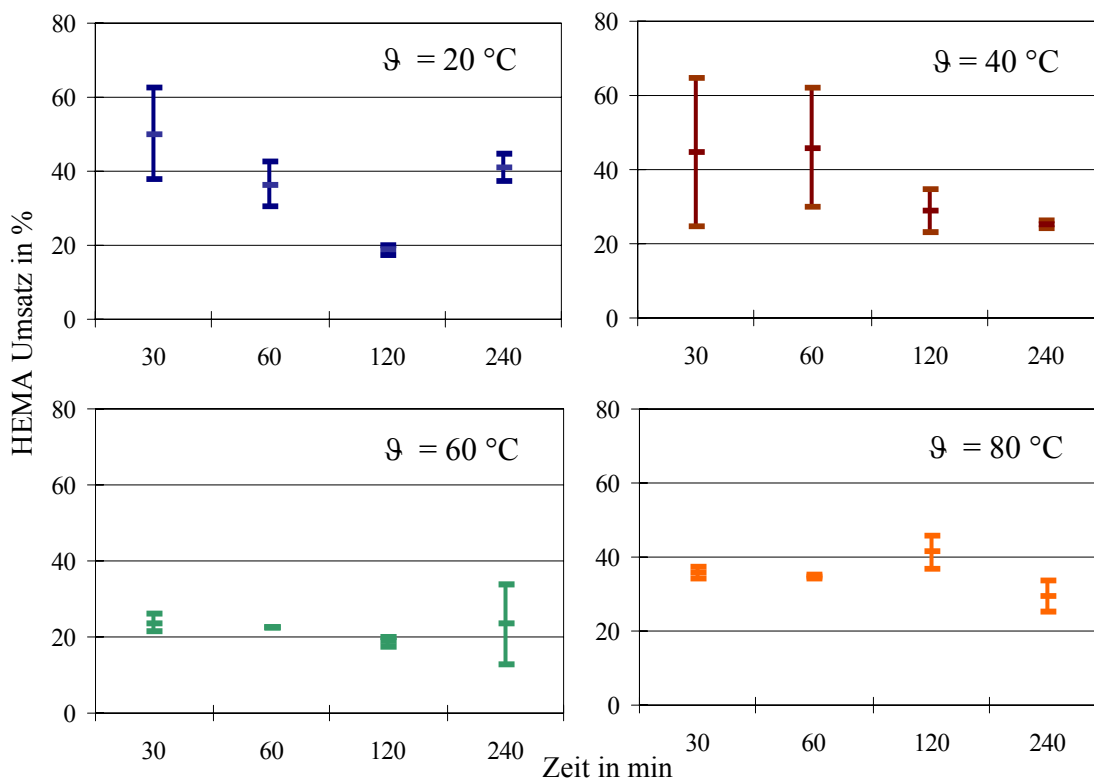


Abbildung 4-1: Mittlerer prozentualer Umsatz, ermittelt aus zwei Messungen (Spannweite), an HEMA in bromalkylsilanisierten Kapillaren im Reaktionsmedium DMF bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten, Kat: CuBr in niedriger Konzentration

Bei den Untersuchungen zum Reaktionsverlauf im Wasser/Methanol-Gemisch wurde festgestellt, dass sich die Umsätze an Monomer mit längeren Reaktionszeiten nicht steigern lassen. Auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur zeigt kaum eine Wirkung auf die Polymerisation (Abbildung 4-2).

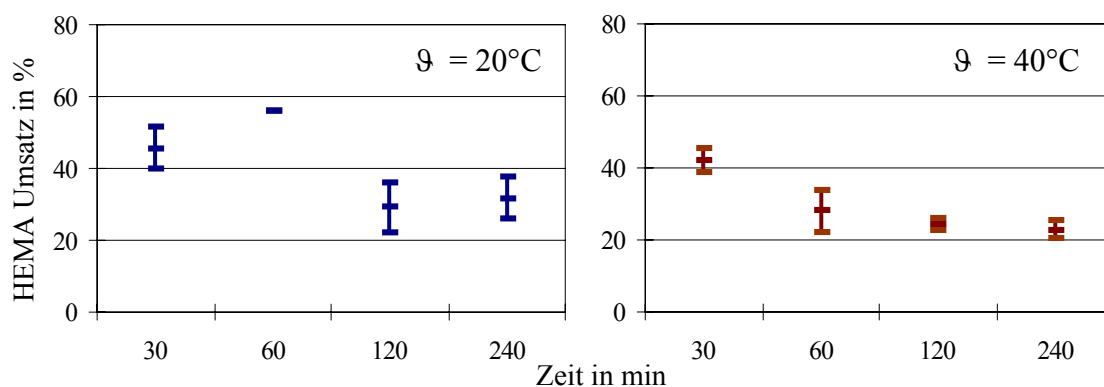


Abbildung 4-2: Mittlerer prozentualer Umsatz, ermittelt aus zwei Messungen (Spannweite), an HEMA in bromalkylsilanisierten Kapillaren im Reaktionsmedium Wasser/Methanol bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten, Kat: CuBr in niedriger Konzentration

Aufbauend auf diesen Resultaten wurden für die ATRP im wässrigen Lösungsmittel die milderen Bedingungen gewählt, also eine niedrige Temperatur von 20 °C, bei der die Reaktion bereits nach 1 - 2 h abgeschlossen ist.

Damit wurden für die bromalkylsilanierten Kapillaren folgende optimierte Bedingungen festgelegt:

- Lösungsmittel 50 % Wasser / 50 % Methanol, $\vartheta = 20\text{ °C}$ bzw. Raumtemperatur, Reaktionszeit = 1 - 2 h, Kat = 2 mg CuCl + 6,32 mg Bipyridin
- Lösungsmittel 100 % DMF, $\vartheta = 80\text{ °C}$, Reaktionszeit = 2 h, Kat = 2,9 mg CuBr + 6,32 mg Bipyridin

4.2. Beschichtung und Charakterisierung der CE-Kapillaren

4.2.1. Messung der DMSO-Beweglichkeit

Ein gutes Maß, um etwas über den Grad der Silanolabdeckung aussagen zu können, ist die Verfolgung des EOF. Der EOF ist charakteristisch für fused silica Kapillaren, in denen er, je nach pH-Wert, unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Mit Hilfe der Neutralsubstanz DMSO, die sich mit dem elektroosmotischen Fluss bewegt, kann man Rückschlüsse über den Erfolg der Beschichtung ziehen.

Für die Kapillaren, in denen ein bifunktionelles Chloralkylsilan als Startermolekül an die Kapillarinnenwand angebunden wurde, konnte durch die zusätzliche Reaktion mit einem sterisch kleineren Chloralkylsilan eine größere Anzahl an Initiatormoleküle für die nachfolgende ATRP zur Verfügung gestellt werden. Die damit verbundene bessere Abdeckung der Kapillarinnenseite mit HEMA wurde durch eine Senkung des EOF wiedergespiegelt [59]. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass eine Hydrolyse mit verdünnter Essigsäure nach der Silanisierung zu weitaus reproduzierbareren Migrationszeiten führte als ohne diesen Reaktionsschritt. Die Hydrolyse bewirkt eine Sauerstoffverbrückung unter den Startermolekülen (Kapitel 3, Abbildung 3-2).

Ob die erhaltenen Ergebnisse auch auf Kapillaren übertragbar sind, bei denen ein Bromalkylsilan als Startermolekül gewählt wurde, musste erst überprüft werden.

Bromalkylsilanierte Kapillaren

Nachdem mit Hilfe der GC-Experimente die optimalen Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von bromalkylsilanierten Kapillaren festgelegt werden konnten, musste nun die Wirkung eines Capping- und Hydrolyseschrittes auf die Güte der Beschichtung untersucht werden. Beim Vergleich der gemessenen Beweglichkeiten in den bromalkylsilanierten Kapillaren konnte jedoch der EOF durch diese zusätzlichen Reaktionsschritte nicht weiter gesenkt werden. Bei allen drei untersuchten Kapillaren wurde ein sehr geringer EOF gemessen (Abbildung 4-3).

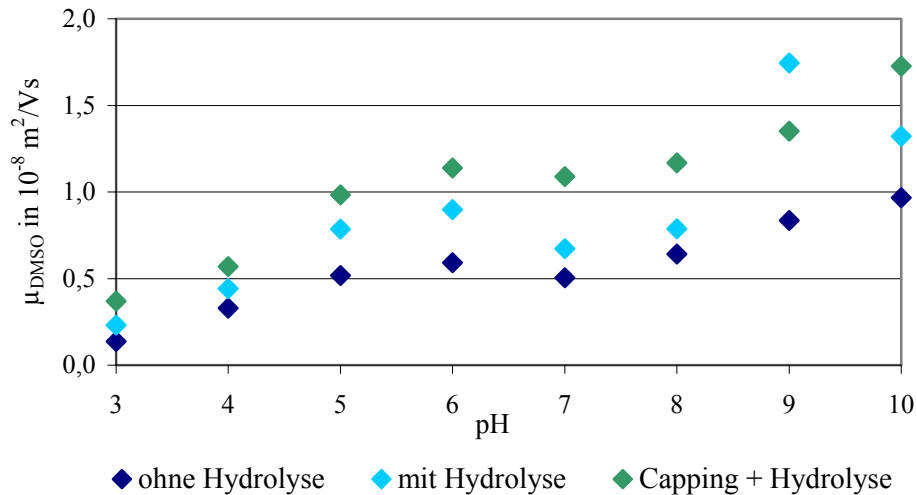


Abbildung 4-3: DMSO-Beweglichkeit μ_{DMSO} in Abhängigkeit vom pH-Wert in bromalkylsilanisierten Kapillaren mit anschließender HEMA-Polymerisation in DMF

Die bromalkylsilanierte Kapillare, bei der weder das Capping mit einem sterisch kleineren Silan noch die Hydrolyse durchgeführt wurde, zeigte jedoch die geringste DMSO-Beweglichkeit. Wahrscheinlich erleidet die Schicht der empfindlichen Startermoleküle während der Behandlung mit Essigsäure neben der Sauerstoffverbrückung auch einige Schäden. Dies führt zwangsläufig auch zu einer schlechteren HEMA-Abdeckung und damit zu einem stärker ausgeprägten EOF.

Da die Messungen bei jedem pH-Wert dreimal durchgeführt wurden, konnte auch die Streuung der DMSO-Beweglichkeit untersucht werden (Abbildung 4-4).

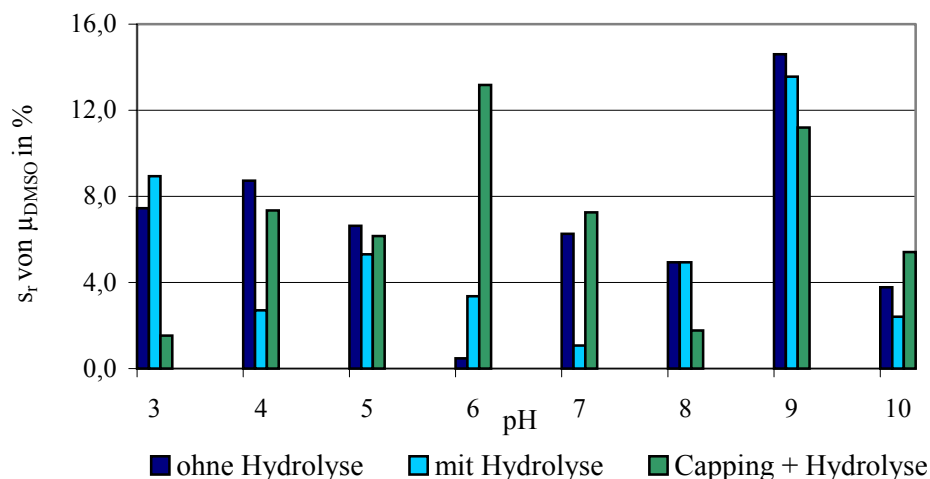


Abbildung 4-4: Relative Standardabweichung der DMSO-Beweglichkeiten über drei Läufe in bromalkylsilanisierten Kapillaren mit anschließender HEMA-Polymerisation in DMF

An hand der relativen Standardabweichungen ist es schwierig herauszufinden, welche Kapillare die reproduzierbarsten Messergebnisse liefert. Je nach pH-Wert schwanken die

DMSO-Beweglichkeiten bei jeder Kapillare unterschiedlich stark, so dass man nicht festlegen kann, welche Kapillarbeschichtung insgesamt die geringste Streuung aufweist. Daher wurde sich dafür entschieden, die bromalkylsilanierten Kapillaren ohne den Capping- und Hydrolyseschritt mit HEMA zu beschichten, da bei dieser Beschichtung im Durchschnitt der geringste EOF verzeichnet werden konnte.

DMSO-Beweglichkeit

Nachdem die Modifizierungsschritte für bromalkylsilanierte Kapillaren feststanden, konnten nun Vergleichsmessungen zwischen diesen und Kapillaren, denen ein Chloralkylsilan als Startermolekül zu Grunde lag, miteinander verglichen werden. Dabei wurden in beiden Fällen die ATRP des HEMA zum Einen im Lösungsmittel DMF und zum Anderen in einem Wasser/Methanol-Gemisch durchgeführt. In den nach unterschiedlichen Methoden beschichteten Kapillaren erfolgte zunächst die Messung des resultierenden EOF. In Abbildung 4-5 wird die Beweglichkeit des DMSO in verschiedenen polymerisierten Kapillaren über einen pH-Bereich von 3 – 10 gezeigt.

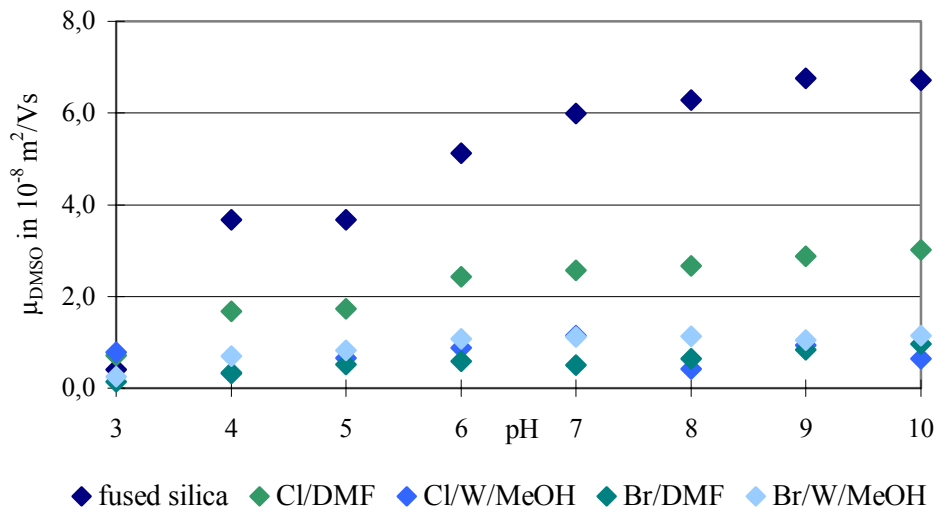


Abbildung 4-5: DMSO-Beweglichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert in unterschiedlich beschichteten Kapillaren

Der obere Kurvenverlauf ist dabei typisch für eine fused silica Kapillare. Bei pH 3 ist der EOF aufgrund der fast vollständigen Protonierung noch gering ausgeprägt. Er steigt jedoch mit dem pH-Wert und der damit verbundenen Deprotonierung der Silanolgruppen an und erreicht bei ungefähr pH 8 sein Maximum. Durch die Beschichtung einer chloralkylsilanierten Kapillare in DMF (Cl/DMF) konnte die Beweglichkeit bei pH 10 um ca. 60 % erniedrigt werden. Nur noch 1/10 des ursprünglichen EOFs zeigen alle übrigen Kapillaren. Damit scheint eine Polymerisation im wässrigen Medium (Cl/W/MeOH) bzw. der

Wechsel zu einem Alkylsilan mit Brom als Endgruppe (Br/DMF bzw. Br/W/MeOH) zu einer besseren Abdeckung der Kapillaroberfläche zu führen. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass sich die Beweglichkeit kaum mit dem pH-Wert ändert. Somit sind die Silanolgruppen gleichmäßig von der Polymerbeschichtung überzogen und beeinflussen die Stärke des EOFs kaum. Die erreichte minimale DMSO-Beweglichkeit von ca. $6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$ lässt vermuten, dass sich der EOF nicht unbegrenzt senken lässt.

4.2.2. Proteintrennung bei pH 3

Elektropherogramme

Um die Trennleistung der entwickelten Beschichtungen zu beurteilen, wurden fünf Standardproteine bei pH 3 getrennt. Bei diesem sauren pH-Wert wird die Trennung durch den noch gering ausgeprägten EOF kaum beeinflusst. Später folgten dann auch Messungen bei einem pH-Wert von 9, um zu sehen, wie sich eine fortgeschrittene Deprotonierung noch unabgedeckter Silanolgruppen auf das Trennergebnis auswirkt. Durch die hundertfache Wiederholung der Trennung war es möglich, die Stabilität der Polymerschicht bei erhöhter Belastung abzuschätzen. Doch dazu später mehr.

Bei den Proteinen für die jeweils zehn Trennungen bei pH 3 handelte es sich um Cytochrom c, Lysozym, Lactoglobulin A + B und Chymotrypsinogen. Bevor die Trennstufenzahlen im einzelnen diskutiert werden, soll anhand von Elektropherogrammen die Auftrennung der Proteine demonstriert werden. Wie in Abbildung 4-6 sichtbar, erhält man bei der Verwendung von fused silica Kapillaren kleine breite Peaks.

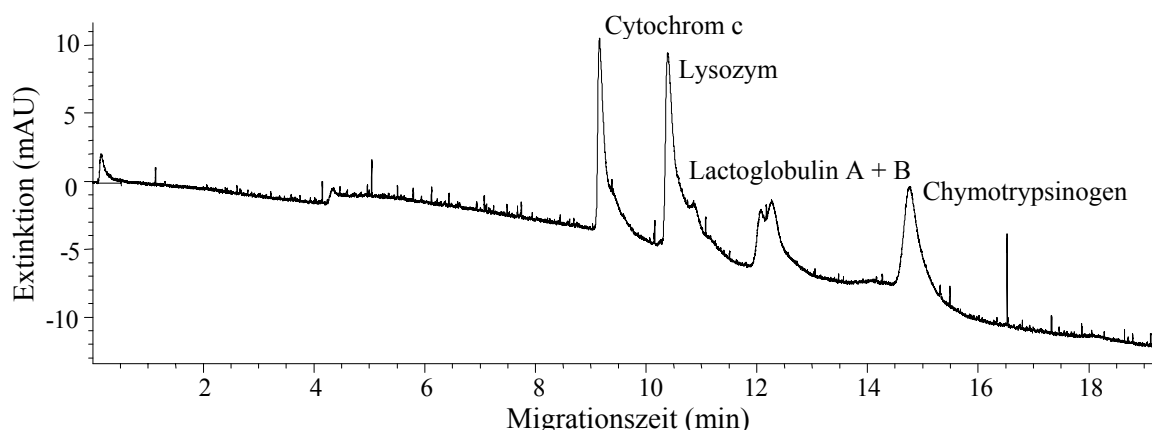


Abbildung 4-6: Proteintrennung bei pH 3 mit einer fused silica Kapillare

Um Signale vernünftiger Höhe zu erhalten war es notwendig, die doppelte Menge an Protein zu injizieren als bei den beschichteten Kapillaren. Dies liegt wahrscheinlich an

Adsorptionserscheinungen, denn obwohl bei pH 3 noch wenige Silanolgruppen deprotoniert sind, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Proteinen und der Kapillarenwand. Bestätigt wird dieser Verdacht durch das starke Tailing der Peaks und der nicht vollständigen Trennung der zwei Proteine Lactoglobulin A + B. An diesem Beispiel sieht man deutlich, wie notwendig eine Abdeckung der Silanolgruppen der Kapillarenwand ist.

Mit den hergestellten Polymerbeschichtungen konnten saubere Trennungen aller fünf Proteine erhalten werden. Wie aus Abbildung 4-7 ersichtlich, erhält man mit einer chloralkylsilanierten Kapillare, deren HEMA-Polymerisation in DMF stattfand, schmale, symmetrische Peaks, die alle vollständig basisliniengetrennt sind.

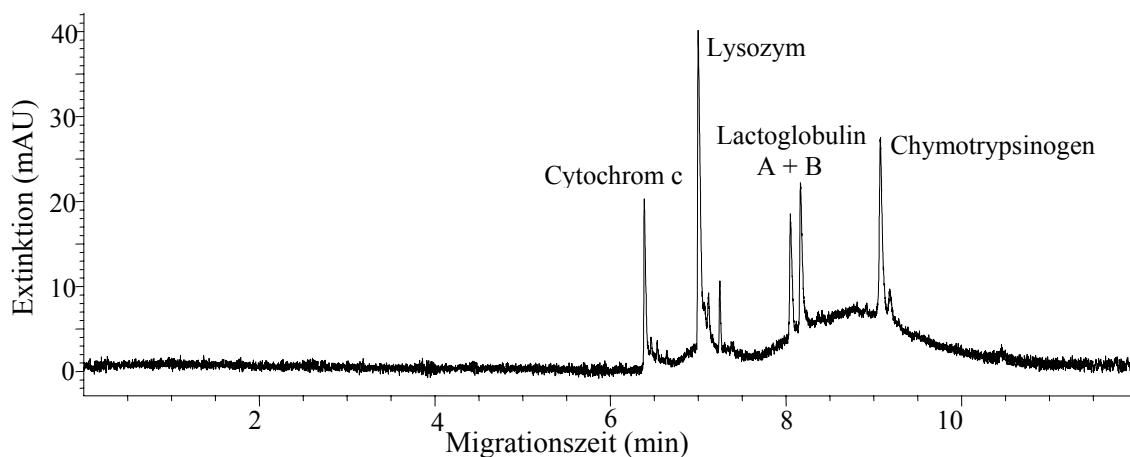


Abbildung 4-7: Proteintrennung bei pH 3 mit einer chloralkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in DMF

Leider kam es zu einem Anstieg der Grundlinie nach dem zweiten Peak. Da diese Erhebung kurz nach dem letzten Signal wieder abflacht, werden auch hier Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Kapillarenwand vermutet. Die stark rauschende Grundlinie ist jedoch nicht auf die Beschichtung zurückzuführen, sondern darauf, dass das optische Fenster nicht im idealen Detektionsbereich lag. Dies kann an einer unvollständigen Entfernung der Polyimidschicht am Detektionsfenster gelegen haben oder dem Verrutschen des Fensters in der Kapillarkassette beim Einbau. In beiden Fällen ist eine optimale Intensitätsmessung des UV-Lichtes gestört oder sogar unmöglich..

Mit der Kapillare, deren Polymerisation im Lösungsmittelgemisch Wasser/Methanol stattfand, konnte nicht nur die Reaktionszeit um die Hälfte verkürzt werden, sondern auch die Trennleistung gegenüber der erst genannten Kapillare verbessert werden (Abbildung 4-8).

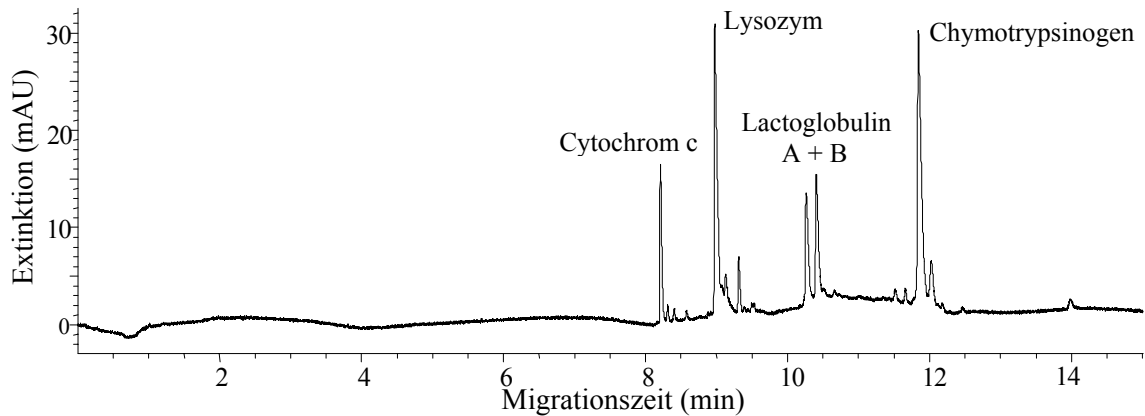


Abbildung 4-8: Proteintrennung bei pH 3 mit einer chloralkylsilanisierter Kapillare, polymerisiert in Wasser/Methanol

So wurden bei Trennungen in dieser Kapillare nur einige geringfügige Erhebungen in der Grundlinie beobachtet. Ausgehend von diesem Ergebnis und des sehr geringen EOF der mit dieser Kapillarbeschichtung resultierte (Kapitel 4.2.1.), schien die Polymerisation des HEMA, die unter milderen Bedingungen im Reaktionsmedium Wasser/Methanol hergestellt wurde, eine gute Alternative zur Polymerisation im Lösungsmittel DMF zu sein.

Der Wechsel des Chloratoms gegen ein Brom am Initiator-molekül sollte den Start der ATRP erleichtern. Damit wurde eine bessere Abdeckung der Kapillaroberfläche mit HEMA erwartet. Trotz der sehr niedrigen DMSO-Beweglichkeit in bromalkylsilanisierter Kapillaren konnte das Trennergebnis von Abbildung 4-8 nicht erreicht werden. Die Polymerbeschichtung, die in DMF hergestellt wurde, führte zu einer leicht erhöhten Grundlinie zwischen den Proteinpeaks und es konnte keine vollständige Trennung der Lactoglobuline A und B erzielt werden (Abbildung 4-9).

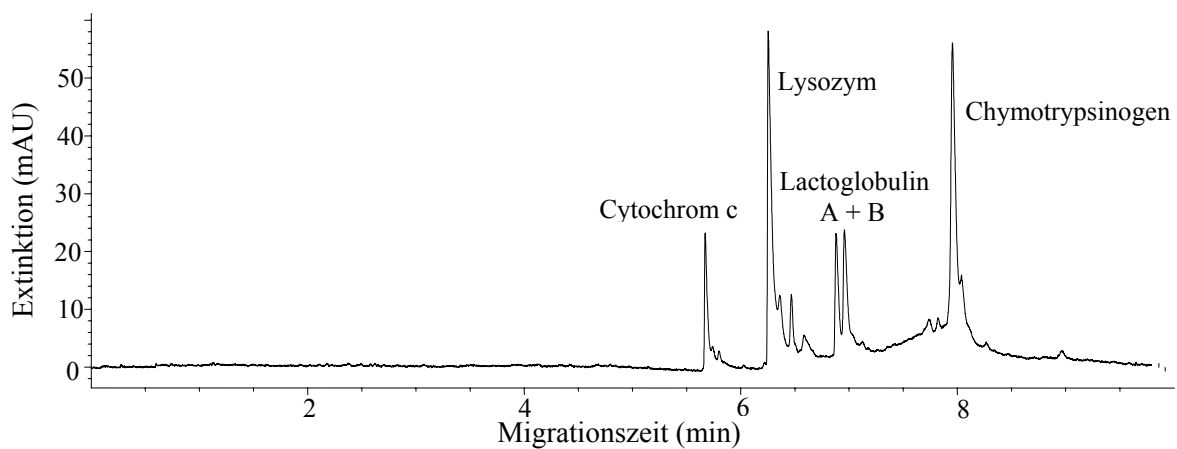


Abbildung 4-9: Proteintrennung bei pH 3 mit einer bromalkylsilanisierter Kapillare, polymerisiert in DMF

Ähnliche Trennergebnisse lieferte die Kapillare, bei der die Polymerisation des HEMA in den bromalkylsilanierten Kapillaren im Lösungsmittelgemisch Wasser/Methanol durchgeführt wurde. Das Elektropherogramm in Abbildung 4-10 zeigt jedoch eine etwas bessere Trennung der Proteine Lactoglobulin A + B.

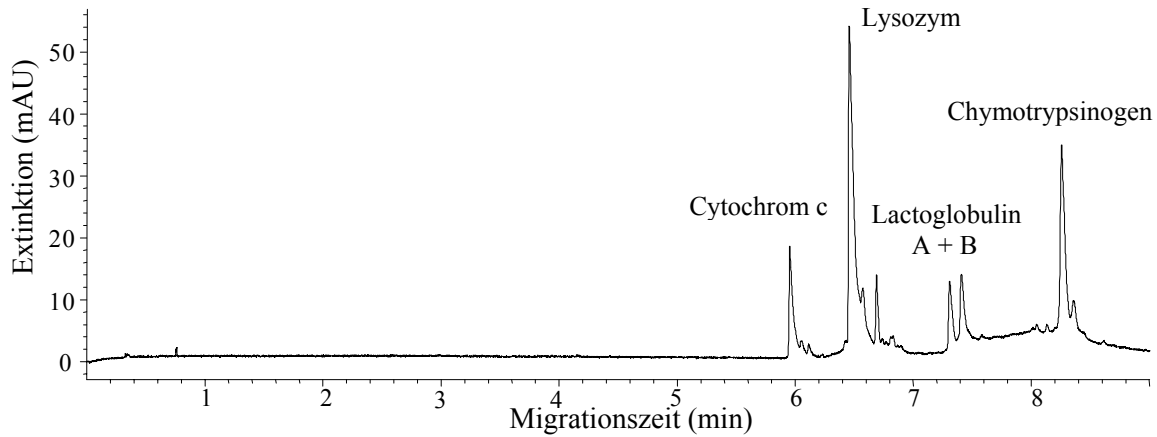


Abbildung 4-10: Proteintrennung bei pH 3 mit einer bromalkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in Wasser/Methanol

Um die erhaltenen Ergebnisse mit anderen Beschichtungsarten vergleichen zu können, wurden die Proteintrennungen unter den selben Bedingungen in kommerziell erhältlichen PVA- und eCapTM Neutral-Kapillaren durchgeführt. Wie man dem Elektropherogramm in Abbildung 4-11 entnehmen kann, senkt sich die Grundlinie bei der Trennung in der PVA-Kapillare über die Zeit. Dieser Effekt konnte auch schon bei anderen Kapillaren beobachtet werden und ist darauf zurückzuführen, dass die Beschichtung noch nicht vollständig konditioniert war. Sieht man davon einmal ab, so erreicht die Grundlinie nach jedem Proteinpeak ihren Ausgangswert wieder. Abgesehen von einem leichten Tailing des ersten und letzten Peaks, erhält man mit der PVA-Kapillare eine sehr gute Trennung der Proteinsignale.

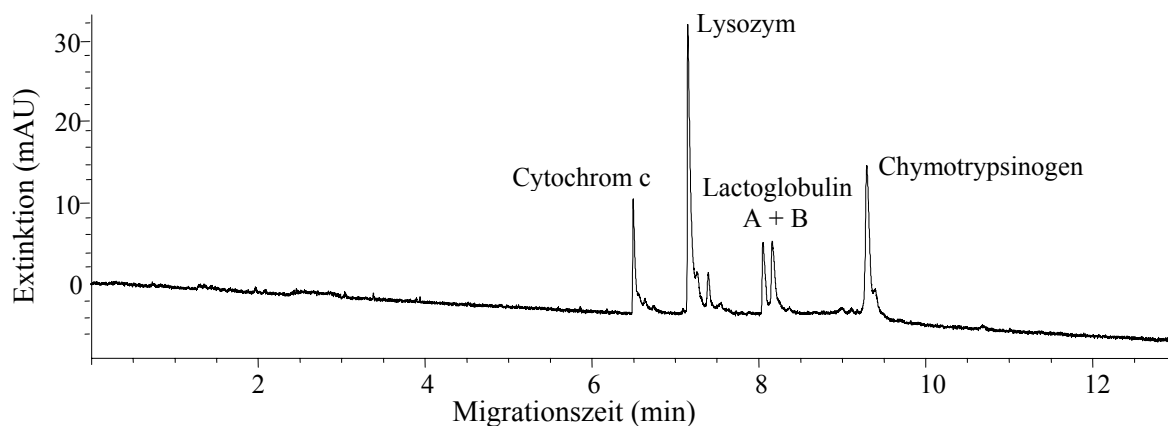


Abbildung 4-11: Proteintrennung bei pH 3 mit einer PVA-Kapillare

Bei Verwendung der eCapTM Neutral-Kapillare erhält man nur eine unzureichenden Auftrennung. Außerdem scheint es hier auch zu Wechselwirkungen zwischen Analyt und Kapillarinnenwand zu kommen. Besonders die ersten zwei Peaks sind unsymmetrisch und die Grundlinie geht erst nach dem letzten Signal auf ihr ursprüngliches Niveau zurück (Abbildung 4-12).

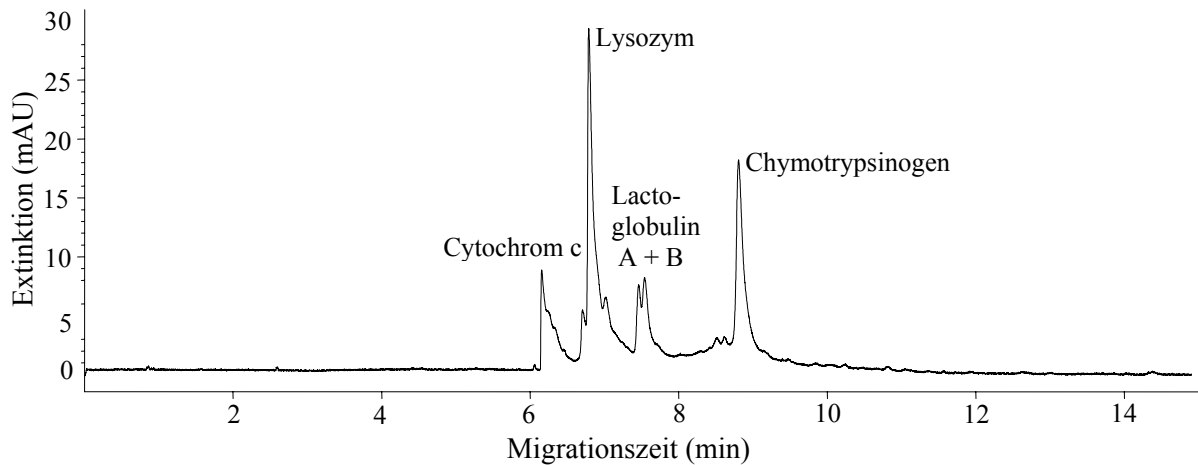


Abbildung 4-12 : Proteintrennung bei pH 3 mit einer eCapTM Neutral-Kapillare

KAISERSche Peaktrennung

Neben der optischen Bewertung der erhaltenen Trennung in den Elektropherogrammen wurde auch die Auflösung zwischen den Peaks des Lactoglobulin A und B nach der Methode von KAISER [63] bestimmt. Dabei wird eine Mittelsenkrechte zwischen den Peaks gefällt und die Länge bis zum Tal zwischen den Signalen (f) sowie bis zur Basislinie (g) ermittelt. Ergibt sich bei der Division von $f/g = 1$, so sind die Peaks vollständig voneinander getrennt, je kleiner dieser Wert wird, desto schlechter ist die Auflösung der Signale. In der nachfolgenden Tabelle sind die erhaltenen Ergebnisse aufgelistet.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der KAISERSchen Peaktrennung für die zwei Peaks Lactoglobulin A + B

Kapillare	f/g
Chloralkylsilanisiert, HEMA/DMF	0,91 +/- 0,04
Chloralkylsilanisiert, HEMA/Wasser/Methanol	0,88 +/- 0,04
Bromalkylsilanisiert, HEMA/Wasser/Methanol	0,83 +/- 0,05
PVA	0,82 +/- 0,05
Bromalkylsilanisiert, HEMA/DMF	0,80 +/- 0,06
eCap TM Neutral	0,43 +/- 0,22
Fused silica	0,22

Wie schon an hand der Elektropherogramme ersichtlich, liegen die Werte für f/g für die beschichteten Kapillaren nah beieinander. Mit den chloralkylsilanierten Kapillaren erreicht man die höchste Auflösung. Am schlechtesten wurden die beiden Proteine in der eCapTM Neutral- und der bromalkylsilanierten Kapillare, deren HEMA-Polymerisation in DMF stattfand, getrennt.

Trennstufenzahlen

Ein weiteres Maß, um die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen mit der Kapillarinnenwand zu beschreiben, sind die erreichbaren Trennstufenzahlen N pro Meter. Laut Gleichung 4-1 [1] ist die Bodenzahl in der Kapillarelektrophorese abhängig von der angelegten Spannung U , der Mobilität μ und dem Diffusionskoeffizienten D der Analyten.

$$N = \frac{\mu \cdot U}{2D} \quad (4-1)$$

Da Proteine sehr geringe Diffusionskoeffizienten besitzen, sind theoretisch Trennstufenzahlen im Millionenbereich möglich. Werte dieser Größenordnung konnten zwar nicht ganz erreicht werden, jedoch wurden zum Teil Trennstufenzahlen von bis zu $750\,000\text{ m}^{-1}$ erzielt.

Abbildung 4-13 stellt einmal den Mittelwert der aus zehn Messungen erhaltenen Trennstufenzahlen pro m für zwei Proteine in jeder Kapillare dar

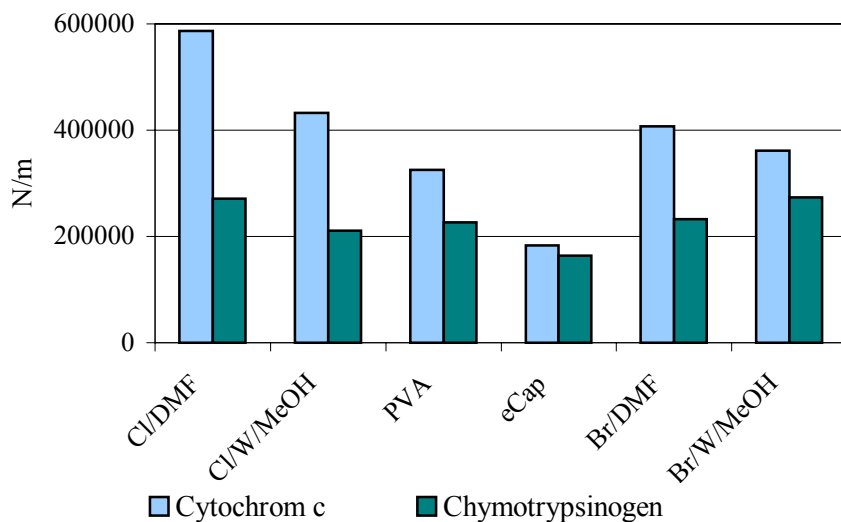


Abbildung 4-13: Mittlere Trennstufenzahl N/m für die Proteintrennung bei pH 3 für jede untersuchte Kapillare am Beispiel des Cytochrom c und Chymotrypsinogen.

Wie man sieht, wurde die höchste Trennstufenzahl von 586 000 Böden mit Cytochrom c in den chloralkylsilanierten Kapillaren erreicht und zwar bei einer Polymerisation von HEMA in DMF. Bei der Wahl des Wasser/Methanol-Gemisches als Reaktionsmedium für die HEMA-Beschichtung betrug $N/m = 433\,000$. Insgesamt ist es jedoch schwer zu sagen, welche

Kapillare die höchste Trenneffizienz aufweist, da die erreichten Bodenzahlen sich teilweise nur geringfügig unterscheiden. Am deutlich schlechtesten schnitt in diesem Vergleich jedoch die eCap™ Neutral-Kapillare ab. Bei dieser Kapillare waren die erreichten Bodenzahlen ca. 30-50 % geringer als bei den anderen getesteten Kapillaren. Außerdem sind die Trennstufenzahlen innerhalb der 10 Läufe starken Schwankungen unterworfen (Abbildung 4-14).

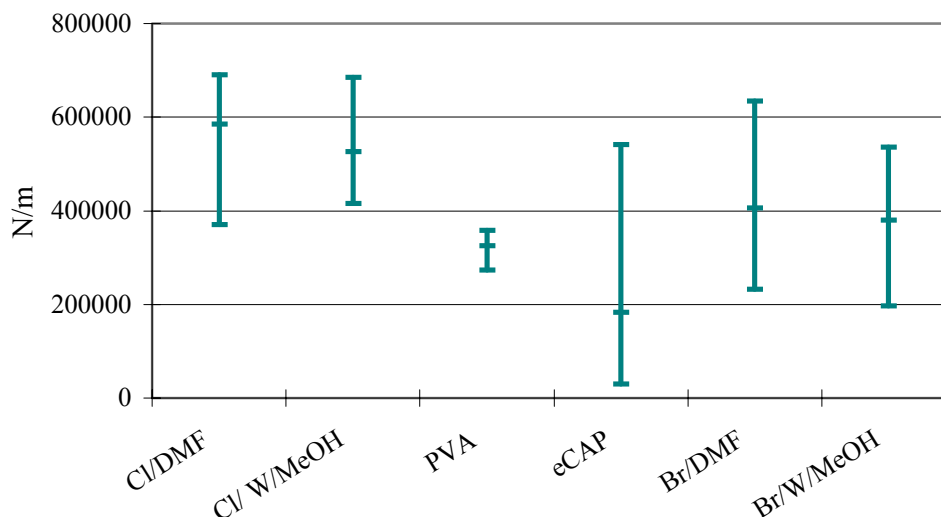


Abbildung 4-14: Graphische Darstellung der höchsten, niedrigsten und mittleren Trennstufenzahl für Cytochrom c in den unterschiedlichen Kapillaren

Wie man sieht, werden innerhalb von zehn Messungen sehr unterschiedliche Trennstufenzahlen erreicht. Obwohl die PVA-Kapillare in diesem Vergleich die konstantesten Trenneffizienzen liefert, können mit ihr nicht die Trennstufenzahlen der chloralkylsilanisierten Kapillaren erreicht werden.

Reproduzierbarkeit der Migrationszeit

Die Migrationszeiten über die jeweils zehn durchgeführten Messungen bei pH 3 variierten in allen sechs getesteten Kapillaren kaum. Zum überwiegenden Teil lagen die relativen Standardabweichungen unter 2 % (Abbildung 4-15). Nur im Falle der bromalkylsilanisierten Kapillare, deren HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF durchgeführt wurde, variieren die Migrationszeiten der Proteine um bis zu 6 %. Auch bei der eCap Neutral-Kapillare konnten trotz der stark abnehmenden Trennstufenzahlen nur geringfügige Änderungen in der Migrationszeit der Proteinen beobachtet werden. Im allgemeinen bewegen sich die relativen Standardabweichungen aller untersuchten Beschichtungen in einem akzeptablen Rahmen.

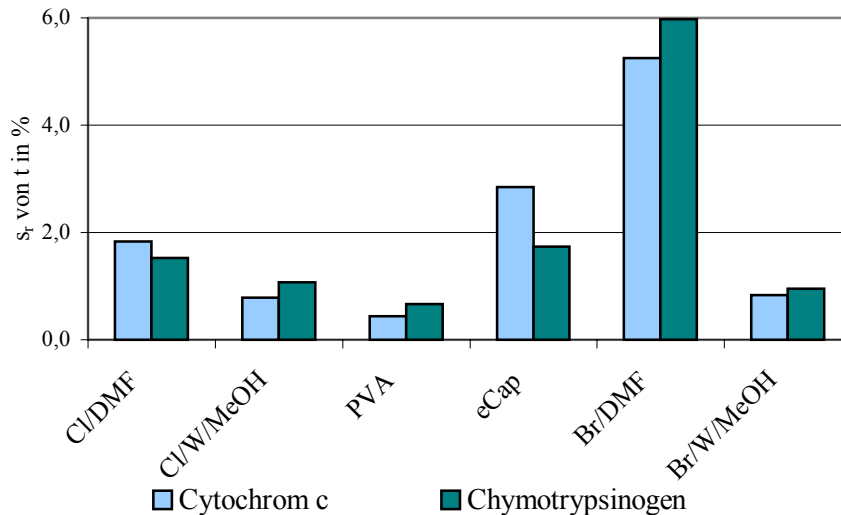


Abbildung 4-15: Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten für Cytochrom c und Chymotrypsinogen bei pH 3 in unterschiedlich beschichteten Kapillaren

4.2.3. Langzeittest bei pH 9

Um die Stabilität der hergestellten HEMA-Schichten im basischen Medium zu untersuchen, wurde ein Langzeittest von 101 Läufen bei pH 9 durchgeführt. Dieser pH-Wert wurde deshalb gewählt, da viele permanent beschichtete Kapillaren im alkalischen Bereich Verluste in ihrer Trenneffizienz erleiden, was auf eine Beschädigung der Polymerschicht zurückzuführen ist. Daher wird von den Herstellern eine Verwendung der Kapillaren bei pH über 8 nicht empfohlen. Um die Einsatzfähigkeit der erhaltenen Polymerschichten zu testen, wurden neben der Auftrennung der drei eingesetzten Standardproteine die erreichten Trennstufenzahlen sowie die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten ermittelt. Zum Vergleich dienten Trenneffizienzen, die mit kommerziell erhältlichen PVA- und eCapTM Neutral-Kapillaren erzielt wurden.

Elektropherogramme des ersten und letzten Laufes des Langzeittestes

In den nachfolgenden Elektropherogrammen ist jeweils eine der ersten und die letzte ausgewertete Trennung der drei Proteine Lactoglobulin A + B und Lactalbumin gezeigt. Es handelt sich nicht immer um den ersten Lauf des Langzeittestes, da alle Kapillaren für eine vollständige Trennung oft ein paar Messungen zur Konditionierung brauchten. Außerdem konnten auch nicht immer alle 100 Trennungen ausgewertet werden, da mit der Zeit teilweise keine oder nur sehr kleine Peaks erschienen. Der Grund dafür lag im nicht thermostatisierbaren Tray des Kapillarelektrophoresegerätes, was mit der Zeit zur Denaturierung der Proteine führte. Durch Erneuerung der Proteinlösung wurden meist wieder gute Ergebnisse erzielt.

Teilweise kam es auch zur Bildung von Gasbläschen, die dann zu einem Zusammenbruch des elektrischen Feldes führten. Recht selten traten Kapillarenverstopfungen auf, die sich erst durch externes Spülen unter erhöhtem Druck von 0,4 bar entfernen ließen. In solchen Fällen wurden keine auswertbaren Trennungen erhalten. Für eine Kapillare mit einem Chloralkylsilan als Startermolekül und anschließender Polymerisation in DMF konnte man bis zur letzten Messung vollständig getrennte Peaks erhalten. Wie man in Abbildung 4-16 sieht, verlängern sich jedoch die Migrationszeiten mit der Zeit.

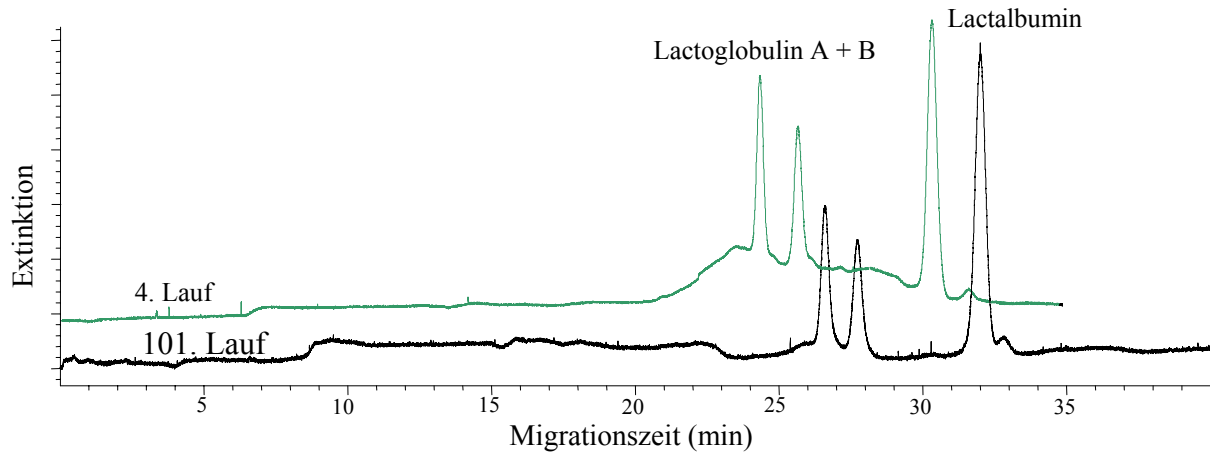


Abbildung 4-16 4. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 in chloralkylsilanisierter Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF, abgebildete Elektropherogramme sind gegeneinander versetzt

Führt man die Polymerisation in einem Wasser/Methanol-Gemisch durch, so erhält man auch hier bis zum letzten Lauf eine vollständige Trennung. Auch in diesem Fall ändern sich die Migrationszeiten, jedoch verlängern sich diese gegenüber der in DMF polymerisierten Kapillare viel deutlicher. Da sich auch die anfangs sehr schmalen Peaks immer mehr verbreitern (Abbildung 4-17) ist von zunehmenden Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der Kapillarenwand auszugehen

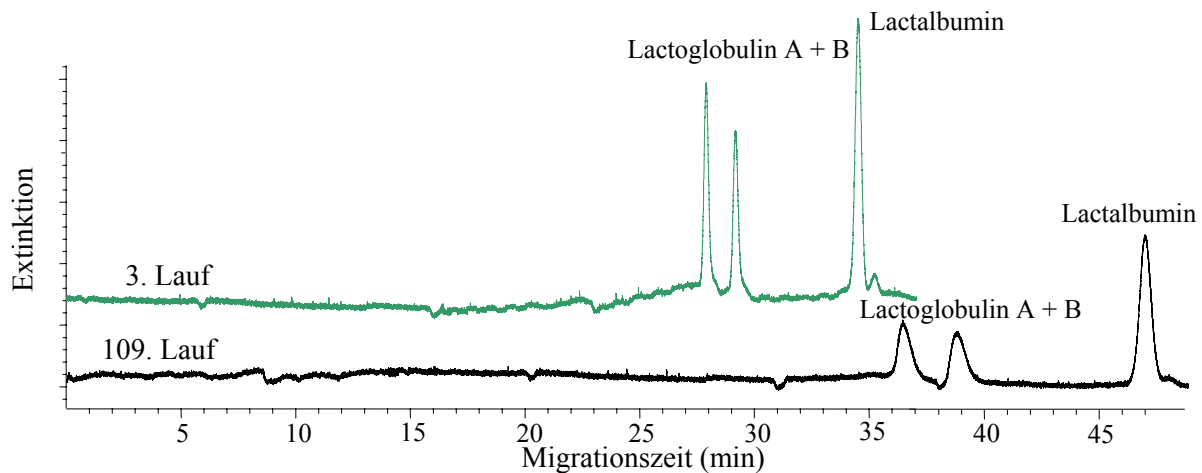


Abbildung 4-17: 3. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 in chloralkylsilanisierter Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel Wasser/Methanol

Wahrscheinlich führt eine Polymerisation im wässrigen Medium zu einer Beschichtung mit geringerer Stabilität im basischen Medium im Vergleich zu einer Polymerisation, die in DMF erhalten wurde (Abbildung 4-16).

Bei der Proteintrennung in einer PVA-Kapillare veränderten sich die Migrationszeiten kaum. Jedoch zeigt der letzte Lauf in Abbildung 4-18, dass zum Schluss keine Basislinien-Trennung zwischen Lactoglobulin A + B erzielt werden kann.

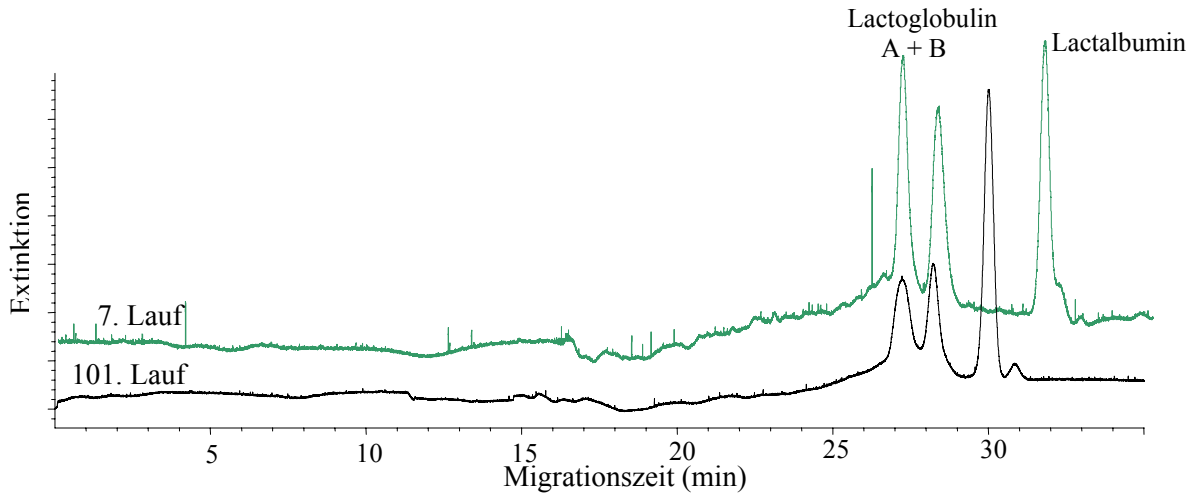


Abbildung 4-18: 7. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer PVA-Kapillare

Mit der eCapTM Neutral-Kapillare wurden zu Beginn des Langzeittestes die Lactoglobuline A und B gerade noch basisliniengetrennt. In den letzten Läufen nimmt die Auftrennung ab und die Migrationszeiten verkürzen sich leicht (Abbildung 4-19).

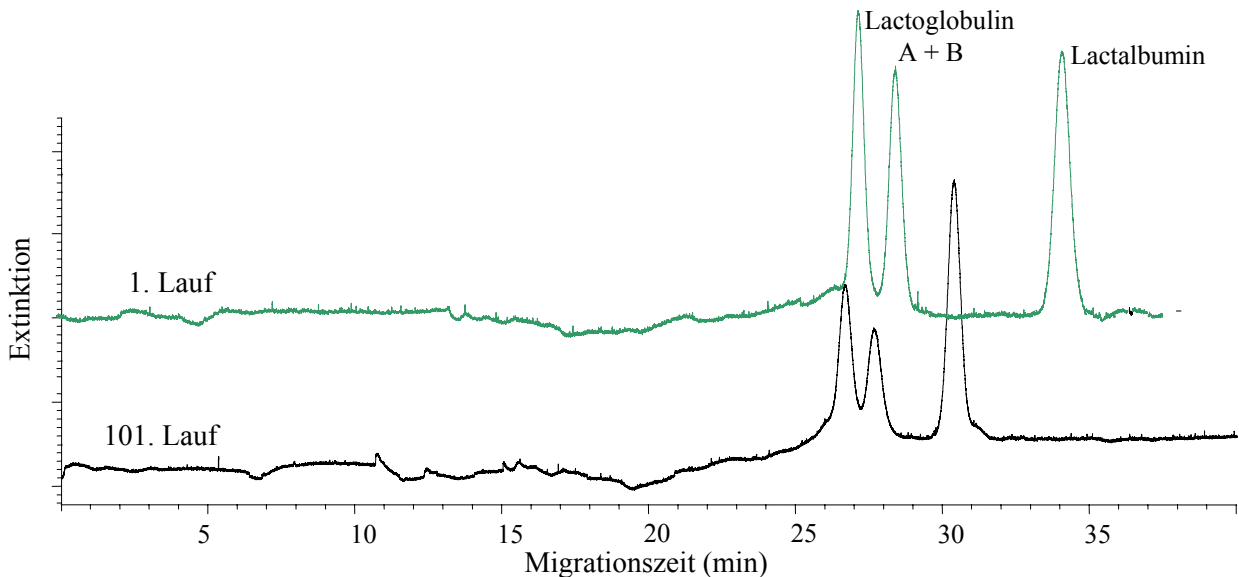


Abbildung 4-19: 1. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer eCapTM Neutral-Kapillare

Die schlechtere Auftrennung der Lactoglobuline A + B mit der kommerziell erhältlichen eCap™ Neutral-Kapillare wurde bereits bei der Proteintrennung bei pH 3 beobachtet. Dies hängt mit der schlechteren Trenneffizienz der Polymerbeschichtung zusammen, mit zunehmender Belastung im basischen Medium nimmt diese weiter ab, jedoch in einem geringeren Maße als bei den zuvor beschriebenen HEMA beschichteten Kapillaren.

Die bromalkylsilanierten Kapillaren erwiesen sich in diesem Test beide als ungeeignet, denn bereits nach 50 bzw. 60 Läufen konnten die Elektropherogramme kaum noch ausgewertet werden. Auch das reichliche Spülen mit Wasser oder die Erneuerung der Proteinlösungen brachte keine Verbesserung der Trennergebnisse. Durch die Beschichtung der bromalkyl-modifizierten Kapillaren in DMF erhielt man zu Beginn zwar schmale, symmetrische Peaks, jedoch waren diese trotz gleicher Einspritzmenge nur halb so groß wie bei den anderen getesteten Kapillaren (Abbildung 4-20).

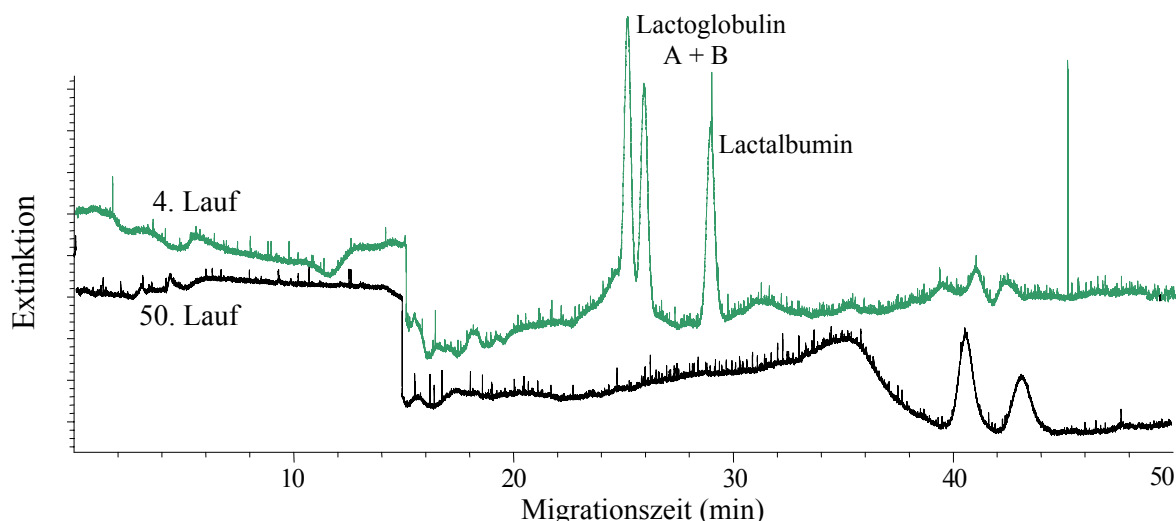


Abbildung 4-20: 4. und 50. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer bromalkylsilanierten Kapillare und HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF

Mit steigender Zahl an Trennungen verschoben sich die Migrationszeiten um ca. 15 min und die Peaks wurden deutlich breiter und damit auch kleiner. Noch deutlicher wurde dieser Verlust an Trenneffizienz bei den Kapillaren beobachtet, deren Polymerisation im Lösungsmittel Wasser/Methanol statt gefunden hatte (Abbildung 4-21). Auch hier konnten mit der entwickelten Beschichtung zunächst sehr effiziente Trennungen erreicht werden. Die vollständig basisliniengetrenten Peaks waren sehr schmal und wiesen keinerlei Tailing auf. Mit zunehmender Belastung wird die Polymerschicht scheinbar stark beschädigt, so dass Wechselwirkungen zwischen den deprotonierten Silanolgruppen und den Proteinen möglich werden. Dadurch verlängern sich die Migrationszeiten und es resultieren verbreiterte Signale.

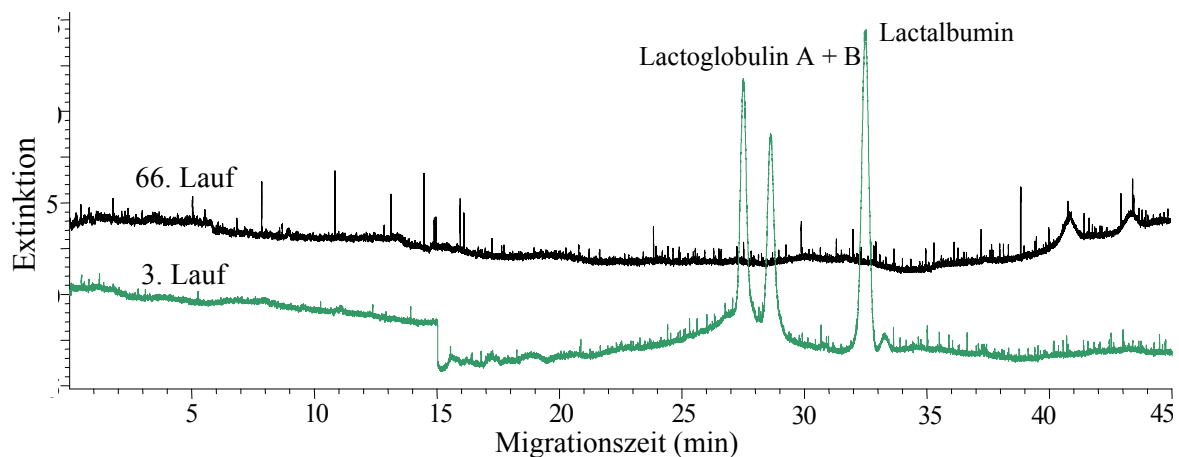


Abbildung 4-21: 3. und 66. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer bromalkylsilanisierten Kapillare und HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel Wasser/Methanol

Vergleich der Trennstufenzahlen

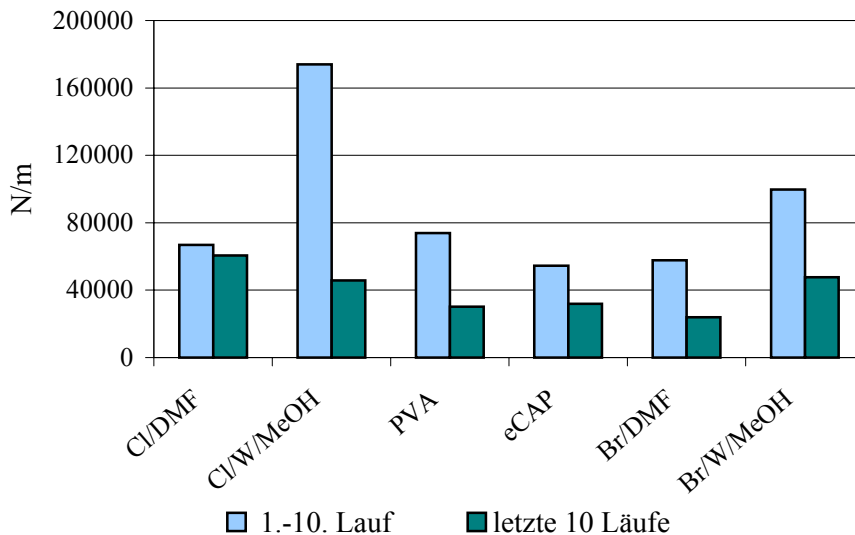
Zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit der Kapillarbeschichtungen sollten die im Langzeittest erreichten durchschnittlichen Trennstufenzahlen verglichen werden. Um diese zu ermitteln, mussten die erhaltenen Werte zunächst auf ihre Normalverteilung hin untersucht werden [63]. Zu diesem Zweck wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Mit α wird das Signifikanzniveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt. Die Diagramme zur Verteilung von N/m sind im Anhang I zusammengestellt, daran schließt sich Tabelle I mit den dazugehörigen p-Werten an. Der p-Wert stellt jenes Niveau dar, an dem der Test gerade noch abgelehnt wird. Ist der p-Wert kleiner oder gleich dem vorher festgesetzten Niveau, so ist die Nullhypothese abzulehnen, andernfalls anzunehmen.

Es wurde festgestellt, dass von insgesamt 18 Untersuchungen 12 als normalverteilt und der Rest als nicht normalverteilt betrachtet werden können. Da keine 100%ige Normalverteilung beobachtet werden konnte, wurde von den ausgewerteten Messungen der Median als durchschnittliche Trennstufenzahl angenommen. Die Ergebnisse für die einzelnen Langzeittests an den unterschiedlich beschichteten Kapillaren sind in der nachfolgenden Tabelle 4-4 zusammengefasst. Mit einer chloralkylsilanisierten Kapillare, die mit HEMA in Wasser/Methanol beschichtet wurde, konnte die höchste Trennstufenzahl von 102 522 (Lactalbumin) erreicht werden. Die zweit- und drittbesten Ergebnisse wurden mit einer HEMA in DMF polymerisierten Beschichtung und einer PVA-Kapillare erhalten. Ansonsten führten bis auf die eCapTM Neutral-Kapillare alle Beschichtungen zu ähnlich durchschnittlichen Trennstufenzahlen von ca. 55 000.

Tabelle 4-4: Die über den Langzeittest erreichten Mediane der Trennstufenzahl N/m mit unterschiedlich beschichteten Trennkapillaren für drei verschiedene Proteine.

Kapillare	Medianwerte für N/m		
	Lactoglobulin A	Lactoglobulin B	Lactalbumin
Chloralkylsilan, HEMA/DMF	58 476	51 899	84 724
Chloralkylsilan, HEMA/W/MeOH	65 021	58 954	102 522
Bromalkylsilan, HEMA/DMF	53 723	50 752	49 642
Bromalkylsilan, HEMA/W/MeOH	68 995	61 055	54 940
eCap™ Neutral-Kapillare	38 125	38 331	53 943
PVA	35 634	58 910	72 370

Da man an hand dieser Ergebnisse nichts über die Stabilität der Polymerschicht im basischen Medium erfährt, sollten die erreichten Trennstufenzahlen der ersten zehn Läufe mit denen der letzten zehn Läufe verglichen werden. Im Idealfall müssten hohe Trenneffizienzen erhalten werden, die sich kaum über den Langzeittest ändern. Wie man im nachfolgenden Diagramm erkennen kann, ändern sich bei der Kapillare mit dem Chloralkylsilan und der anschließenden Polymerisation in DMF die Trennstufenzahlen am wenigsten (Abbildung 4-22). Diese Kapillare zeigt mit ihren anfänglich mittelmäßigen Trenneffizienzen in den letzten Läufen die besten Ergebnisse im Vergleich zu den übrigen Kapillaren.

**Abbildung 4-22:** Trennstufenzahlen der ersten 10 und letzten 10 Läufe am Beispiel des Lactoglobulin A

Beschichtungen im wässrigen Medium führten zu Polymerschichten mit teilweise sehr hohen Trennstufenzahlen von bis zu $N = 170\,000\text{ m}^{-1}$. Leider reduzierten sich diese über den Langzeittest stark (-50 bzw. -75%), so dass von einer Beschädigung der Polymerschicht

ausgegangen wird. Auch die HEMA Beschichtung der bromalkylsilanisierten Kapillare in DMF führte schon zu Beginn zu niedrigen Trennstufenzahlen, die dann auch noch innerhalb von nur 50 Läufen um weitere 50 % abnahmen. Wie schon in den Elektropherogrammen ersichtlich war, zeigten auch die Polymerschichten der PVA- und eCapTM Neutral-Kapillaren deutliche Verluste in der Trenneffizienz.

An hand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass man mit einer HEMA-Beschichtung in DMF, der eine Chloralkylsilanisierung vorausgegangen war, eine stabile und zuverlässige Polymerschicht für das basische Medium erhält. Diese Schlussfolgerung wird auch durch Untersuchungen von Leinweber [56] bestätigt, der ähnlich beschichtete Kapillaren ohne Trennverluste zwischen den Proteintrennungen mit 0,1 M NaOH spülte.

Reproduzierbarkeit der Migrationzeiten

Ein weiterer wichtiger Punkt zur Charakterisierung der erhaltenen Polymerschichten ist die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten. Gerade bei der UV-Detektion ist die Migrationszeit oft die erste Möglichkeit, Peaks zuzuordnen. Hierbei schnitten die PVA und die eCapTM Neutral-Kapillare mit Standardabweichungen von maximal 3,5 % am besten ab (Abbildung 4-23). Die HEMA in Wasser/Methanol polymerisierte Beschichtung zeigte innerhalb von 10 untersuchten Messungen ebenfalls sehr geringe Standardabweichungen von nur 2 %, allerdings ändert sich im gesamten Langzeittest die Migrationszeit des Lactoglobulins um 5,5 %. Mit 4 – 7 % Abweichung konnten die Standardabweichungen der HEMA in DMF beschichteten Kapillare noch gut akzeptiert werden. Am schlechtesten reproduzierbar waren die Zeiten bei den bromalkylsilanisierten Kapillaren vor allem, wenn die Polymerisation in DMF statt gefunden hatte. Hier änderten sich die Migrationszeiten in 50 Läufen um über 16 %.

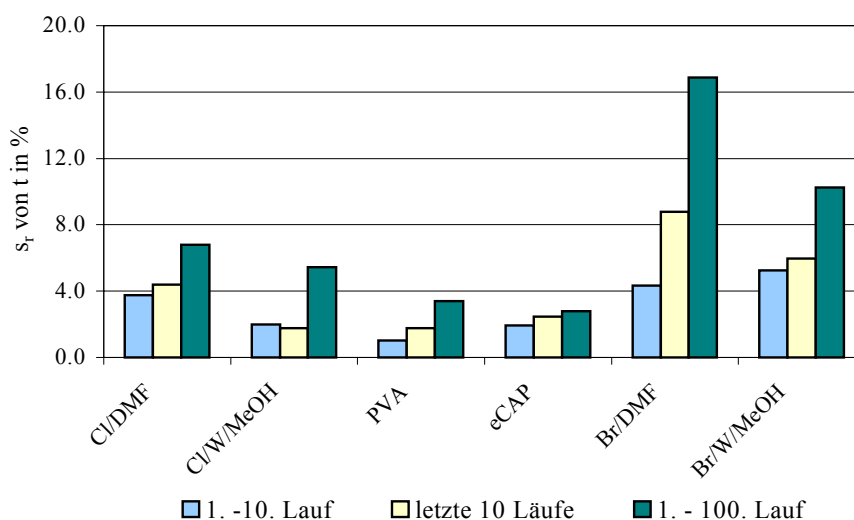


Abbildung 4-23: Reproduzierbarkeit der Migrationszeit für Lactoglobulin A über den Langzeittest

Da alle entwickelten Kapillaren mit HEMA modifiziert wurden, mussten die unterschiedlichen Stabilitäten der Polymerbeschichtung mit dem molekularen Aufbau und Abdeckungsgrad der Beschichtung zusammenhängen.

Nachdem in den beschichteten Kapillaren das Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen angewendet wurde, sollte nun auch die Trenntechnik der isoelektrischen Fokussierung unter Einsatz der entwickelten Polymerschichten untersucht werden.

4.2.5. Kapillarisoelektrische Fokussierung CIEF

Mit der isoelektrischen Fokussierung erhält man nicht nur die Auftrennung eines Proteingemisches, sondern kann beim Einsatz von sogenannten Markern auch den isoelektrischen Punkt der Analyten bestimmen. Diese Zusatzinformation ist bei der Charakterisierung von Molekülen von hoher Bedeutung, da sie die Anzahl an in Frage kommenden Substanzen stark einschränkt. Für den Fokussierungsschritt wurde ein Ampholin verwendet, das den pI-Bereich von 3 bis 10 abdeckt. Die Ampholyte selbst weisen eine starke Absorption im UV-Bereich auf und führen bei der bisher verwendeten Wellenlänge von 200 nm zu einem starken Untergrundrauschen.

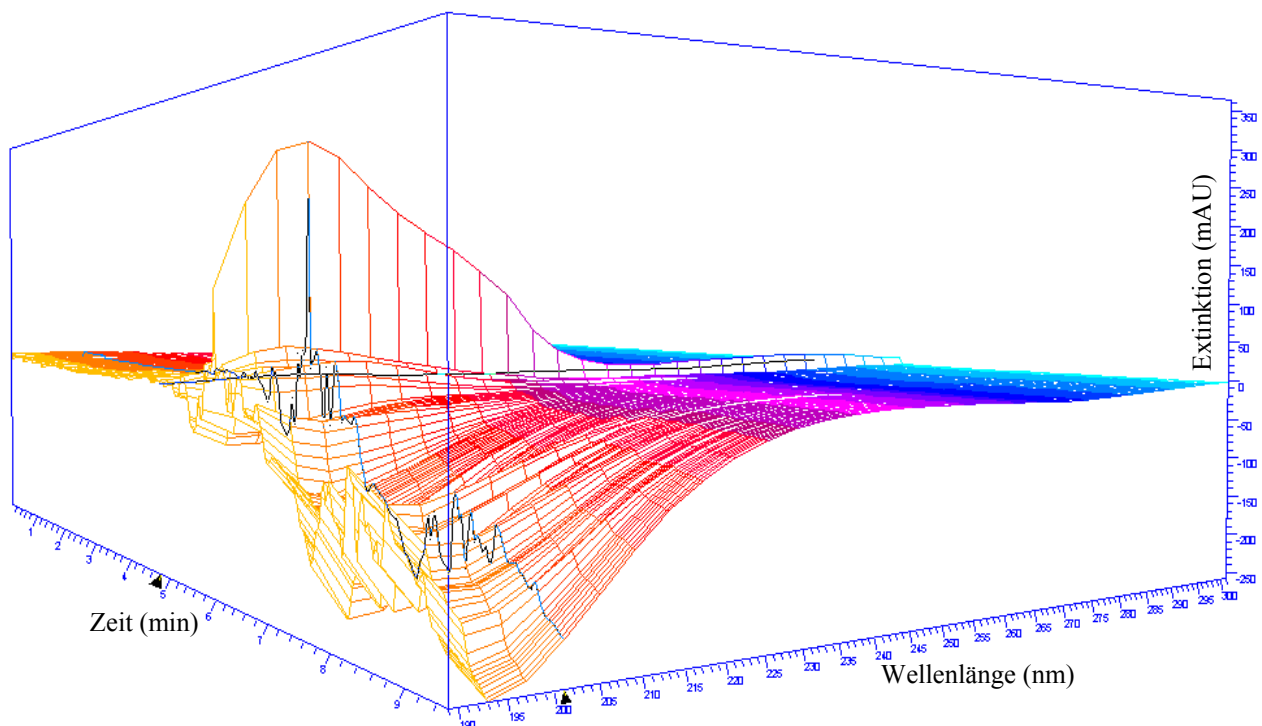


Abbildung 4-24: UV-Spektrum in 3-D-Darstellung; aufgenommen mit einem Diodenarray-detektor während einer CIEF von Myoglobin in 2 % Ampholin 3,5 – 10

Durch die Aufnahme eines Spektrums des in Ampholin fokussierten Myoglobins über den Wellenbereich von 190 bis 300 nm mit einem Photodiodenarray-Detektor sollte ein geeigneterer Wellenbereich für die Detektion gefunden werden. Dabei wurde deutlich, dass die Ampholine im Wellenbereich von 190 bis ca. 240 nm selbst sehr stark absorbieren (Abbildung 4-24). Das Signal vom Myoglobin wird zwar mit zunehmender Wellenlänge auch geringer, ist jedoch im Vergleich zu den Ampholinen noch deutlich detektierbar. Für zukünftigen Messungen wurde deshalb eine Detektionswellenlänge von 280 nm gewählt. Die massenspektrometrische Untersuchung (Abbildung 4-25) mit der ESI-TOF-MS sollte etwas Näheres über die Zusammensetzung des Ampholinlösung in Erfahrung bringen.

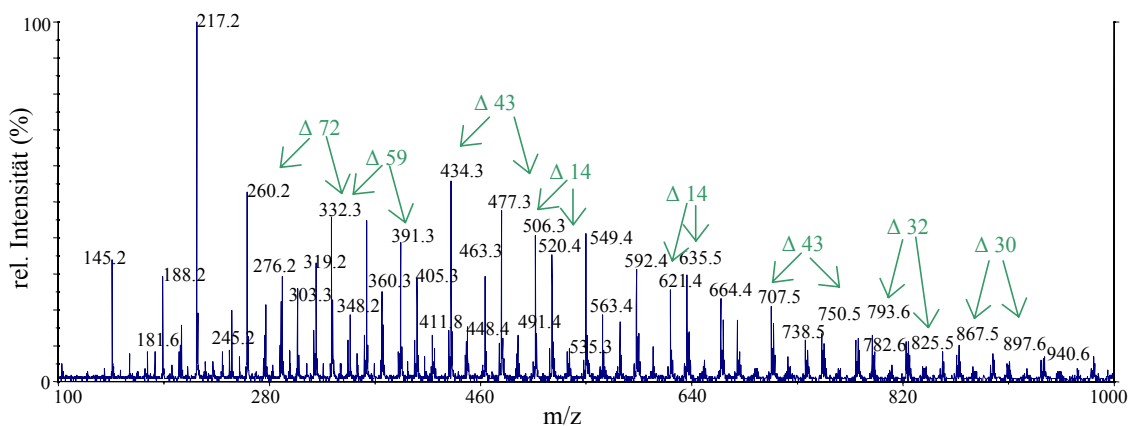


Abbildung 4-25: ESI-Massenspektrum des Ampholin 3,5 - 10 in 49/50/1 Wasser/Methanol/Essigsäure (v/v/v)

Im erhaltenen Spektrum betragen die meisten Massenunterschiede zwischen den Peaks ca. 14 bzw. ein Vielfaches davon. Dies entspricht der Masse einer oder auch mehrerer CH_2 -Gruppen und deutet auf eine homologe Reihe funktionalisierter Aliphaten hin. Massendifferenzen von 30 oder 32 könnten auf zusätzliche Sauerstoffatome ($M = 16$) oder Aminogruppen $-\text{NH}-$ ($M = 15$) zurückzuführen sein. Laut Schrattenholz [11] handelt es sich bei den Ampholyten um Polymere mit zahlreichen Amino- und Carboxylgruppen. Durch Mischen entsprechender Immobiline kann man sich selbst Ampholytlösungen für den gewünschten pI-Bereich herstellen. Die Immobiline sind Acrylamidderivate mit Amino- und Carboxylgruppen. Der isoelektrische Punkt einer amphoterischen Verbindung wird durch die pK_s -Werte der Amino- und Carboxylgruppen bestimmt. Ist jeweils nur eine dieser Gruppen im Molekül vorhanden, so beträgt der pI ungefähr 5 bis 6 [64]. Zusätzliche ionisierbare Seitenketten führen zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes in Richtung 3 durch mehrere Carbonsäuregruppen oder Richtung 10 durch mehrere Aminogruppen. Das Vorhandensein von mindestens zwei Aminogruppen und damit zwei möglichen Ladungsträgern konnte in dem Spektrum des

Ampholingemisches durch Peaks bestätigt werden, die einen Massenunterschied von 0,5 aufwiesen. Dies ist typisch für zweifach geladene Moleküle (Abbildung 4-26).

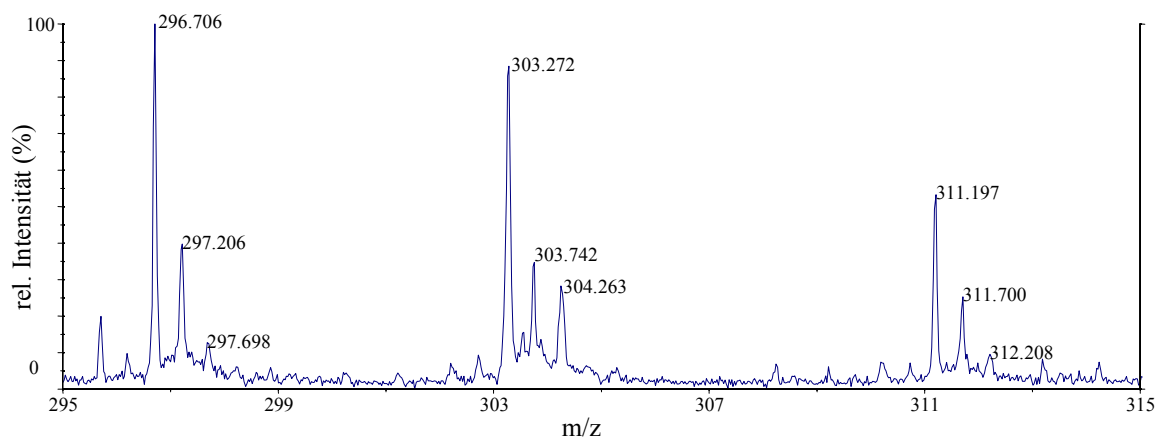


Abbildung 4-26: Ausschnitt des ESI-Massenspektrums (Abbildung 4-25) mit 2fach geladenen Peaks

Aufbauend auf den vorliegenden Informationen wird davon ausgegangen, dass die verwendeten Ampholine durch Reaktionen von Acrylsäure mit länger-kettigen aliphatischen Aminen hergestellt wurden.

Fokussierung

Nach Füllen der Kapillare mit einem Protein-Ampholingemisch erfolgt nach Anlegen eines elektrischen Feldes die Wanderung der Analyten in der Kapillare bis zum Erreichen des betreffenden isoelektrischen Punktes. Da sie an diesem Punkt neutral geladen sind und nicht mehr im elektrischen Feld wandern, nimmt während des Fokussierungsschrittes der Strom ab. Ein konstanter minimaler Stromstärkeverlauf wurde als Ende des Fokussierungsschrittes festgelegt. Die Konzentration der Probe im Gemisch musste bedeutend geringer gewählt werden als bei der Kapillarzonenelektrophorese. Da bei letzterer nur ein kleiner Teil der Kapillare beim Injizieren gefüllt wird, steht demzufolge auch eine viel geringere Menge an Analyt zur Detektion zur Verfügung als bei der isoelektrischen Fokussierung, bei der die komplette Kapillare mit Ampholyt/Probengemisch gefüllt wird. Abhängig von Kapillarlänge und gewähltem Injektionsdruck kann bei gleich gewählter Analytkonzentration die in der Kapillare befindliche Probenmenge in der CIEF das Hundertfache im Vergleich zur CZE betragen. Da dieser Tatsache der schon begründete unempfindlichere Detektionsbereich gegenüberstand, konnte die Menge des Analyten nicht in diesem Maße reduziert werden. Es wurde sich schließlich für eine 100 – 200 µg/ml Analytkonzentration entschieden. Dies entspricht je nach Protein ca. 3 - 9 µmol/l.

Die Ampholytkonzentration wurde anlehnd an zahlreiche Veröffentlichungen [65] anfangs mit 2 % gewählt, spätere Versuche zeigten, dass eine halb so hohe Konzentration ebenfalls gute Trennergebnisse lieferte.

Bei Untersuchungen am Myoglobin wurde durch die geringere Konzentration an Ampholyt in einer längeren Kapillare außerdem noch ein zweiter Peak sichtbar (Abbildung 4-27). Bei diesem zweiten Signal könnte es sich um ein Isoformes handeln, denn laut Literatur kann man zwei isoelektrische Punkte für das Myoglobin finden (z.B. $pI = 6,8$ und $7,2$) [66]. Dass diese zweite Myoglobinform erst unter bestimmten Bedingungen detektierbar wird, hängt zum Einen von der größeren Probenmenge aufgrund der längeren Kapillare und zum Anderen sicher auch von der geringeren Ampholytkonzentration und der dadurch niedrigeren Eigenabsorption ab.

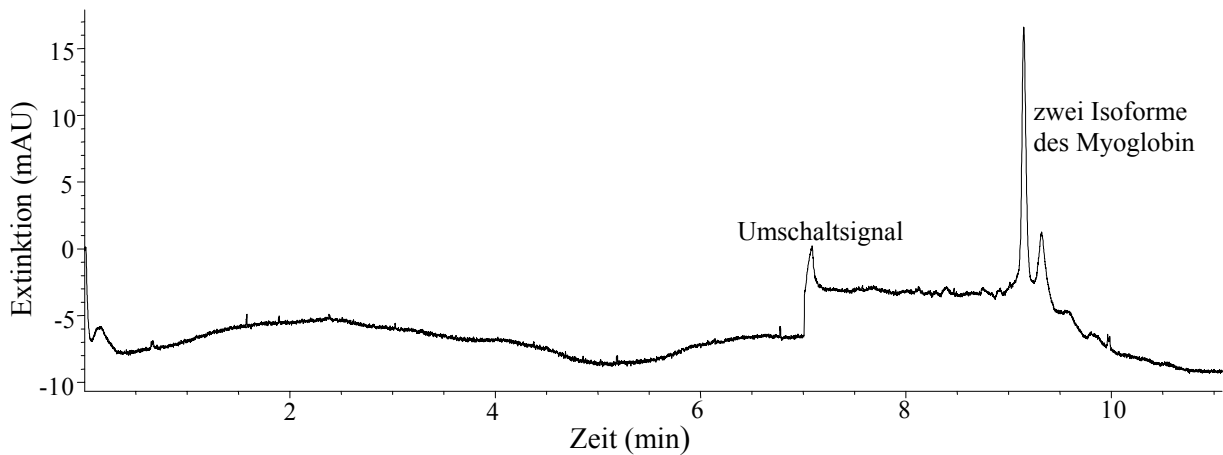


Abbildung 4-27: CIEF von Myoglobin (200 $\mu\text{g/ml}$) in Kapillare HEMA/DMF, 2 % Ampholin 3,5 - 10, $L_{\text{eff}} = 24,5$ cm, Fokussierung: 7 min 15 kV, chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer

Der in dem Elektropherogramm als Umschaltsignal bezeichnete Peak entsteht durch die kurzzeitige Unterbrechung des elektrischen Feldes zwischen dem Fokussier- und dem Mobilisierungsschritt. Dabei wird das Vial mit NaOH auf der kathodischen Seite gegen den kathodischen Mobilizer ausgetauscht und die gewählte Spannung für diesen Moment abgeschaltet.

Mobilisierung

Nach erfolgreicher Fokussierung müssen die aufgetrennten Analyten den Detektor passieren. Dabei übt die Art der Mobilisierung einen entscheidenden Einfluss auf die Trenneffizienz aus. In einer Versuchsreihe wurden drei unterschiedliche Mobilisierungsmöglichkeiten bezüglich der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und Flächeneinheiten (FE) untersucht. Bei den Methoden handelte es sich um eine hydrodynamische Mobilisierung mit Druck und um zwei

chemische Mobilisierungen, d.h. mit einer zwitterionischen Lösung oder durch Zugabe von NaCl zum Katholyten. Im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 4-28) sind die Ergebnisse basierend auf je 10 Messungen zusammengefasst.

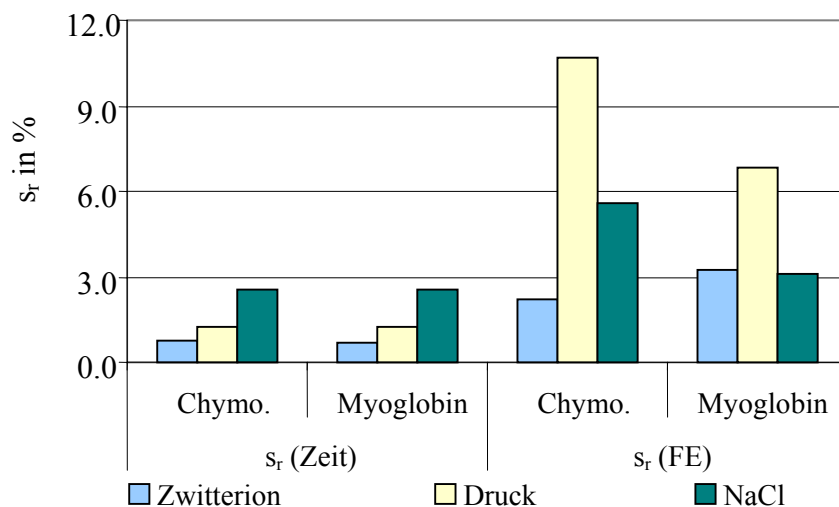


Abbildung 4-28: Relative Standardabweichung der Migrationszeiten und Peakflächen von 10 Messungen bei unterschiedlichen Mobilisierungstechniken am Beispiel des Myoglobins und Chymotrypsinogens.

Bei diesem Vergleich wird deutlich, dass mit der zwitterionischen Lösung (kathodischer Mobilizer von Bio-Rad) durchweg die geringsten Standardabweichungen erzielt werden können. Hinsichtlich der Migrationszeit liefert auch der Druck akzeptable Reproduzierbarkeiten. Bei der quantitativen Auswertung von Proben sollte jedoch eher auf die chemischen Mobilisierungen zurückgegriffen werden, da durch den hydrodynamischen Fluss sehr stark abweichende Flächen resultieren können. Für nachfolgende Untersuchungen der isoelektrischen Fokussierung in Kapillaren wurde für die Mobilisierung der fokussierten Zonen der kathodische Mobilizer von Bio-Rad verwendet.

Vergleich der Kapillaren

Dass auch bei Anwendung der isoelektrischen Fokussierung in Kapillaren eine Beschichtung unumgänglich ist, wird durch den Einsatz einer unmodifizierten fused silica Kapillare bewiesen (Abbildung 4-29). Der breite, kleine Peak deutet auf die schon hinreichend beschriebenen Adsorptionsvorgänge zwischen den positiv geladenen Aminosäuren des Myoglobins und den negativ geladenen Silanolgruppen des Kapillarmaterials hin. Trotz dieser Wechselwirkungen erscheint das Signal nach recht kurzer Zeit. Dies ist auf den EOF zurückzuführen, der in einer unbeschichteten Kapillare ja in vollem Maße existiert und somit die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten beeinflusst.

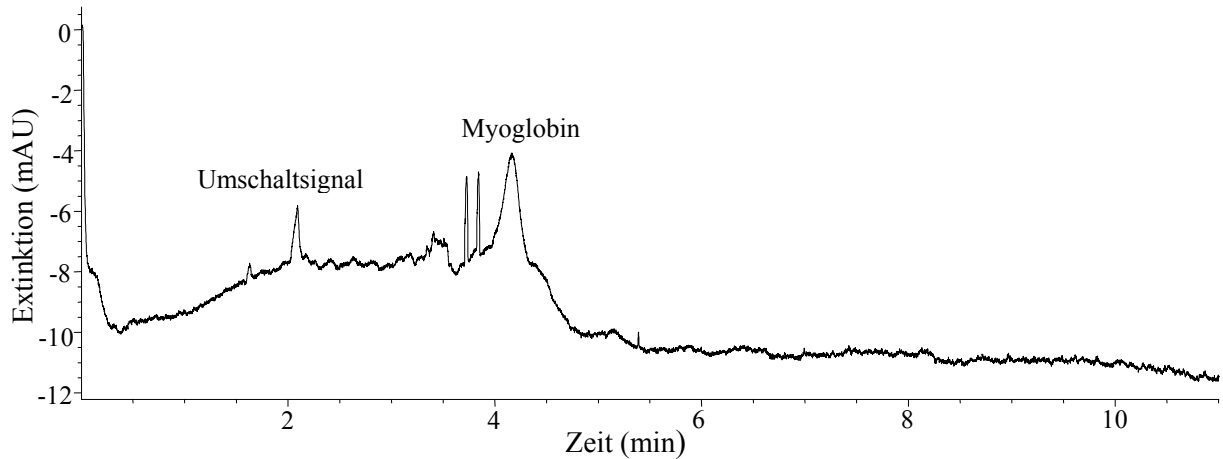


Abbildung 4-29: CIEF von Myoglobin (200 $\mu\text{g/ml}$) in fused silica Kapillare; $L_{\text{eff}} = 24,5$ cm; 2 % Ampholin 3,5 – 10; Fokussierung: 2 min 15 kV, chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer

Mit den beschichteten Kapillaren wurden recht unterschiedliche Ergebnisse erzielt, obwohl die Trennparameter bis auf leichte Abweichungen bezüglich der Kapillarlänge konstant gehalten wurden (Abbildung 4-30).

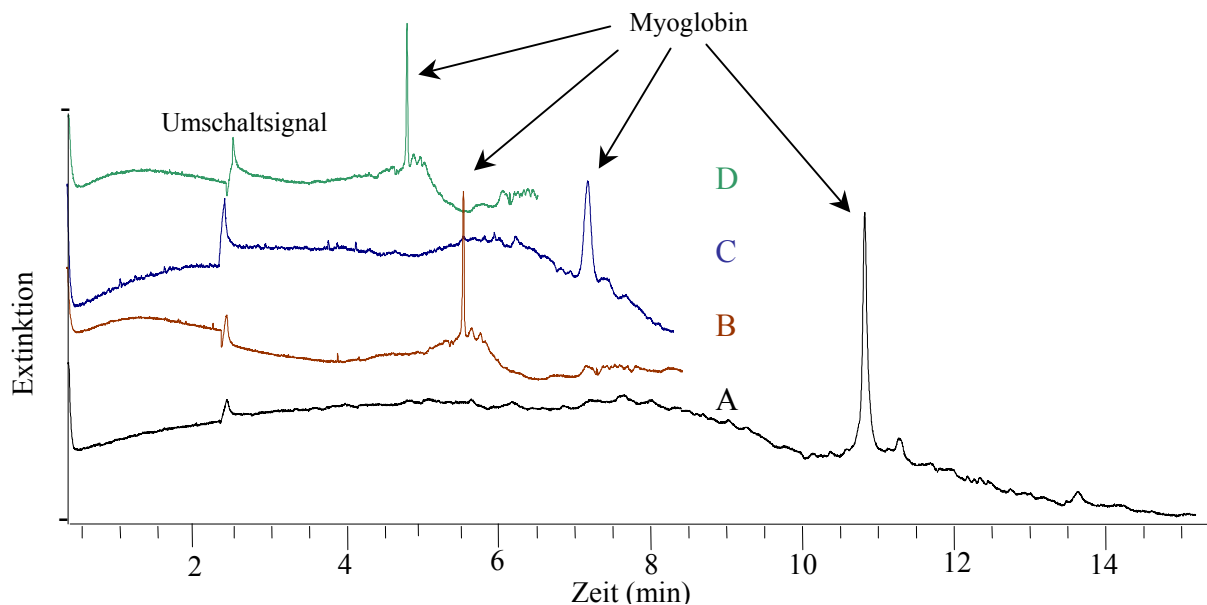


Abbildung 4-30: CIEF von Myoglobin (200 $\mu\text{g/ml}$) in beschichteten Kapillaren; 2 % Ampholin 3,5 – 10; $L_{\text{eff}} = 23,5$ bis 26 cm; Fokussierung: 2 min 15 kV; chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer; A: HEMA/W/MeOH; B: HEMA DMF; C: HEMA/W; D: Br/HEMA/DMF

Zunächst fällt auf, dass die Mobilisierung mit Kapillaren, die mit HEMA im wässrigen Medium (A und C) polymerisiert wurden, länger dauert, besonders wenn es sich bei dem Reaktionsmedium um ein Gemisch von Wasser und Methanol handelte. Dieses Verhalten lässt sich durch den sehr gering ausgeprägten EOF erklären (siehe Abschnitt 4.2.). Die

Analyten werden allein durch die chemische Veränderung des Katholyten und der damit verbundenen Neueinstellung des pH-Gradienten in Richtung Detektor mobilisiert. Dieser Theorie steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass die bromalkylsilanierte Kapillare (D) einen sehr geringen elektroosmotischen Fluss aufwies und trotzdem die Detektion des Myoglobinpeaks während der Mobilisierung nach kürzester Zeit möglich ist. An der Kapillarlänge kann es kaum liegen, denn diese ist nur 1 cm kürzer als bei den Kapillaren A und D. Die HEMA-Beschichtungen, die im Lösungsmittel DMF hergestellt wurden (B und D), führen zu ähnlichen Signalen. Die abweichenden Mobilisierungszeiten werden vermutlich durch den Kapillarlängenunterschied von ca. 10 % verursacht. Demnach sind die Trennergebnisse von diesen beiden Kapillaren vergleichbar und unterscheiden sich wesentlich von den HEMA-Beschichtungen, die im wässrigen Reaktionsmedium hergestellt wurden. In diesem Zusammenhang erfolgte die Betrachtung des Stromverlaufes während der Fokussierung bei den einzelnen Messungen. Der ermittelte Strom zu Beginn und Ende der Fokussierung ist in Tabelle 4-5 aufgelistet.

Tabelle 4-5: Resultierender Strom in unterschiedlich beschichteten Kapillaren; $U = 15 \text{ kV}$; Kapillarinhalt: 2 % Ampholin 3,5 – 10 mit Myoglobin (200 $\mu\text{g/ml}$)

Kapillare	I in μA	
	Beginn Fokussierung	Ende Fokussierung
Fused silica	3,5	2,6
Cl/HEMA/W/MeOH (A)	9,5	4,9
Cl/HEMA/DMF (B)	5,4	3,0
Cl/HEMA/W (C)	10,1	5,4
Br/HEMA/DMF (D)	5,5	3,1

Die geringste Stromstärke wurde bei der Anwendung einer fused silica Kapillare registriert. Bei den Kapillaren, deren HEMA im wässrigen Medium polymerisiert wurde, beträgt sie fast das Dreifache. Die Stromstärke I ist abhängig von der angelegten Spannung U und dem elektrischen Widerstand R . Dieser wiederum wird durch den spezifischen Widerstand ρ sowie Länge l und den Querschnitt des Leiters A bestimmt. Da die Spannung immer gleich hoch gewählt wurde, kann sie nicht zu Veränderungen führen. Die Unterschiede in den Kapillarlängen bewirken eine Änderung des elektrischen Feldes, führen aber bei den vorliegenden Abweichungen nach eigenen Vergleichsberechnungen nicht zu einem doppelt oder dreifach so hohen Strom. Die vorerst angenommene Vermutung, dass eine Verjüngung des Kapillarquerschnittes während der Polymerisation zu einer Erhöhung der elektrischen Stromstärke führt, entspricht nicht den physikalischen Gesetzmäßigkeiten. Da eine indirekte

Proportionalität besteht, führt die Abnahme des Leiterquerschnittes zu einer Senkung des Stromes. Damit bleibt als letzte Variable der spezifische Widerstand. Da die Elektrolytlösungen und Probenmengen während der Messungen nicht in der Konzentration oder Zusammensetzung geändert wurden, muss das Kapillarmaterial zu den beobachteten Stromstärkeunterschieden führen. Die Änderung vom fused silica zur beschichteten Trennkapillare ist verständlich, denn die Unterschiede in der Leitfähigkeit verschiedener Materialien treten hauptsächlich durch die unterschiedlichen Konzentrationen an quasifreien Ladungsträgern auf. Warum die HEMA Polymere zu verschiedenen Ergebnissen führen, muss durch einen unterschiedlichen Aufbau der Polymerschicht verursacht werden. Des Weiteren muss die Oberflächenstruktur der entwickelten Schichten auch die Wanderung der Analyten beeinflussen, denn anders sind die sehr abweichenden Migrationszeiten kaum zu erklären. Um diese Vermutungen zu bestätigen, sollten die HEMA-Schichten atomkraftmikroskopisch untersucht werden.

4.2.6. Atomkraftmikroskopische Aufnahmen

Da die unterschiedlich beschichteten Kapillaren in den vorangegangenen Untersuchungen zu verschiedenen Trennergebnissen führten und sich hinsichtlich der Stabilität der Polymerschicht stark unterschieden, sollte die Oberflächenstruktur mit Hilfe der AFM näher betrachtet werden. Die Untersuchung der Polymerschichten im Kapillareninnenkanal mit Hilfe der AFM stellte sich als relativ schwierig heraus. In einer Kooperation mit der TU Wien wurden verschiedene Möglichkeiten versucht, um die Polymerschicht auf der Innenfläche der Kapillaren atomkraftmikroskopisch zu untersuchen. Das Abschleifen erwies sich als ungeeignet, da dadurch Schleifpartikel die Oberfläche verunreinigten. Durch das Zerschlagen der Kapillare konnten in einigen Fällen Bruchstücke erhalten werden, bei denen der Innenkanal offen lag. Die erhaltenen AFM-Aufnahmen wurden im Rahmen von Vorträgen und Postern veröffentlicht [67, 68] und sollen im Rahmen dieses Kapitels als Vergleichswerte dienen. Bedingt durch die geringe Ausbeute an geeigneten Bruchstücken und erschwert durch die Kapillarkrümmung war der Zeitaufwand bei der Suche nach geeigneten Untersuchungsstellen für die AFM, im Vergleich zu den erhaltenen Ergebnissen, unverhältnismäßig hoch. Aus dem eben genannten Grund wurde schließlich ein anderer Weg gewählt. Durch Kontaktaufnahme mit dem Hersteller der verwendeten fused silica Kapillaren wurde versucht, Wafer aus dem gleichen Material zu erhalten. Durch die Behandlung der planaren Oberflächen analog zur Beschichtung der fused silica Kapillaren konnten die

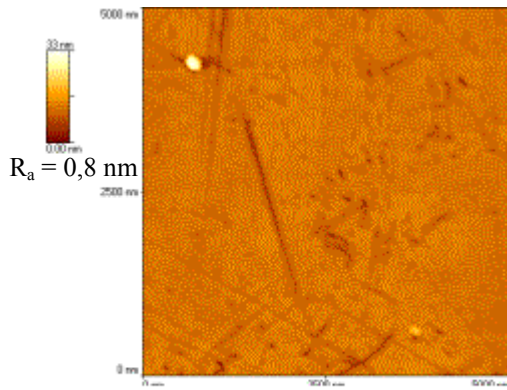


Abbildung 4-31: AFM des unbehandelten Wafers

Veränderungen der Oberflächenstruktur vom fused silica zur HEMA-Beschichtung verfolgt werden und es waren Vergleiche zwischen den fertigen Polymerschichten möglich. Dass diese Ergebnisse nicht hundertprozentig auf die Kapillaren übertragen werden können ist verständlich, denn neben unterschiedlichen Druckverhältnissen ist natürlich auch die molare Menge des zur Verfügung stehenden Monomers in der Kapillare begrenzt. Trotzdem können sicherlich grundlegende Erkenntnisse aus dieser Untersuchung gewonnen werden. Zur Charakterisierung von Oberflächen mit Hilfe der AFM werden sogenannte Rauigkeitswerte R_a oder RMS ermittelt. R_a stellt das arithmetische Mittel der gemessenen Cantilever-Auslenkungen dar. Zunächst einmal zeigt die Oberfläche des unbehandelten Wafers Rauigkeitswerte R_a von weniger als 1 nm (Abbildung 4-31). Die von uns durchgeführten Untersuchungen im Innenkanal einer fused silica *Kapillare* wiesen R_a -Werte von 0,4 – 0,6 nm auf. Basierend auf diesen Ergebnissen und bestätigt durch eine Veröffentlichung von Pullen et al. [21], in der ähnliche Rauigkeitswerte für fused silica Kapillaren angegeben werden, kann die Oberfläche des unbehandelten Wafers durchaus mit der einer unbeschichteten Kapillare verglichen werden. Die AFM-Aufnahme in Abbildung 4-31 zeigt eine relativ glatte und die für Gläser typische kratzerähnliche Struktur.

Durch die Behandlung mit dem Chloralkylsilan entstehen lokale Erhebungen, die jedoch die ursprüngliche Glasoberfläche nicht vollständig bedecken (Abbildung 4-32, links). Diese teilweise sehr ausgedehnten Flächen sind über die ganze Glasoberfläche verteilt. Ähnliche Gebilde wurden auch auf der Innenseite silanisierter *Kapillaren* gefunden (Abbildung 4-32, rechts).

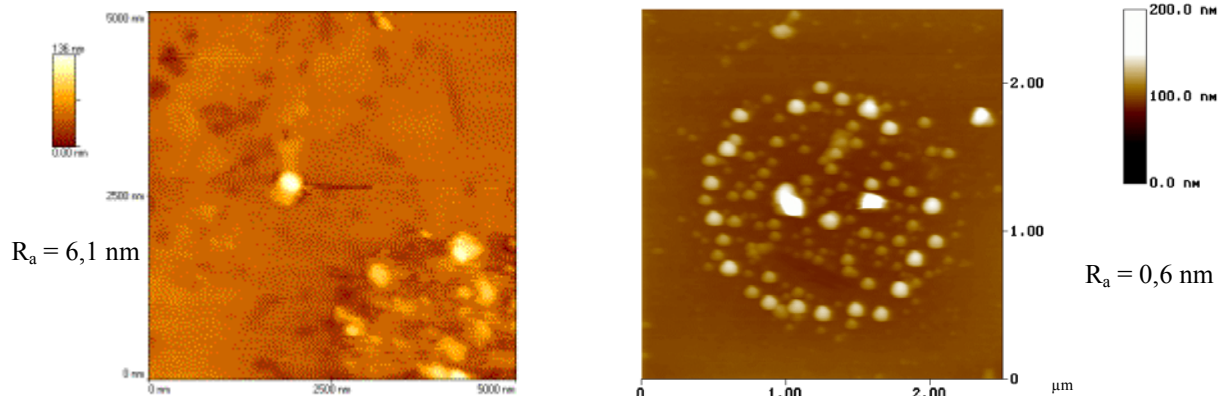


Abbildung 4-32: AFM nach Behandlung mit Trichlorsilyl-(m/p-chlormethylphenyl)ethan
links: Oberfläche des Wafers
rechts: Oberfläche des Kapillarinnenkanals

Das Auffinden solcher charakteristischen Oberflächenmorphologien lässt auf einen vergleichbaren molekularen Aufbau der Initiatormoleküle auf dem Wafer, wie auch der Kapillarinnenseite schließen. Wesentliche Unterschiede weisen die Rauigkeitswerte auf, sie betragen auf der Waferoberfläche ca. das zehnfache von dem der Kapillare.

Nach diesem Modifizierungsschritt war auf einige Proben des Wafers die ursprüngliche kratzerähnliche Oberfläche des unbehandelten Materials noch gut erkennbar. Erst nach anschließender Behandlung mit dem sterisch kleineren Chloralkylsilan erscheinen die „Kratzspuren“ nur noch als leichte Schatten, was auf eine verbesserte Abdeckung schließen lässt (Abbildung 4-33, links).

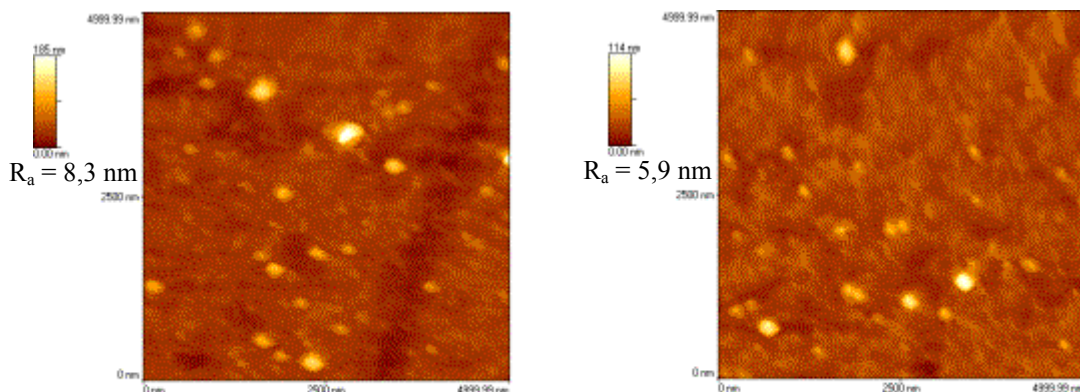


Abbildung 4-33: links: AFM nach Behandlung mit 3-Chlorpropyltrichlorsilan
rechts: AFM nach Hydrolyse mit Essigsäure

Außerdem erhöht sich die Anzahl der Erhebungen (hellere Flecken), auch Pixel genannt, und es werden Rauigkeiten von ca. 7 nm messbar. Die Oberflächenstruktur verändert sich durch die Behandlung mit Essigsäure kaum (Abbildung 4-33, rechts). Dies war auch zu erwarten, denn schließlich soll mit diesem Hydrolyseschritt lediglich eine Verknüpfung der Moleküle untereinander über Sauerstoffbrücken erreicht werden.

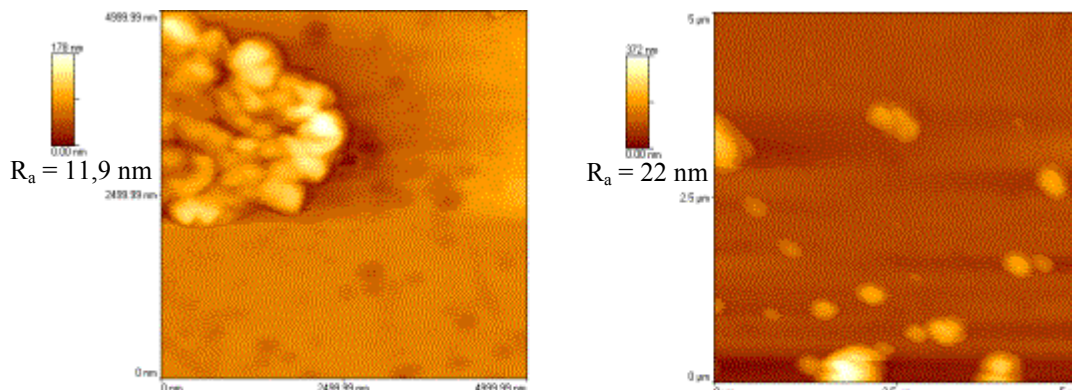


Abbildung 4-34: links: AFM nach Behandlung mit 11-(2-Brom-2- methyl)-propionyloxy)-undecyltrichlorsilan
rechts: AFM nach zusätzlicher Behandlung mit 3-Chlorpropyl-trichlorsilan

Durch die Behandlung mit dem Bromalkylsilan werden weniger, aber flächenmäßig größere Erhebungen beobachtet. Die ursprüngliche Waferoberfläche ist kaum noch erkennbar (Abbildung 4-34, links). Es scheint als würde die Silanisierung an manchen Stellen bevorzugt ablaufen. Die Rauigkeitswerte innerhalb einer Probe schwanken stark und sind im Vergleich zur Chloralkylsilanisierung doppelt bis dreimal so hoch. Durch die Behandlung mit dem weniger voluminösen Silan erhöht sich die Anzahl der Pixel und ihre Fläche nimmt ab (Abbildung 4-34, rechts).

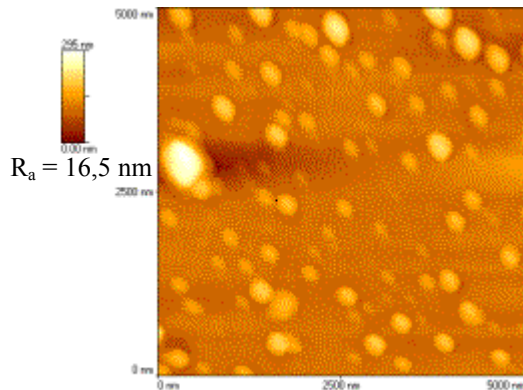


Abbildung 4-35: AFM der bromalkylsilanisierten Wafer nach Hydrolyse

Die Hydrolyse mit Essigsäure verstärkt diesen Oberflächeneffekt weiter (Abbildung 4-35). In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu den chloralkylsilanisierten Kapillaren keine Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten bei den DMSO-Beweglichkeiten durch die Hydrolyse mit Essigsäure erreicht werden kann. Das heißt, es findet entweder keine Sauerstoffverbrückung statt oder es kommt zur teilweisen Zerstörung der Silane selbst.

Die resultierende Oberfläche der HEMA-Beschichtung ist weniger von dem verwendeten Silan abhängig, sondern vielmehr vom Lösungsmittel, in dem die Polymerisation stattfand. So entsteht bei der Verwendung von DMF in einer Reaktionszeit von 4 h eine recht glatte Schicht, die alle bisherigen Unebenheiten überdeckt. Die gleichmäßige Struktur mit wiederkehrendem Muster lässt auf ein Polymer mit geringer Polydispersität schließen (Abbildung 4-36).

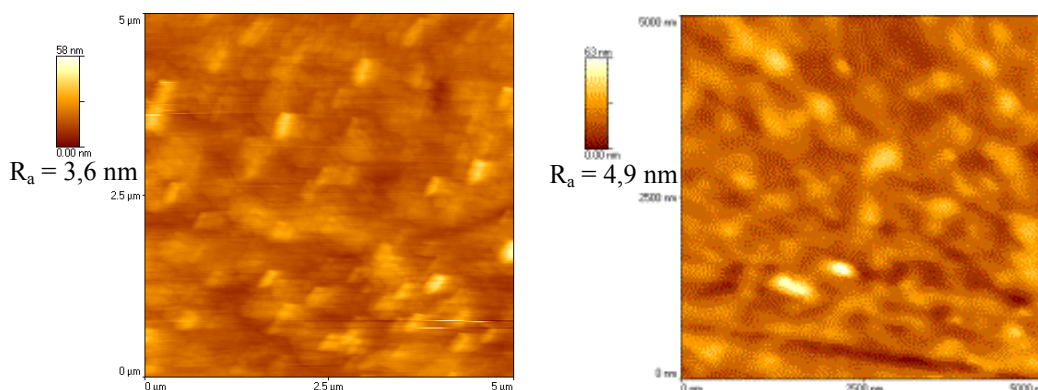


Abbildung 4-36: AFM nach Polymerisation von HEMA in DMF auf der Grundlage verschiedener Initiator-moleküle
links: Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan
rechts: 11-(2-Brom-2-methyl)-propionyloxy)-undecyltrichlorsilan

Unerwartet ähneln sich die Oberflächen dieser beiden Beschichtungen sehr, obwohl die Kapillare mit dem Bromalkylsilan als Startermolekül eine viel geringere Stabilität bei pH 9 zeigte. Eine denkbare Erklärung wäre, dass das Bromalkylsilan einen geringeren Abdeckungsgrad an Startermolekülen liefert als das Silan mit dem Cl als Endgruppe. Dadurch wird nur ein gewisser Teil an HEMA-Monomer fest mit der Kapillaroberfläche verbunden. Trotzdem wird eine gleichmäßige Struktur mit der AFM sichtbar, dies könnte auch auf physikalische Adsorption zurückzuführen sein. Dass anfangs ein sehr hoher Abdeckungsgrad an HEMA vorliegt, zeigten die sehr geringe DMSO-Beweglichkeit bei den EOF-Messungen und die guten Trennstufenzahlen bei den Proteintrennungen bei pH 3. Durch den wiederholten Gebrauch der Kapillare vor allem im basischen Medium löst sich das Polymer zunehmend ab und die fused silica Oberfläche wird freigelegt. Damit kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Analyten und Kapillarinnenwand, was während des Langzeittestes zu einer starken Erniedrigung der Trennstufenzahlen führt. Zur HEMA-Beschichtung von chloralkylsilanisierten *Kapillaren* im Lösungsmittel DMF liegen auch Untersuchungsergebnisse vor (Abbildung 4-37). Dabei können auch hier wiederkehrende wellenartige Strukturmerkmale erkannt werden. Die sehr hellen kreisförmigen Flecken sind dabei nicht oberflächen-echt, sondern rühren von Ladungseffekten des fused silica her. Die Rauigkeitswerte betragen im Vergleich zu den Untersuchungen an den Wafern nur 1/10. In der gleichen Größenordnung unterschieden sich auch die R_a -Werte bei dem silanisierten Wafer und der entsprechend modifizierten Kapillaroberfläche (Abbildung 4-32). Diese Unterschiede zwischen Wafern und Kapillarinnenfläche deuten nicht zwangsläufig auf unterschiedlich starke Polymerschichten hin. Da es sich bei den R_a -Werten um Standardabweichungen bezüglich der Höhenunterschiede auf der gemessenen Fläche handelt, kann man aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass man in den Kapillaren einen gleichmäßigeren Polymerfilm erhält.

Die mit nur einer Stunde viel schneller verlaufende Reaktion im Wasser/Methanol-Gemisch führt zu einer viel stärker strukturierten Oberfläche. Dabei kann zwar auch hier eine gewisse Gleichmäßigkeit erkannt werden, jedoch treten immer wieder stärkere Erhebungen auf und

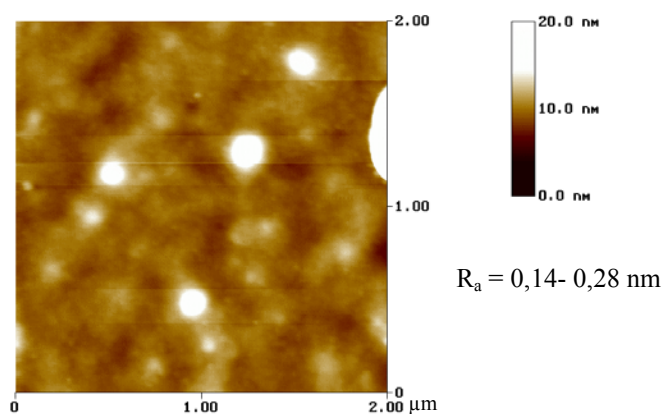


Abbildung 4-37: AFM der Kapillarinnenseite nach Polymerisation von HEMA in DMF auf der Grundlage von Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan

die Rauigkeiten sind ca. 3 – 4 mal höher als bei der Beschichtung der Wafer in DMF. Die ATRP scheint also nicht nur schneller, sondern auch unkontrollierter abzulaufen. Die damit verbundene breite Verteilung an kurzen und langen Polymerketten erklärt die unebene Struktur der entstehenden Schicht (Abbildung 4-38).

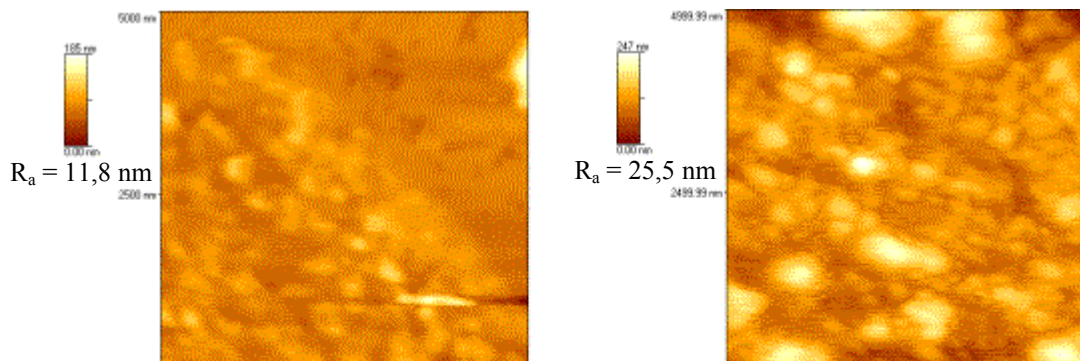


Abbildung 4-38: AFM nach Polymerisation von HEMA in Wasser/Methanol auf der Grundlage verschiedener Initiator-moleküle
links: Initiator: Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan
rechts: 11-(2-Brom-2-methyl-propionyloxy)-undecyltrichlorsilan

Dass die Polymerisation im wässrigen Medium zu höheren Polydispersitäten führt, bestätigen auch Untersuchungen von Robinson [60]. Durch die sehr porige Struktur entsteht eine größere Fläche, in der sich Analyten und Puffersalze ablagern können bzw. einen viel weiteren Weg durch die Kapillare zurücklegen müssen. Dies könnte eine Erklärung für die längeren Migrationszeiten bei der CIEF und den damit verbundenen breiteren Peaks sein. Außerdem wäre es denkbar, dass durch die schnell ablaufende ATRP Kupferionen des Katalysatorkomplexes in das Polymergerüst eingeschlossen werden. Diese zum Stromtransport befähigten Ionen könnten die Ursache für das stärker ausgeprägte elektrische Feld sein, wenn mit Kapillaren getrennt wurde, deren Beschichtung im wässrigen Medium polymerisiert wurde. Bei der beobachteten ungleichmäßigen Struktur ist es auch möglich, dass einige Stellen nicht mit HEMA abgedeckt wurden. Hier liegen ungeschützte Silane frei und bieten als hydrolyseempfindliche Moleküle Angriffsstellen für die Zerstörung der Polymerschicht. Eine solche Beschädigung könnte die Erklärung für die stark abnehmenden Trennstufenzahlen während des Langzeittests bei pH 9 im Falle der in Wasser/Methanol beschichteten Kapillaren sein.

4.3. Kopplung der CE mit der ESI-MS

4.3.1. Proteintrennung mit einem ESI-MS verträglichen Ammoniumformiatpuffer

Bevor die beschichteten Kapillaren zur Kopplung der CE mit dem ESI-Massenspektrometer genutzt werden konnten, musste das bisherige Puffersystem ausgetauscht werden. Für den ESI-Prozess ist ein leicht verdampfbarer Elektrolyt notwendig. Außerdem ist es sinnvoll, möglichst keinen Natriumpuffer zu verwenden, da Natriumionen leicht Addukte mit den Analyten bilden. Die Wahl fiel auf einen Ammoniumformiatpuffer pH 3, dessen Trennleistung bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden sollte. Als Trennkapillaren dienten chloralkylsilanierte Kapillaren, wobei die Polymerisation des HEMA zum Einen im Lösungsmittel DMF und zum Anderen im Lösungsmittelgemisch Wasser/Methanol stattgefunden hatte. Beim Vergleich der erreichten Trennstufenzahlen bei Verwendung eines 20 mM Natriumphosphatpuffers und eines 20 mM Ammoniumformiatpuffers zeigten sich deutliche Unterschiede (Abbildung 4-39).

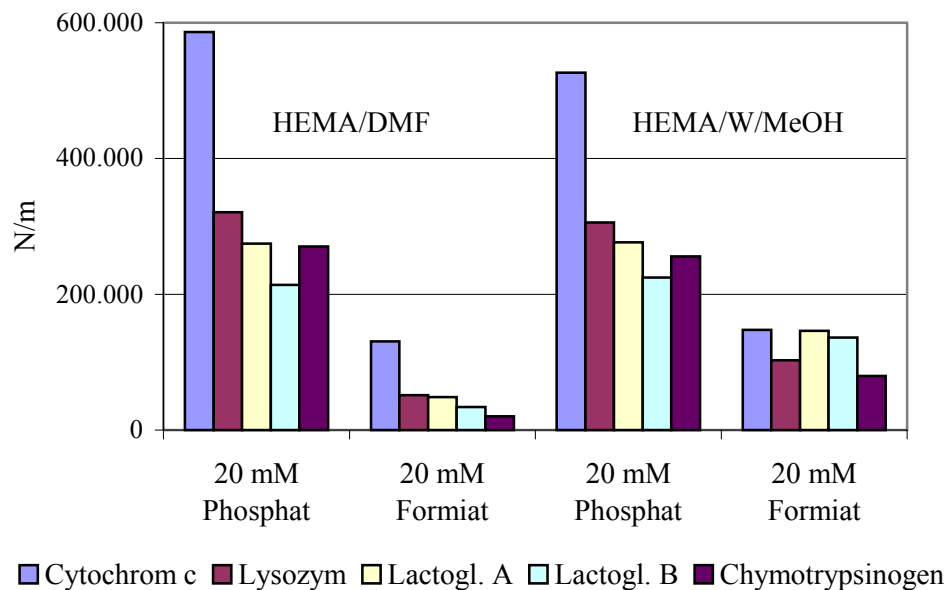


Abbildung 4-39: Vergleich der erreichten Trennstufenzahlen mit einem Natriumphosphatpuffer und einem Ammoniumformiatpuffer als Trennmedium; Trennkapillare chloralkylsilaniert und HEMA entweder in DMF oder in Wasser/Methanol polymerisiert

So nahmen die Trenneffizienzen in beiden Kapillaren um mehr als 50 % ab. Im Falle des Chymotrypsinogens betrug die erreichte Trennstufenzahl pro Meter mit 20 450 nur noch 1/10 von der Trennstufenzahl, die mit der HEMA in DMF polymerisierten Kapillare und mit dem 20 mM Phosphatpuffer erzielt wurde. Eine Ursache hierfür könnte in Leitfähigkeitsunterschieden liegen. Symmetrische Peaks erhält man vor allem dann, wenn

sich die Leitfähigkeit in der Probenzone kaum von der des Puffers unterscheidet [1]. Obwohl die Kationen und Anionen der beiden untersuchten Puffersysteme zwar in gleicher Konzentration vorliegen, kommt es bei gleich hoher Spannung zu unterschiedlichen Feldstärken (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Resultierende Ströme in μA bei Anlegen einer gleichen Spannung von 30 kV unter Verwendung unterschiedlich konzentrierter Puffersysteme; Kapillare HEMA/DMF $L_{\text{eff}} = 56 \text{ cm}$; Kapillare HEMA/W/MeOH $L_{\text{eff}} = 46 \text{ cm}$

Konzentration Puffer	Kapillare HEMA/DMF	Kapillare HEMA/W/MeOH
20 mM Phosphat	12,3	11,5
20 mM Formiat	19,2	18,6
50 mM Formiat	47,7	42,7
100 mM Formiat	98,6	92,1

Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen Äquivalentleitfähigkeiten [69] der zum Stromtransport befähigten Ionen.

$$\text{Na}^+: \lambda_{\infty}^+ = 50,1 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{H}_2\text{PO}_4^-: \lambda_{\infty}^- = 33 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\text{NH}_4^+: \lambda_{\infty}^+ = 73,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{HCOO}^-: \lambda_{\infty}^- = 54,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Dies entspricht einer Äquivalentleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung von [70]:

$$\lambda_{\infty} = \lambda_{\infty}^+ + \lambda_{\infty}^- \quad (4-2)$$

$$\text{NaH}_2\text{PO}_4: \lambda_{\infty} = 83,1 \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\text{NH}_4\text{COOH}: \lambda_{\infty} = 128,1 \text{ m}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Neben der Tatsache, dass sich die Stromstärke im 20 mM Phosphatpuffer von der des gleich hoch konzentrierten Formiatpuffers unterscheidet, gibt es auch Unterschiede zwischen den Kapillaren. Trotz eines Kapillarlängenunterschiedes von 10 cm werden ähnliche Ströme gemessen. Dies deutet auf einen unterschiedliche Beitrag der beiden HEMA-Beschichtungen zur Leitfähigkeit hin. Die Erhöhung der Ammoniumformiatkonzentration bewirkte erwartungsgemäß einen weiteren Anstieg der Stromstärke und bedeutete damit auch einen stärkeren Unterschied bezüglich der Leitfähigkeit zwischen Probenzone und Trennpuffer, was wiederum die Signalsymmetrie negativ beeinflusst. Abbildung 4-40 stellt das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Proteine hinsichtlich der Trenneffizienz in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration dar. So vervierfachten sich die Trennstufenzahlen im Falle des Lysozyms mit der Konzentrationszunahme des Trennpuffers. Cytochrom c und Chymotrypsinogen hingegen zeigten bei der hohen Pufferkonzentration eher schlechtere Peakformen im Vergleich zum 20 mM Formiatpuffer.

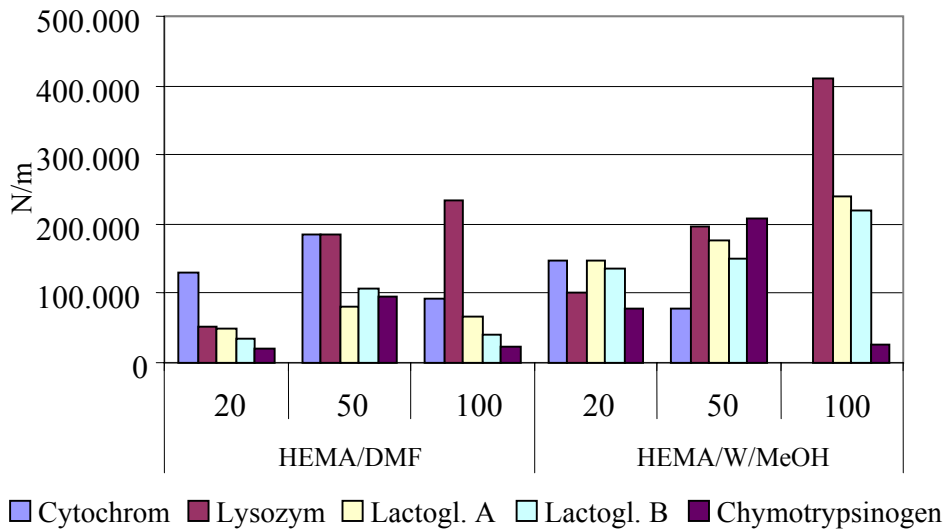


Abbildung 4-40: Vergleich der erreichten Trennstufenzahlen bei unterschiedlicher Konzentration des Ammoniumformiatpuffers; Trennkapillare chloralkylsilanisiert und HEMA entweder in DMF oder Wasser/Methanol polymerisiert

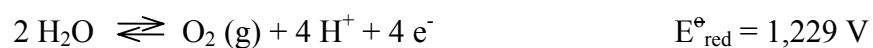
Im Allgemeinen erhöht sich mit der Pufferkonzentration auch die Ionenstärke (Gleichung 4-3) und dies kann sich zunächst positiv auf die Trennergebnisse auswirken, da die Ionenstärke eventuell vorhandene elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Analytationen und den negativ geladenen Silanolgruppen der Kapillarenwand beeinflusst [15].

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (4-3)$$

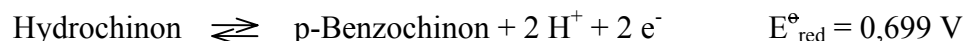
Mit dem Anstieg an Ladungsträgern erhöht sich jedoch auch die elektrische Feldstärke und damit auch die JOULEsche Wärme. Um eine damit verbundene Bandenverbreiterung der Probenzonen infolge von Diffusionsvorgängen gering zu halten, sollte man die Pufferkonzentration möglichst niedrig wählen. Aufbauend auf dieser Tatsache und aufgrund dieses recht unterschiedlichen Verhaltens bezüglich der Trennstufenzahlen wurde die mittlere Konzentration von 50 mM als geeignetste Pufferkonzentration für das vorliegende Trennproblem festgelegt.

4.3.2. Zusatz von Hydrochinon zum Trennmedium

Durch das erzeugte elektrische Feld in der Kapillarelektrophorese setzt oftmals die elektrochemische Zersetzung des Wassers nach folgender Reaktion ein:



Dabei kommt es zur Ausbildung von Gasblasen, welche das elektrische Feld stören oder im schlimmsten Fall zu seinem Zusammenbruch führen. In diesem Fall wird die Messung hinfällig. Weiterhin führt diese Reaktion des Puffers zu einer pH-Wertveränderung. Die Änderung des pH-Wertes und die Störung des elektrischen Feldes wirken sich auf die Mobilität und damit auf die Auftrennung der Analyten aus. Durch den Zusatz des leichter oxidierbaren Hydrochinons [71] wird die elektrochemische Reaktion des Wassers unterdrückt:



In den durchgeführten Untersuchungen konnte auch tatsächlich durch den Zusatz von Hydrochinon ein konstanter Stromverlauf während der Trennung beobachtet werden.

In einem Vergleich wurde eine Probe ohne und mit dem Zusatz von 10 mM Hydrochinon zum Trennpuffer unter gleichen Bedingungen getrennt. In den ersten 6 min nach erfolgter Injektion der Probe lag eine Spannung von 30 kV an und ab der 6. Minute zusätzlich ein hydrodynamischer Fluss von 50 mbar. In Abbildung 4-41 sieht man deutlich, dass ohne den Zusatz von Hydrochinon der Strom zunächst kontinuierlich abnimmt. Durch das zusätzliche Anlegen des hydrodynamischen Flusses von 50 mbar steigt er langsam wieder auf seinen Ausgangswert an. Dies ist damit zu erklären, dass zum Einen vorhandene Gasblasen aus der Kapillare gespült werden und zum Anderen frischer Puffer in seiner ursprünglichen Zusammensetzung nachgeliefert wird.

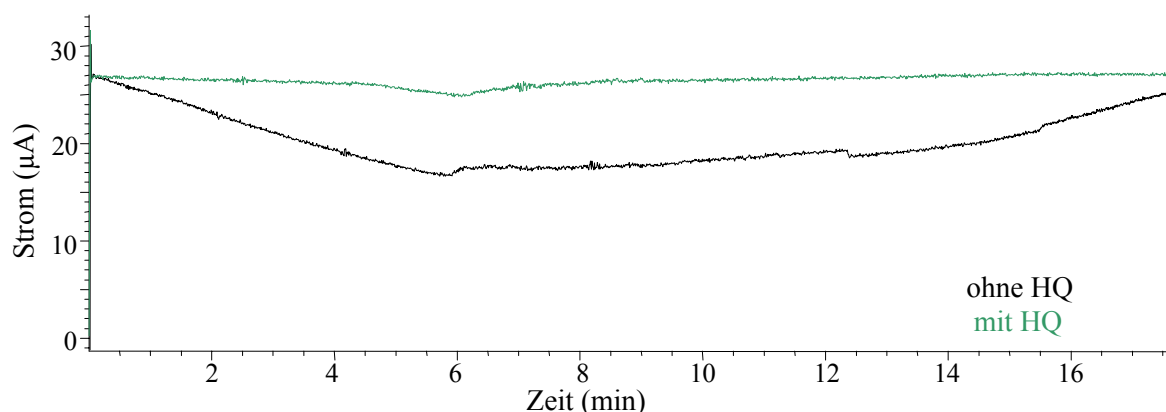


Abbildung 4-41: Stromverlauf während der Messung mit (grün) und ohne (schwarz) Hydrochinon (HQ) zum Puffersystem, $U = 30 \text{ kV}$, nach 6 min zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar

Durch den Zusatz von Hydrochinon bleibt der Strom während der ersten 5 min nahezu konstant und beginnt dann zu sinken. Wahrscheinlich wird zunächst das Hydrochinon oxidiert, ist es dann aufgebraucht, beginnt die Zersetzung des Puffers mit den bereits beschriebenen Folgen. Hier erholt sich der Strom mit Anlegen des hydrodynamischen Flusses

sehr schnell. Die nur sehr geringfügige Änderung des elektrischen Feldes während der Messung bewirkt eine bessere Auftrennung der Peaks. Bei der Kopplung von CE mit der ESI-MS wurde in die ca. 90 cm lange Trennkapillare nach 22 cm ein zusätzliches Fenster gebrannt. Die UV-Detektion der Analyten nach dieser kurzen Trennstrecke war hilfreich für die Abschätzung der Gesamttrenndauer. Abbildung 4-42 zeigt das Elektropherogramm mit UV-Detektion nach einer Trennstrecke von nur 22 cm.

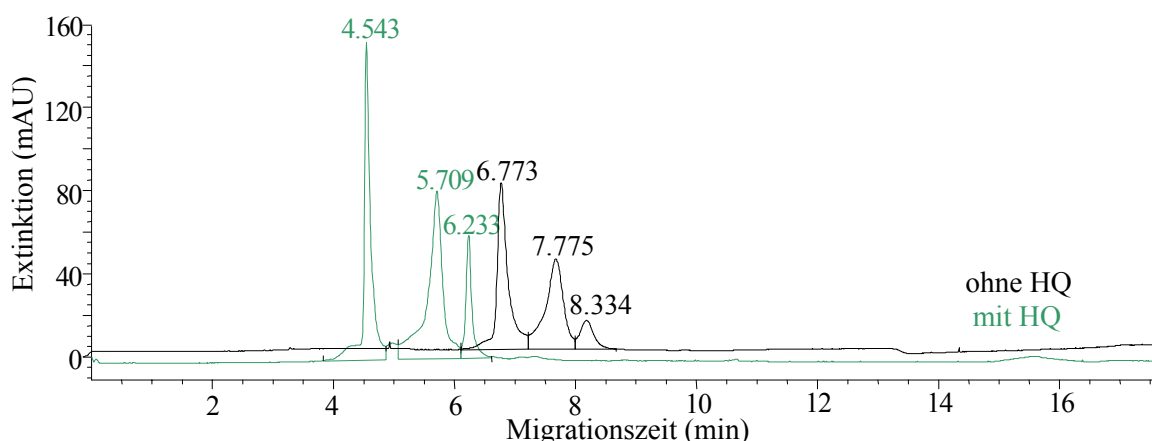


Abbildung 4-42: Elektropherogramm das zusätzlich während der CE/ESI-MS Kopplung aufgenommen wurde; $L_{\text{eff}} = 22\text{cm}$; $L_{\text{tot}} = 90\text{ cm}$; $U = 30\text{ kV}$; Trennmedium: Wasser + 1,5 % Ameisensäure mit (grün) und ohne (schwarz) Zusatz von Hydrochinon (HQ);

Die Peaks erscheinen durch den Zusatz von Hydrochinon ca. 2 min eher am Detektor als bei der Trennung ohne dieses Additiv. Dies bedeutet bei einer Gesamtlänge der Kapillare von ca. 90 cm eine Zeitersparnis von mindestens 8 min. Außerdem werden die drei Peaks wesentlich besser basisliniengetrennt. In beiden Fällen dürfte der Grund dafür im nahezu konstanten elektrische Feld liegen, denn so bleibt die Mobilität der Proteine unverändert und sie können sich zu einzelnen Zonen zusammen finden, die sich in gleicher Geschwindigkeit in Richtung Detektor bewegen. In weiteren Untersuchungen wurde dann eine Hydrochinon-Konzentration von 20 mM gewählt, um das elektrische Feld länger auf einem Niveau zu halten.

Der Zusatz von Hydrochinon kann jedoch auch zu Addukten mit den zu trennenden Proteinen führen, dieses Problem soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

Adduktbildung zwischen Hydrochinon und Protein

Bei einigen Messungen wurden neben den erwarteten Masse/Ladungsverhältnissen auch unbekannte Ladungsverteilungen beobachtet. Diese konnten jedoch nur nachgewiesen werden, wenn das Protein bei angelegter Spannung eine Weile Kontakt mit dem Trennmedium hatte, ehe es aus der Kapillare mit zusätzlichem hydrodynamischem Fluss

heraus geschoben wurde. Besonders deutlich zeigte sich das Phänomen bei der Analyse des Lysozyms. (Abbildung 4-43)

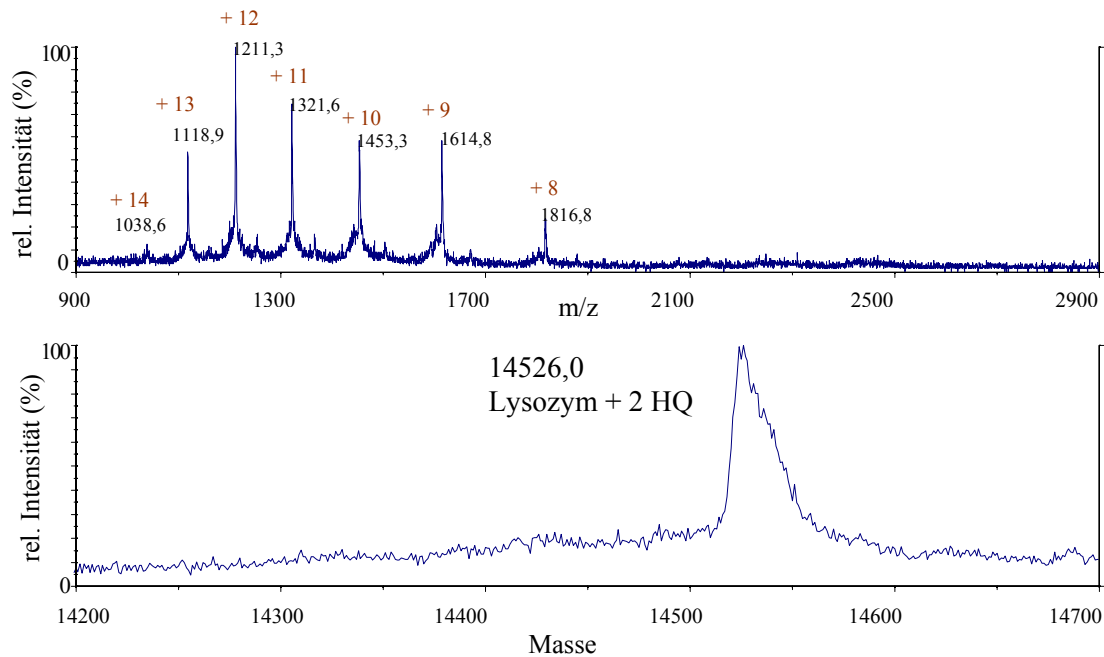


Abbildung 4-43: Oben: Masse-Ladungsverteilung des Hydrochinon-Lysozym-Adduktes; braune Zahlen über den Peaks geben den Ladungszustand wieder
unten: dazugehörige Deconvolution

Die Deconvolution der unbekannt Masse/Ladungszahlen ergab eine Molmasse von 14 526 g/mol. Das entspricht einem Lysozym (14 306 g/mol) mit zwei Hydrochinonmolekülen (110 g/mol).

Im elektrischen Feld der Kapillare wird das Hydrochinon elektrochemisch zu p-Benzochinon zersetzt, gleichzeitig wirkt es jedoch auch als starkes Reduktionsmittel, welches die Disulfidbrücken im Protein zu Sulfuryl-Gruppen reduziert. An diese kann dann die zu p-Benzochinon oxidierte Form des Hydrochinons über eine Michael-Addition angebinden werden [72, 73] (Abbildung 4-44).

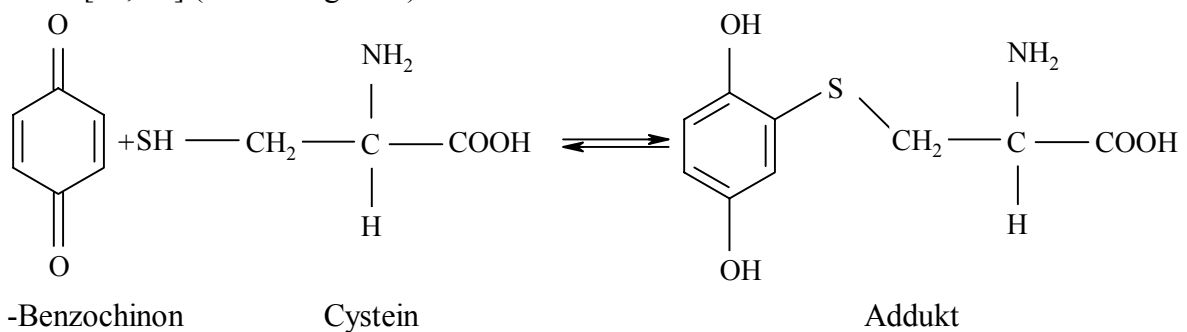


Abbildung 4-44: Reaktionsgleichung der Adduktbildung zwischen Hydrochinon und Cystein nach dem Prinzip der Michael-Addition

Lysozym verfügt über 8 Cysteineinheiten, die über 4 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Nach erfolgter Reduktion ist das Lysozym zur Adduktbildung befähigt.

Um festzustellen, ob diese Reaktion auch bei anderen Proteinen stattfindet, wurde die selbe Messung mit Lactalbumin durchgeführt, welches ebenfalls über 8 Cysteinreste in seiner Aminosäuresequenz verfügt.

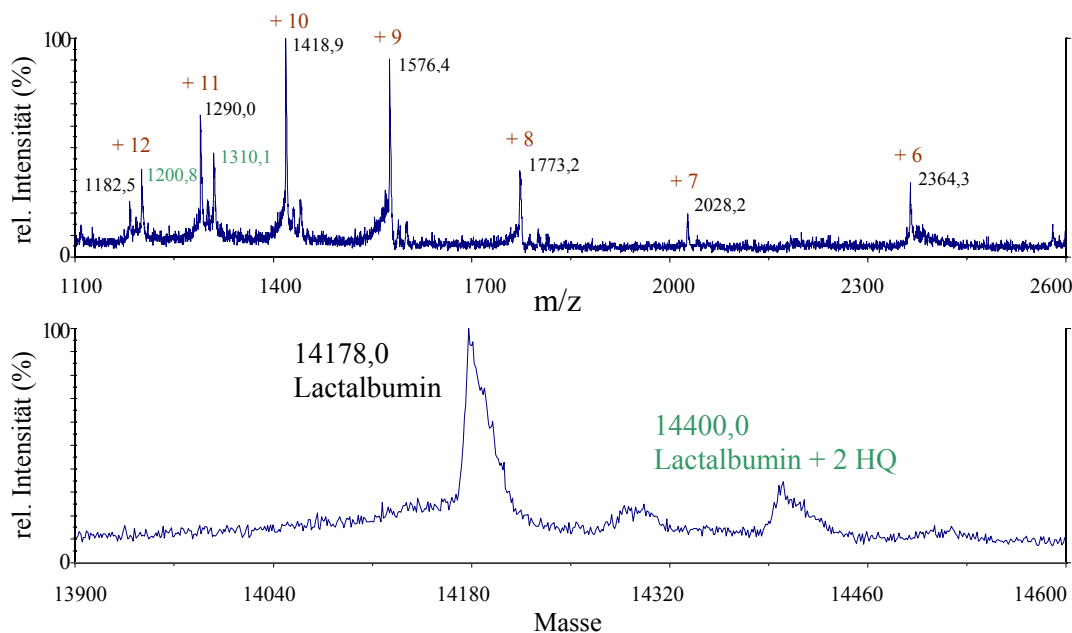


Abbildung 4-45: Oben: Masse-Ladungsverteilung des Lactalbumin (schwarz) und seines Hydrochinon-Adduktes (grün); braune Zahlen = Ladungszustand unten: dazugehörige Deconvolution

Auch hier konnten Addukte von Lactalbumin mit zwei Hydrochinonmolekülen gefunden werden. Wie man in Abbildung 4-45 sieht, werden jedoch nur recht intensitätsschwache Peaks beim Ladungszustand +11 und +12 detektiert. Das Addukt des Lactalbumins ist zudem kaum vom eigentlichen Lactalbumin abgetrennt, d.h. beide Proteinspektren werden zur gleichen Zeit detektiert.

Die Tatsache, dass nur Addukte mit zwei Hydrochinonmolekülen gefunden wurden, obwohl in beiden Fällen 8 Cysteinreste vorhanden sind, könnte kinetische Gründe haben. So ist die Konzentration des zur Verfügung stehenden Additivs begrenzt. Zum Anderen ist wahrscheinlich gerade die Bildung der mono- und bi-Addukte energetisch günstiger als die Anbindung von drei und mehr Hydrochinonmolekülen an das Protein. Die bevorzugte Bildung bestimmter kovalent gebundener Addukte konnte auch bei Untersuchungen an Glutathion gezeigt werden [72]. Dabei wurden die Konzentrationsverhältnisse der möglichen Hydrochinon-Glutathion-Derivate mittels GC-MS ausgewertet. Weiterhin spielen natürlich auch sterische Gründe eine entscheidende Rolle. Durch die gefaltete Struktur der Proteine sind nicht alle Aminosäuren zugänglich (Abbildung 4-46). Somit ist es gut möglich, dass

einige Cysteinreste im Inneren der Knäuelstruktur liegen und damit nicht als Reaktionspartner für die Adduktbildung zur Verfügung stehen.

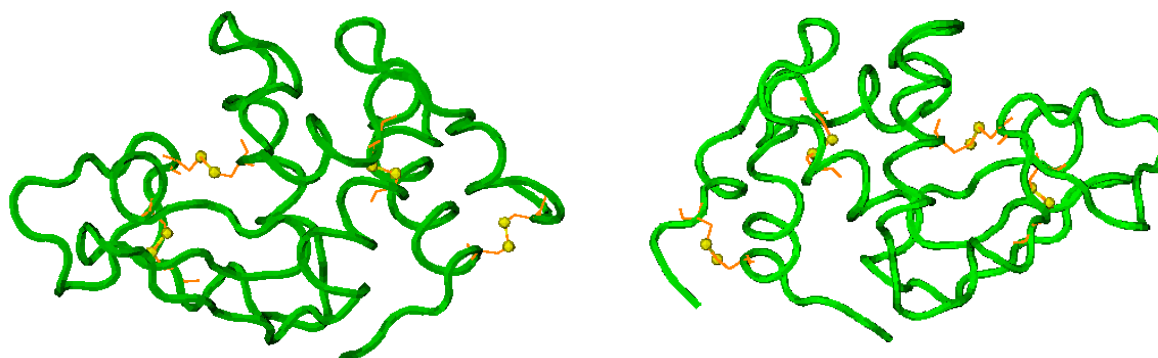


Abbildung 4-46: Proteinstruktur des Lysozyms (links) und des Lactalbumins (rechts); die über Disulfidbrücken (gelb) verbundenen Cysteinreste sind orange gekennzeichnet

4.3.3. Anpassung weiterer Geräte- und Trennparameter für eine erfolgreiche Kopplung

Nachdem in einigen Versuchen festgestellt wurde, dass man mit dem Zusatz von Hydrochinon weitaus bessere Trennergebnisse erzielen kann als ohne, mussten jetzt noch einige andere Schwierigkeiten behoben werden. Dazu gehörte die Trenndauer. Durch die Länge der Kapillare von 90 cm hatte sich die Wegstrecke zur ursprünglichen CZE um 33 % erhöht. Damit führte eine gewählte Spannung von 30 kV zu einer wesentlich geringeren elektrischen Feldstärke E . Dies wirkt sich natürlich auf die Wanderungsgeschwindigkeit (Gleichung 2-1) der Analyten aus und so führen diese beiden Faktoren zu längeren Analysezeiten. Um der Probe ausreichend Zeit zur Auftrennung zu geben, ohne dass die Zersetzung des Wassers beginnt, wurde bei allen sich anschließenden Messungen zunächst für 8 min eine Spannung von 30 kV anlegt und ab da zusätzlich ein hydrodynamischer Fluss von 50 mbar gewählt. Dadurch blieb das elektrische Feld konstant und die Analysezeiten betragen nicht mehr als 25 min. Nachteilig wirkt sich dabei natürlich die Erzeugung eines parabolischen Flussprofils analog zur HPLC aus. Dies kann eine Überlappung oder Verbreiterung der getrennten Zonen zur Folge haben und damit zu Verlusten in der Trenneffizienz führen. Daher wurde auch die Möglichkeit untersucht, erst die Probe in der Kapillare Richtung ESI-Massenspektrometer zu schieben und dann mit der Trennung bei 30 kV zu beginnen. Allerdings entstand dabei ein wesentlich instabileres Spray und es konnten Ladungsverteilungen von nur sehr geringer Intensität beobachtet werden. Und so blieb die zu erst genannte Möglichkeit die Methode der Wahl.

Um ein gleichmäßiges Versprühen von Probe und Sheath-flow zu gewährleisten, reichte in den meisten Fällen ein Spraytip-Potenzial von 1500 V. Der Fluss des Zerstäubergases wurde so gering wie möglich gewählt. Weiterhin war es notwendig, die Position des Sprühkopfes bei Wechsel der Kapillaren neu zu justieren (siehe Kapitel 3, Exp. Teil) um maximale Intensitäten zu erreichen.

Als nächstes erfolgte die Zusammenstellung einer Testmischung aus verschiedenen Proteinen. Dabei wurde darauf geachtet, dass es nicht zum unerwünschten Ausfällen der Biomoleküle untereinander kommt, wie es bei einigen Kombinationen beobachtet werden konnte, z. B. Lysozym und Lactoglobulin A + B. Und es sollte sich in diesem Stadium der Untersuchung um leicht ionisierbare Analyten handeln, um Signale hoher Intensität zu erhalten. Dies wurde mit zunehmender Molmasse der Proteine immer schwieriger wie beispielsweise bei der Carboanhydrase ($M = 29\ 000\ \text{Da}$), die ein sehr schwaches Massenspektrum lieferte und somit als ungeeignet befunden werden musste. Die geringere Intensität von Proteinen höherer Masse kann auf die sehr breite Verteilung der zur Verfügung stehenden Ladungen zurückzuführen sein. Je mehr Ladungszustände bei gleich molaren Analytlösungen möglich sind, desto geringer werden die Peakflächen der einzelnen Masse-Ladungsverhältnisse ausfallen. Weiterhin bewirkt gerade bei längeren Proteinen die Anwesenheit unaufgelöster Addukte oder die Heterogenität des Proteins eine schlechtere Auflösung des Massenspektrums [53].

Mit der optimierten Analytzusammensetzung konnten die Trennungen mit dem Wasser/Ameisensäure-Gemisch mit denen in Ammoniumformiatpuffer unter dem Einsatz unterschiedlicher Kapillaren leicht verglichen und ausgewertet werden.

4.3.4. CZE mit einem Ammoniumformiatpuffer und einem Wasser/Ameisensäure-Gemisch als Trennmedium

Ein weiterer Aspekt, den es zu klären galt, war die Konzentration des Formiatpuffers. In Untersuchungen mit der CZE wurde ja festgestellt, dass eine höhere Konzentration von 50 mM eine bessere Auftrennung der Analyten bewirkt. Der dabei resultierende hohe Strom führte jedoch bei der Kopplung immer wieder zu Überspannungen und Spektren geringer Intensität. Dieser Effekt ist auf Ladungs-Neutralisationseffekte zurückzuführen, die nach Untersuchungen von Mirza [74] von Art und Konzentration der Anionen abhängen, die am Sprayprozess beteiligt sind. Diese Anionen bilden mit den positiv geladenen basischen Aminosäuren der Proteine Ionenpaare. Bei der anschließenden Desolvatisierung und

Dissoziierung beim Sprayprozess kommt es zur Entstehung einer neutralen Säure und einem Protein mit reduzierter Ladung. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Trennungen ein 20 mM Formiatpuffer verwendet.

Einen ersten Eindruck über den Verlauf der Trennung lieferten die Elektropherogramme, die zur Überprüfung der Injektion durch ein optisches Fenster nach 22 cm Wegstrecke mittels UV-Detektion aufgenommen wurden. Diese unterschieden sich bei der Verwendung des Formiatpuffers stark von denen mit dem Wasser/Ameisensäure-Gemisch als Trennmedium (Abbildung 4-47).

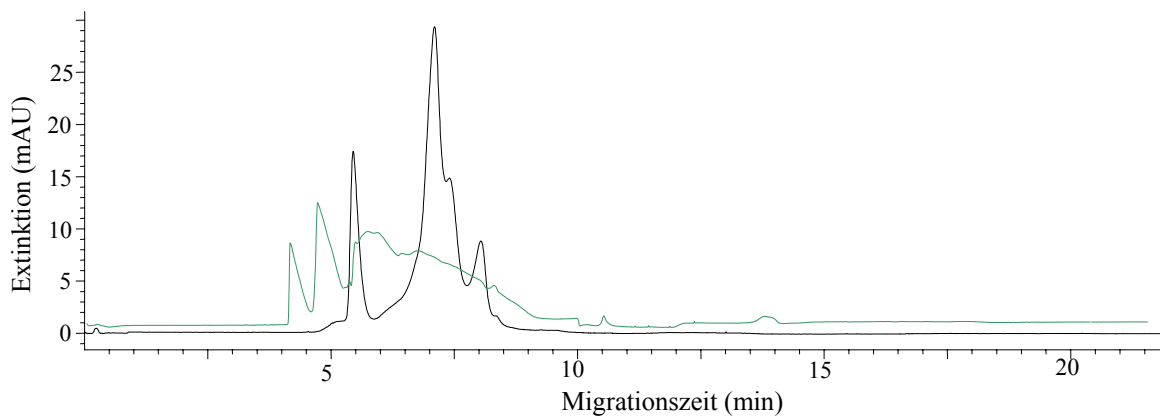


Abbildung 4-47: Vergleich der Proteintrennung nach einer Trennstrecke von 22 cm im Trennmedium 98,5/1,5 Wasser/Ameisensäure (v/v) (schwarz) und 20 mM Formiatpuffer (grün); U = 30 kV

Wie man der Abbildung 4-47 entnehmen kann, werden mit Wasser/Ameisensäure über die kurze Trennstrecke viel schmalere Peaks als mit dem Formiatpuffer erreicht. Die in beiden Fällen noch nicht vollständig getrennten Peaks werden aber in allen untersuchten Kapillaren bis zum Auslass bzw. der anschließenden Detektion fast vollständig aufgetrennt. Dabei ist die Migrationsreihenfolge der Proteine abhängig vom gewählten Trennmedium (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Migrationsreihenfolge der Proteine in Abhängigkeit vom Trennmedium

Wasser/Ameisensäure-Gemisch	20 mM Formiatpuffer pH = 3
Lysozym	Cytochrom c
Lysozym-Hydrochinonaddukt	Lysozym
Lactalbumin	Lysozym-Hydrochinonaddukt
Cytochrom c	Myoglobin
Ribonuclease	Ribonuclease
Trypsinogen	Trypsinogen
Chymotrypsinogen	Chymotrypsinogen
Myoglobin	Lactalbumin

Des weiteren verschieben sich die Ladungsverteilungen der Proteine bei Verwendung des Formiatpuffers in Richtung höherer m/z -Verhältnisse (Abbildung 4-48).

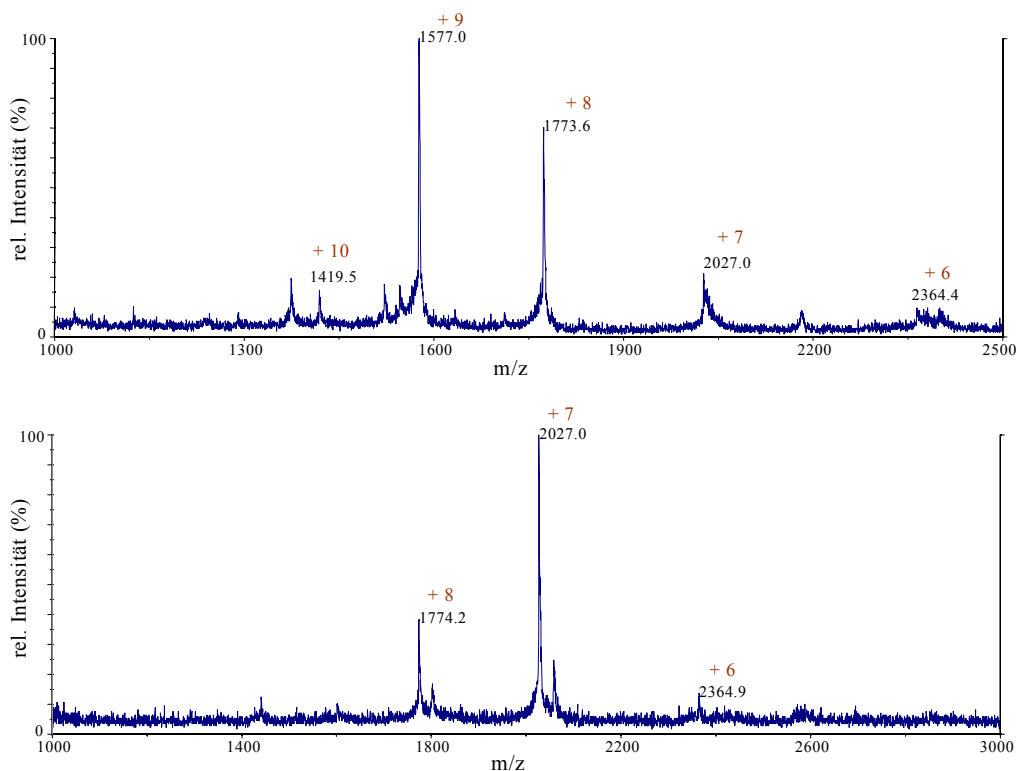


Abbildung 4-48: ESI-Massenspektren von Lactalbumin unter Verwendung unterschiedlicher Trennmedien bei der CZE; braune Zahlen = Ladungszustand
 oben: mit 98,5/1,5 Wasser/Ameisensäure (v/v)
 unten: mit 20 mM Ammoniumformiatpuffer

Hierbei spielt vor allem der geringere pH-Wert von 1,68 des Wasser/Ameisensäure-Gemisches, im Vergleich zum pH 3 des Formiatpuffers, eine Rolle. Wie schon in ausreichend Veröffentlichungen dokumentiert, ändern sich die Masse-Ladungsverteilungen von Proteinspektren mit dem pH-Wert, bei dem die Untersuchungen durchgeführt wurden [75, 76, 77]. Dabei kommt es häufig zu einer Entfaltung der Proteine mit sinkendem pH-Wert und einem damit verbundenen Anstieg zugänglicher protonierbarer Seitenketten an den Aminosäuren. Das Wasser/Ameisensäure-Gemisch führt mit seinem niedrigeren pH-Wert von 1,68 zu einer breiteren Ladungsverteilung, wobei die Intensität der Massen, die auf höheren Ladungen basieren, ansteigt.

Ein weiterer Punkt, der überlegt werden muss, sind die bereits beschriebenen Ladungs-Neutralisationseffekte. Da es sich in beiden Trennmedien um Formationen handelt, können jedoch Unterschiede aufgrund der Natur der Anionen keine Rolle spielen. Bei der Betrachtung der Formationenkonzentration in den verwendeten Trennmedien muss man beachten, dass zum Einstellen des 20 mM Puffers Ameisensäure zugegeben wurde, was ja

zwangsläufig zur Erhöhung der Formiationenkonzentration führt. Außerdem handelt es sich um eine schwache Säure, deren Protolysegrad sich bei ausreichender Verdünnung nach folgender Gleichung (4-4) [78] berechnen lässt.

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_s}{c_0}} \quad (4-4)$$

mit K_s (Ameisensäure) = $1,78 \cdot 10^{-4} \text{ mol}^2/\text{l}^2$

Nachdem man den Anteil der dissoziierten Form in den wässrigen Lösungen ermittelt hat, kann man schließlich die tatsächlich vorhandene Gesamtkonzentration an Formiationen im verwendeten Trennpuffer berechnen. In der nachfolgenden Tabelle 4-8 sind diese Ergebnisse einmal zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Berechnung der freien Formiationenkonzentration in den Trennmedien unter Beachtung der Gesamtkonzentration c und des Protolysegrades α

	98,5/1,5 (v/v) Wasser/Ameisensäure	20 mM Formiatpuffer pH 3
c in mM	395	20
c Ameisensäure zur pH Wert Einstellung in mM	0	33
Gesamtkonzentration in mM	395	53
α in %	2,12	5,79
c freier Formiationen in mM	7,9	3,1

Die fast doppelt so hohe Konzentration an freien Formiationen im Wasser/Ameisensäure-Gemisch müsste zu einer stärkeren Intensität niedriger geladener Massen führen, denn aufgrund der beschriebenen Ladungs-Neutralisationseffekte während des Spray-Prozesses sollten bei der Verwendung des Wasser/Ameisensäure-Gemisches mehr Protonen unter Bildung freier Ameisensäure von den geladenen Proteinmolekülen desorbiert werden [74]. Das kann jedoch an hand der Spektren nicht bewiesen werden, da der pH-Unterschied zwischen den verwendeten Trennmedien einen viel stärkeren Einfluss auf die Ladungsverteilung der Proteinspektren ausübt.

Die Trennergebnisse, die mit den vier beschriebenen Beschichtungsmethoden erreicht werden konnten, unterschieden sich kaum voneinander. Beim Einsatz der Kapillaren, die im wässrigen Medium polymerisiert wurden, kam es jedoch häufiger zur Ausbildung von Gasbläschen am Kapillarauslass. Diese führten zum Zusammenbruch des elektrischen Kontaktes und der Kapillarinhalt ließ sich auch mit dem zusätzlich gewählten Druck von 50 mbar nicht herauspülen. Aufgrund dieser Probleme wurden für die nachfolgenden

Untersuchungen zur kapillarisoelektrischen Fokussierung nur die Kapillaren eingesetzt, deren Polymerisation in DMF stattfand. Damit war das Risiko geringer, dass eine Trennung während oder nach erfolgter Fokussierung nicht ausgewertet werden konnte.

4.3.5. Auftrennung von Standardproteinen unter Anwendung der isoelektrischen Fokussierung und anschließender Detektion mit der ESI-MS

Wirkung der Ampholytkonzentration auf die Proteinspektren

Bei der isoelektrischen Fokussierung mit anschließender Detektion im ESI-Massenspektrum übte die Konzentration des gewählten Ampholyten einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der erhaltenen Spektren aus (Abbildung 4-49).

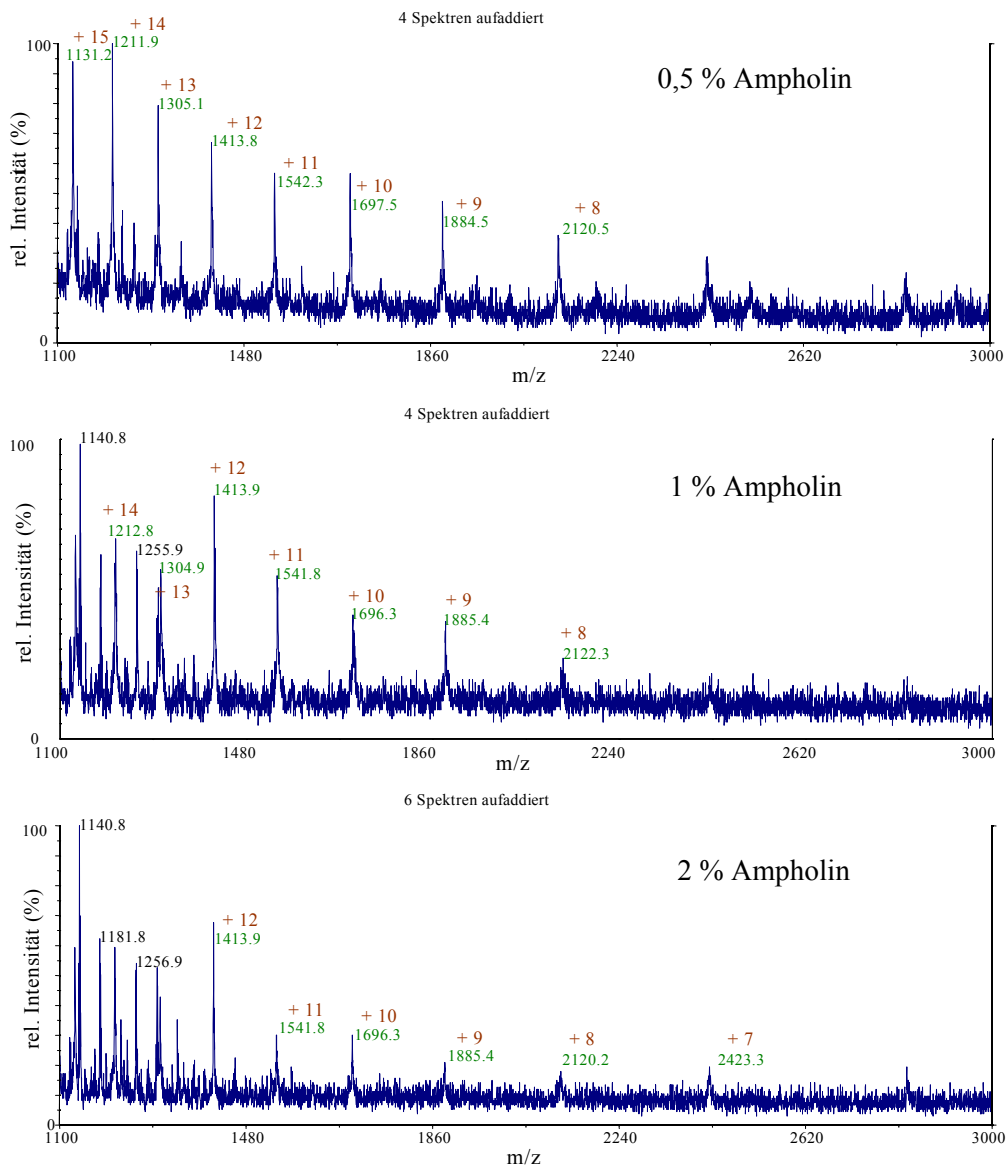


Abbildung 4-49: Resultierende Ladungsverteilungen des Myoglobins bei unterschiedlichen Ampholytkonzentrationen; Spektren addiert; braune Zahlen = Ladungszustand

Dabei können zwei Effekte beobachtet werden, erstens verlängern sich die Migrationszeiten der Analyten mit zunehmender Ampholytkonzentration und zweitens nimmt die Intensität der Proteinspektren deutlich ab. Eine Verlängerung der Migrationszeiten ist nach Untersuchungen von Tang [79] auf höhere Viskositäten der Lösung mit ansteigender Ampholytkonzentration zurückzuführen. Die in Abbildung 4-49 verdeutlichte Abnahme der Intensität der Proteinspektren und die damit einhergehende Verschiebung der Ladungsverteilung in Richtung niedrigerer Ladungen hat jedoch folgende Ursache. Die Ampholine bewirken zwar als Elektrolyte eine höhere Lösungsleitfähigkeit und tragen damit zum Ladungsüberschuss beim Sprayprozess bei. Im Gegensatz zu diesem positiven Effekt kommt es jedoch auch hier zu dem bereits beschriebenen Ladungs-Reduktionsmechanismus durch Ionenpaarbildung zwischen dem anionischen Anteil des Ampholyten und den positiv geladenen basischen Aminosäuren der Proteine [74, 80].

Auftrennung der Myoglobinisoforme durch längere Analysenzeiten

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Durchführung einer erfolgreichen CIEF ist die Zeit, die für die Fokussierung genutzt wird. Die zu Beginn sehr schnelle Wanderung der Analyten nimmt mit zunehmender Annäherung an ihren individuellen isoelektrischen Punkt deutlich ab. Optisch kann dies über den Stromverlauf während der Messung beobachtet werden. In einem Versuch mit 45 minütiger Fokussierzeit konnte deutlich gezeigt werden, dass nach 20 min der geringst mögliche Strom erreicht wurde und eine länger Analysenzeit nicht notwendig ist (Abbildung 4-50).

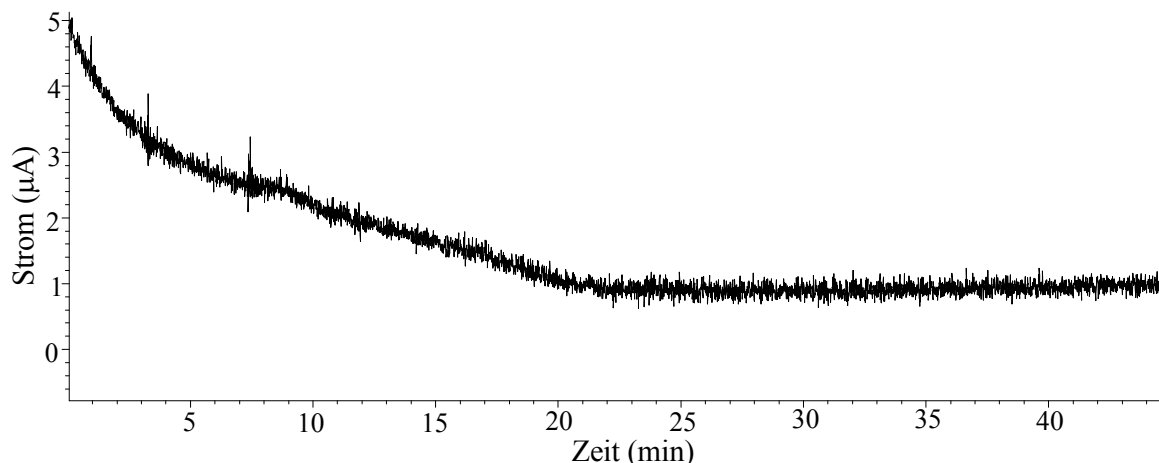


Abbildung 4-50: Stromverlauf während der isoelektrischen Fokussierung, Bedingungen: 1 % Ampholyt, Kapillare $L_{\text{tot}} = 90$ cm, $U = 30$ kV

Mit einer ausreichend langen Fokussierung war es dann auch möglich, zwei Signale bei der Untersuchung des Myoglobins zu erhalten (Abbildung 4-51). Es könnte sich dabei um Myoglobinisoforme handeln, die unterschiedliche pI-Werte aufweisen.

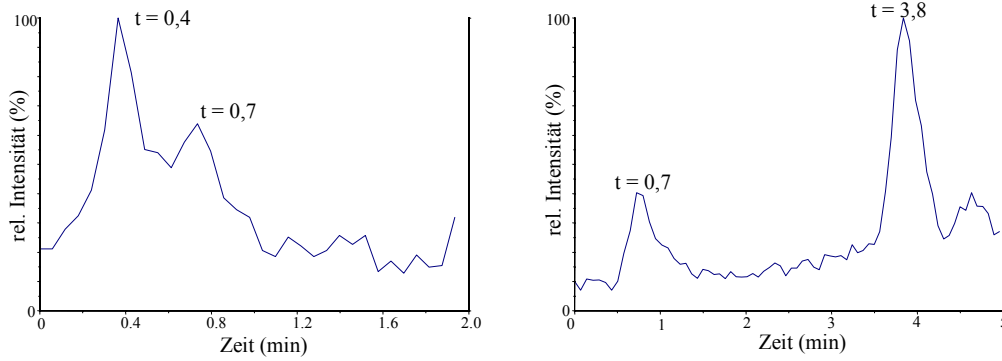


Abbildung 4-51: Extrahiertes Ionen-Elektropherogramm des Myoglobins in 0,5 % Ampholin nach einer Fokussierzeit von 10 min (links) bzw. 20 min (rechts); U = 30 kV; Kapillare $L_{\text{tot}} = 90$ cm; hydrodynamische Mobilisierung mit 50 mbar

Umwandlung des Holo- in das Apo-Myoglobin während der isoelektrischen Fokussierung

Bei diesen Untersuchungen wurde das Holo-Myoglobin aus dem Pferdemuskel eingesetzt. Obwohl dieses Protein laut Literatur im pH-Bereich von 4,5 – 8.6 [76] stabil sein soll, kommt es während der Untersuchungen zum Zerfall in das Apo-Myoglobin und die Hämgruppe mit einer molaren Masse von 615 g/mol.

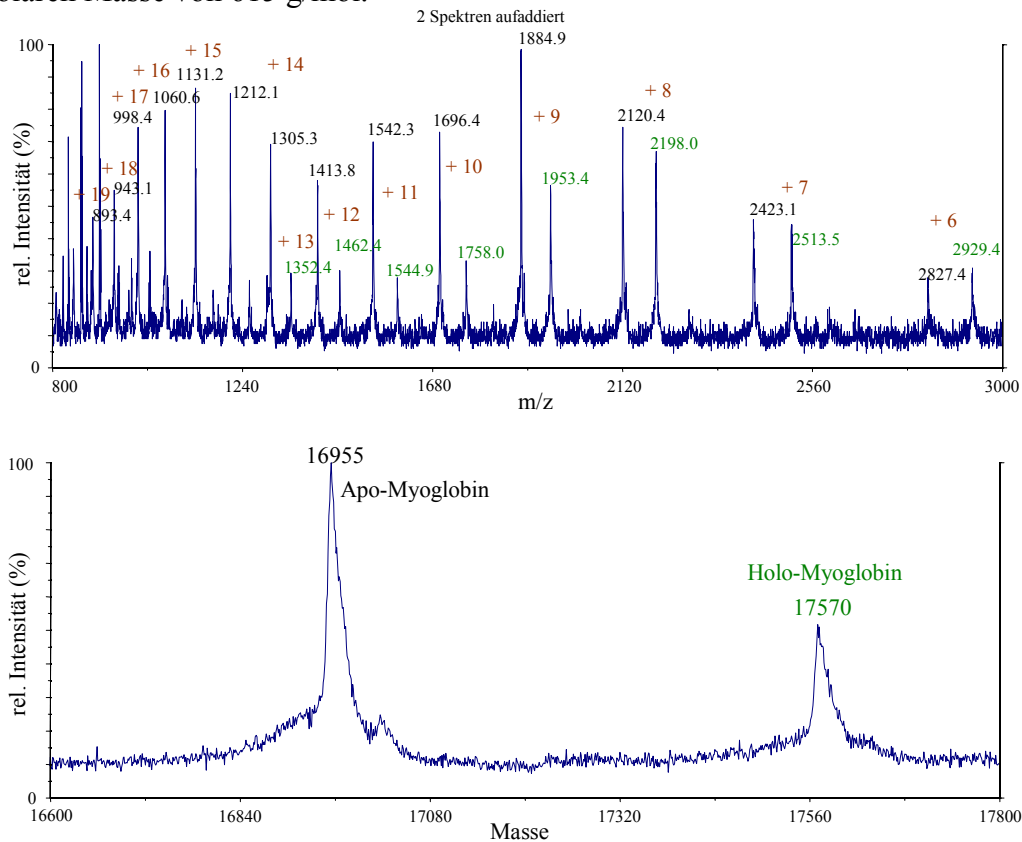


Abbildung 4-52: Oben: ESI-Massenspektrum des Apo-Myoglobins (schwarz) und Holo-Myoglobins (grün) nach 15 min Fokussierung bei 30 kV mit 1 % Ampholin 3,5 – 10; hydrodynamische Mobilisierung mit 50 mbar; braune Zahlen = Ladungszustand
unten: Deconvolution zum oberen Massenspektrum

Dies kommt durch die Vermischung des Holo-Myoglobins mit dem Ampholin zustande. Bei der Anordnung der Ampholyte während der Fokussierung durchwandert ein Teil des Proteins Bereiche mit geringeren pH-Werten, ehe es seinen isoelektrischen Punkt erreicht. In dieser Zeit kommt es teilweise zur säureinduzierten Denaturierung. Dabei entfalten sich die Helices A – F, was zur Auflösung der Häm-Tasche führt [81]. Dadurch ist es möglich, das Holo- wie auch das Apo-Myoglobin bei der Kopplung der CIEF mit dem ESI-Massenspektrometer zu detektieren (Abbildung 4-52).

Dass es sich bei dem eingesetzten Myoglobin tatsächlich um die Holo-Form handelt, konnte durch die Aufnahme eines Massenspektrums bei pH 5 gezeigt werden (Abbildung 4-53).

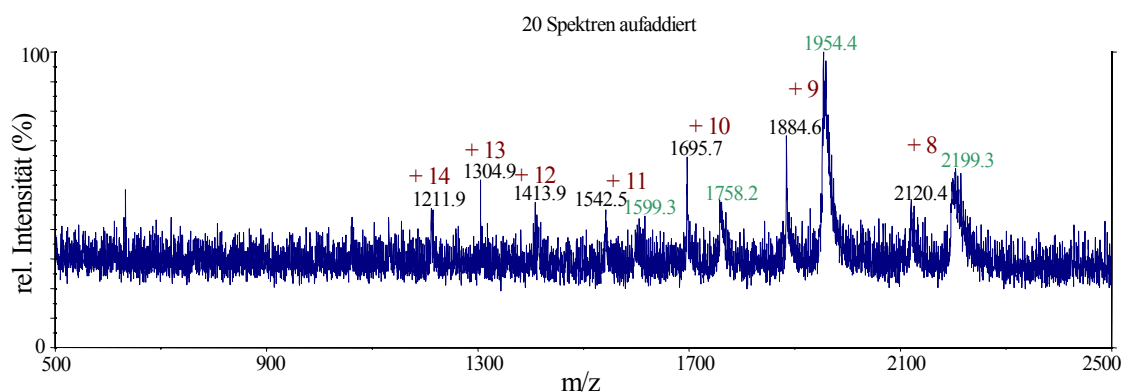


Abbildung 4-53: ESI-Massenspektrum des Myoglobins bei pH 5 (10 mM Ammoniumacetatpuffer); Massenzahlen der Holo-Form in grün und Massenzahlen der Apo-Form in schwarz; Spraytip-Potenzial 3800 V; Spektren addiert; braune Zahlen = Ladungszustand

Bei diesem pH-Wert müsste die säureinduzierte Denaturierung noch recht gering ausgeprägt sein. Die recht schlechte Intensität des Spektrums ist auf die geringere Konzentration von Protonen bei pH 5 im Vergleich zu pH 3 zurückzuführen. Trotz der geringeren Anzahl an protonierten Analyten sieht man in Abbildung 4-53 vor allem Massepeaks des Holo-Myoglobins, was ein Zeichen dafür ist, dass die Holo-Form des Myoglobins bei den Untersuchungen zum Einsatz kam.

Bei den kapillarzonenelektrophoretischen Trennungen wurden mit pH-Werten von 3 und weniger gearbeitet, und so wandelte sich das gewählte Holo-Myoglobin vollständig in die Apo-Form um und konnte so nur in dieser Form detektiert werden.

Des Weiteren konnte mit der CIEF gut gezeigt werden, dass die gewählte Mobilisierung mit einem Druck von 50 mbar nicht zu gravierenden Effizienzverlusten führt. Dazu wurden die Migrationszeiten der Proteine bzw. Peptide während der Mobilisierung in Abhängigkeit von deren isoelektrischen Punkten betrachtet. Als Vergleich wurde die Untersuchung bei 30 mbar und 50 mbar durchgeführt (Abbildung 4-55).

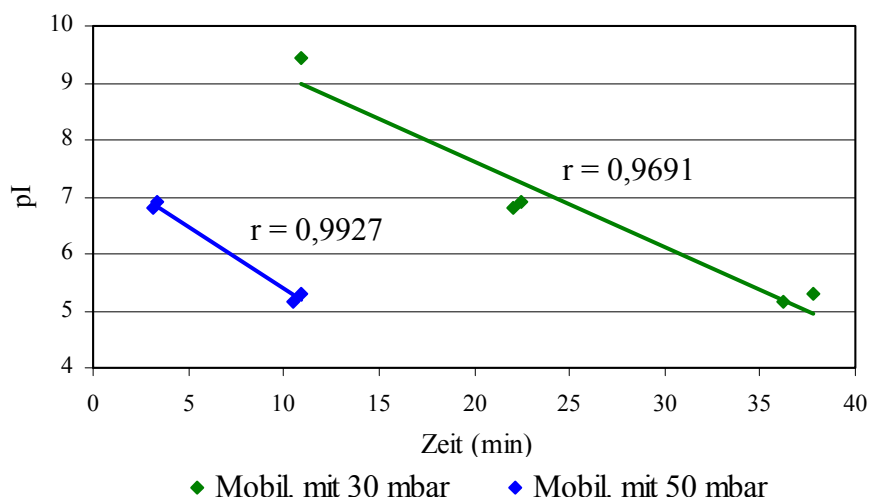


Abbildung 4-54: Kalibrationskurve der Migrationszeit gegen den pI der Analyten bei unterschiedlichem Druck, Reihenfolge der Analyten: Ribonuclease (pI = 9,45); Myoglobin (pI = 6,9); Angiotensin (pI = 6,8); Lactoglobulin A (pI = 5,15); Lactoglobulin B (pI = 5,3); r = Korrelationskoeffizient

Eine ähnliche Untersuchung mit Pharmalyt 5 – 10 führte Tao [66] unter Wirkung der Gravitationsmobilisierung durch. Dabei betrug der Korrelationskoeffizient r von der Gerade 0,9610 und bis zur Detektion von Lactoglobulin A vergingen 65 min. Dies zeigt, dass mit der von uns gewählten Methode von meist 50 mbar eine Geradengleichung mit besserer linearer Korrelation erzielt werden kann und die Analysenzeit wesentlich schneller verläuft. Dieser Zeitgewinn ist natürlich auch mit Nachteilen verbunden und so konnte die Ribonuclease nicht detektiert werden. Dies liegt daran, dass das Protein mit seinem pI von 9,45 sehr nahe am Kapillarauslass fokussiert wird. Durch den Wechsel zwischen Katholyt und Sheath-flow an der Spraynadel dauert es ein wenig bis sich das Spray stabilisiert hat. In dieser Zeit ist die Ribonuclease jedoch bereits aus der Kapillare herausgewandert. Bei den Versuchen wurde zwischen Fokussierung und Mobilisierung eine Zeit von ca. 2 - 3 min gewählt, um die Spraynadel vom Katholyt frei zu spülen. Bei diesem Vorgang kann es jedoch zum Auseinanderlaufen der fokussierten Zonen kommen, da der pH-Gradient in dieser Zeit nicht aufrecht erhalten wird. Durch die Wahl eines geringeren hydrodynamischen Flusses von 30 mbar wird die Stabilisierung des Sprays bis zur Detektion der Ribonuclease gewährleistet. Als Nachteilig könnte man die damit verbundenen längeren Analysezeiten empfinden. Ein Kompromiss wäre der Einsatz eines Druckgradienten während der Mobilisierung. Diese Technik wurde jedoch im Rahmen dieser Kopplungsversuche nicht weiter untersucht.

Elektrokinetische Injektion in der CIEF

Bei der bisher durchgeführten CIEF wurde immer ein Gemisch von Ampholyten und Analyten in die Kapillare gefüllt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, in die mit Ampholyt

gefüllte Kapillare die Analyten elektrokinetisch zu injizieren. Vorteil dabei ist, dass über die gewählte Spannung und Injektionszeit der molare Anteil des aufzutrennenden Analyten variiert werden kann. Dies ist besonders günstig bei sehr verdünnten Proben, aus denen dann mit entsprechend langen Injektionszeiten eine ausreichende Menge in die Kapillare migrieren kann. Nachteil dieser Methode ist, dass die Technik auf den Mobilitäten der Proteine basiert, das heißt aus einem Gemisch wandern unterschiedliche Mengen an Analyten in die Kapillare und führen so zur Diskriminierung. Anlehnend an einen Artikel von Chen [82], der die elektrokinetische Injektion zur Steigerung der Probenmenge in der CIEF nutzte, wurde diese Methode ebenfalls getestet. Als Analyten dienten Myoglobin und Lactoglobulin A + B in Form einer 25 μM Lösung, die mit 1 % Essigsäure angesäuert war.

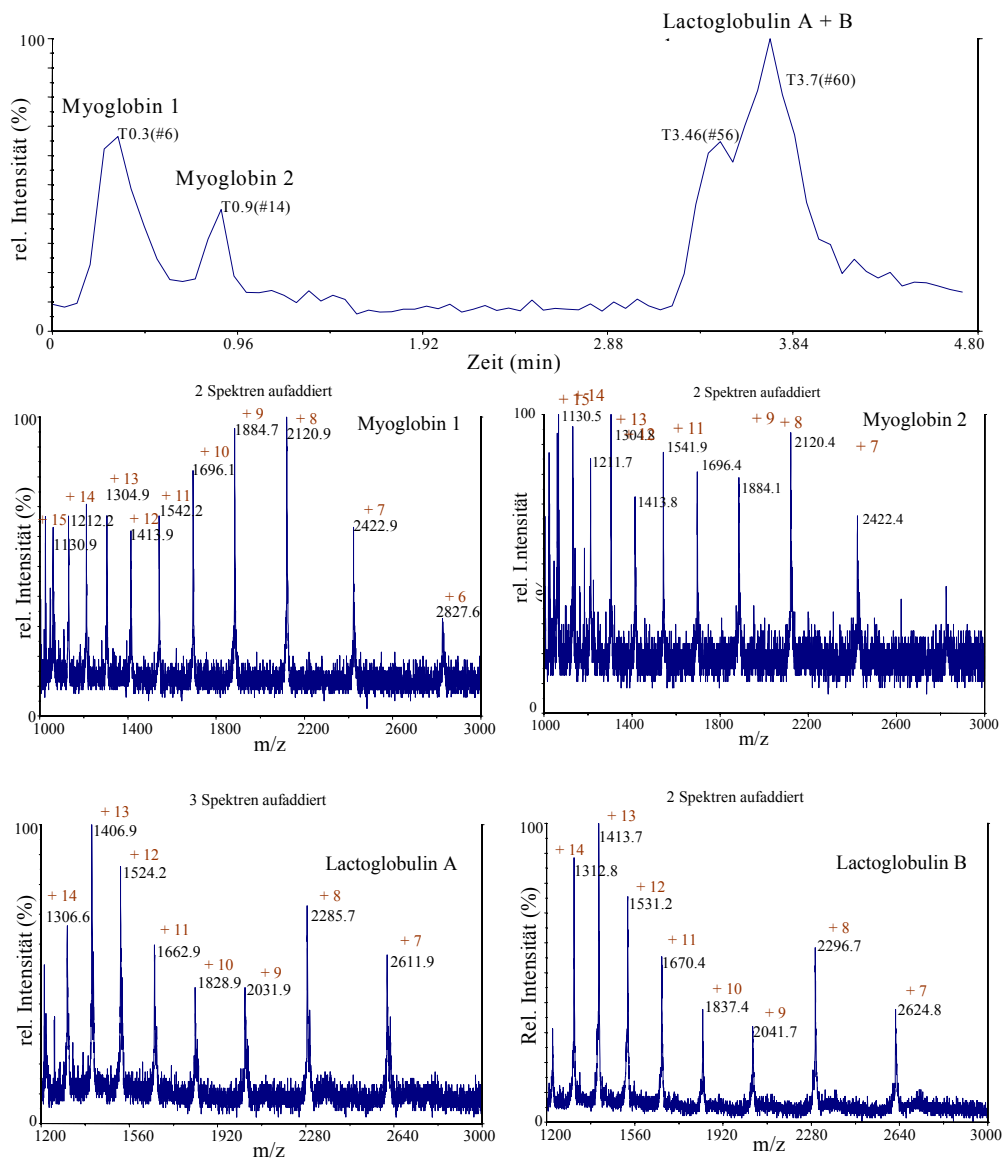


Abbildung 4-55: Oben: extrahiertes Ionen-Elektropherogramm der Proteine nach erfolgter elektrokinetischer Injektion und Fokussierung in einem 0,5 %igen Ampholyt; mitte und unten: dazugehörige ESI-Massenspektren der aufgetrennten Proteine; braune Zahlen = Ladungszustand

In diesem Fall konnte eine gute Trennung der zwei Myoglobinoisoforme erreicht werden. Die Lactoglobuline konnten nicht vollständig voneinander getrennt werden (siehe Abbildung 4-55). An hand der Massenspektren können alle Proteine eindeutig identifiziert werden und die erhalten Migrationszeiten ergeben in Abhängigkeit von den pI-Werten wieder eine sehr guten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9889$. Um die Lactoglobuline mit ihren nahe beieinander liegenden isoelektrischen Punkten (pI 5,3 und 5,15) besser zu trennen, müsste ein Ampholyt mit engerem Fokussierungsbereich z. B. 4 - 6 eingesetzt werden. Auch die Wahl einer langsameren Mobilisierung könnte ein Vermischen der nahe beieinanderliegenden Zonen verhindern. Durch den Einsatz von Schwerkraft konnte Tao [66] zwei Isoforme des Cytochrom c mit einer pI-Wert-Differenz von 0,05 fast vollständig voneinander trennen. Nachdem die ersten Versuche zu dieser Technik recht problemlos verliefen, sollten nun weitere Proteine der Analysenlösung zugemischt werden. Doch schon die Zugabe des Lactalbumins führte dazu, dass sich der Kapillarinhalt bei der Mobilisierung nicht herauspülen ließ. Mikroskopische Betrachtungen der Kapillare zeigten, dass diese an der Stelle, an der sich ungefähr der pI Wert des Lactalbumins befindet, verstopft war (Abbildung 4-56).

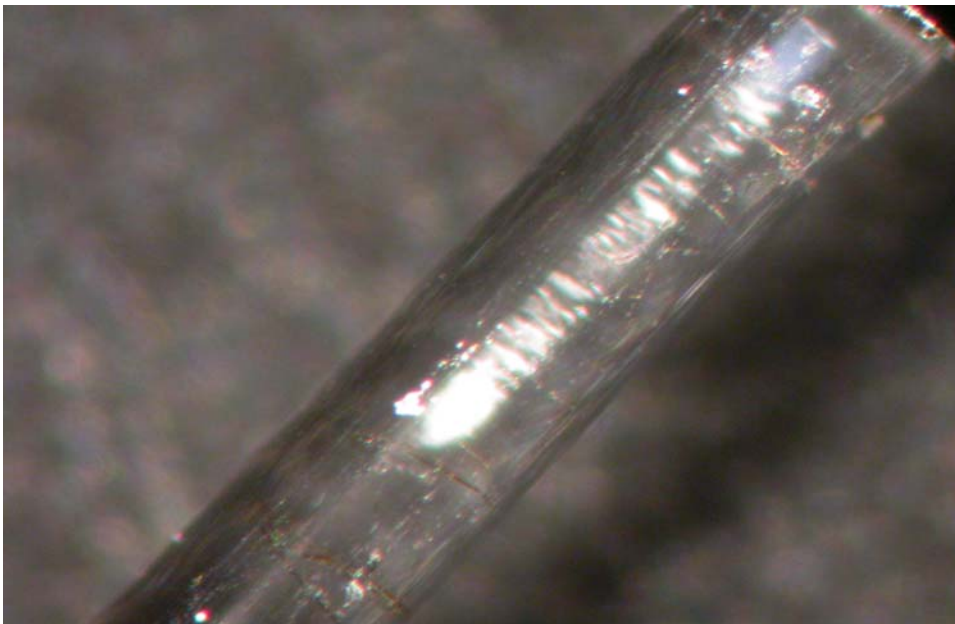


Abbildung 4-56: Mikroskopische Aufnahme des Kapillarfensters nach Fokussierung, im Innenkanal ist weiß die Proteinfällung zu sehen

Daraus wurde geschlossen, dass es zur Ausfällung dieses Proteins gekommen war. Dies lässt sich damit erklären, dass Proteine sich beiderseits vom pI aufgrund ihrer gleichsinnigen Ladung abstoßen. Am pI fallen diese Abstoßungen weg und die Moleküle können durch intermolekulare Wechselwirkungen aggregieren und flocken aus [83]. Da dieser Effekt stark

von der Konzentration des Proteins abhängig ist, die bei einer elektrokinetischen Injektion durch die elektrophoretische Mobilität des Analyten bestimmt wird, ist die Wahl geeigneter Injektionsparameter bei der Untersuchung eines unbekanntes Gemisches schwierig. Bei diesen durchgeführten Kopplungsversuchen zeigte sich auch, dass die Flächen der erhaltenen Peaks stark von der Stabilität des Elektrosprays abhängen. Da dieses jedoch recht empfindlich reagiert, lässt sich die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse schwierig verfolgen. So schwankten die gemessenen Flächen der Lactoglobuline A + B bei vier Messungen unter gleichen Bedingungen zwischen 24 935 und 6037. Damit ist es also nicht möglich, genaue Informationen über den Massegehalt des Analyten in der Lösungen zu machen.

4.3.6. Identifizierung von Proteinen mittels Trypsinverdau

Neben der Auftrennung und Identifizierung von Proteinen über die Migrationszeiten und die isoelektrischen Punkte kann man auch die Abfolge der Aminosäuresequenz zur Charakterisierung bekannter wie auch unbekannter Analyten nutzen. Zu diesem Zweck dienen proteolytisch wirksame Enzyme, welche die Proteine hydrolytisch spalten.

Mit der Durchführung eines Trypsinverdaus von Cytochrom c sollte einmal überprüft werden, in wie weit die zur Verfügung stehenden Mittel zur Identifizierung von Proteinen genutzt werden können. Außerdem stand auf diese Weise eine hohe Anzahl an Analyten für die Trennung zur Verfügung. Da Trypsin hinter einem Arginin- bzw. Lysin-Rest schneidet, wurden bei der vorliegenden Aminosäuresequenz 16 mögliche Fragmente erwartet (Abbildung 4-57).

T1	T2		T3	T4	T5	T6
GDVEK	GK	K	IFVQK	CAQCHTVEK	G GK	HK
	T7		T8	T9	T10	
	GPNLHGLFGR	K	TGQAPGFTYTDANK	NK	GITWK	
	T11		T12	T13		T14
	EETLMEYLENPK	K	YIPGTK	MIFAGIK	K	K
	T15		T16			
	EDLIAYLK	K	ATNE			

Abbildung 4-57: Erwartete Peptide durch den tryptischen Verdau der Aminosäuresequenz des Cytochrom c [84]

Das Trypsin/Cytochrom c-Gemisch wurde mit dem gekoppelten CE/ESI-MS System zunächst getrennt und anschließend die erhaltenen Peptide detektiert. Nach 4 Stunden Reaktionszeit war die Spaltung des Cytochrom c noch nicht vollständig, ein Großteil der noch fehlenden

Fragmente konnte jedoch nach einer 24 stündigen Inkubationszeit nachgewiesen werden. Insgesamt wurden bis auf die Bruchstücke T 4 und T 7 alle übrigen Peptide mittels ESI-MS identifiziert (Tabelle 4-9). Zusätzlich entstanden K-T3, T13-K, K-T16, T10-T11 und Peptide vom Trypsin selbst, so dass insgesamt 36 Fragmente analysiert werden konnten.

Tabelle 4-9: Gefundene Fragmente des Cytochrom c nach tryptischem Verdau

Fragment	Masse (gemessen)	Ladung	Masse Fragment (gemessen)	Masse Fragment (theoretisch)
T 1	547,4888	+1	547,4888	547,2728
T 2	204,1314	+1	204,1314	204,1348
T 3	634,3854	+1	634,3854	634,3928
T 5	261,1490	+1	261,1490	261,1563
T 6	284,1669	+1	284,1669	284,1723
T 8	735,8418	+2	1470,6836	1470,6865
T 9	261,1490	+1	261,1149	261,1563
T 10	604,3350	+1	604,3335	604,3459
T 11	748,3426	+2	1495,6852	1495,6990
T 12	678,3635	+1	678,3635	678,3827
T 13	779,4380	+1	779,4380	779,4490
T14	405,2201	+1	405,2201	405,2098
T 15	964,5400	+1	964,5400	964,5355
T 16	434,1878	+1	434,1878	434,1887
K-T 3	381,7442	+2	762,4884	762,4878
K-T 12	403,7380	+2	806,4760	806,4776
T13-K	303,1817	+3	907,5451	907,5439
T13-K	454,2730	+2	907,5460	907,5439
K-T 8-T 9	614,3146	+3	1840,9438	1840,9194
K-T 16	562,2750	+1	562,2750	562,2837
T 10- T 11	694,3451	+3	2081,0353	2081,0265

Die gefundenen Fragmentmassen wurden dann einer Datenbanksuche [85] unterzogen. Bei der Beachtung einer Massentoleranz von 30 ppm und der Information, dass zwei Spaltungen fehlen, konnten 100 % der Massen zugeordnet werden, wobei die vorliegenden Peptide 78% der Aminosäuresequenz des verwendeten Cytochrom c abdeckten. Dass die Umsetzung der Proteine in Peptide mittels Trypsin nicht immer so einfach ist, zeigten Untersuchungen am Lysozym und Myoglobin. In beiden Fällen wurde trotz der vierstündigen Umsetzung mit dem Enzym noch ein deutlicher Proteinpeak detektiert. Neben diesem konnten nur einzelne größere Fragmente des betreffenden Analyten gefunden werden. Messungen ein bis zwei Tage später führten zu einer größeren Anzahl an Fragmenten. Beim Myoglobin konnten von 18 theoretisch erwarteten Fragmenten nur 7 eindeutig nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden 3 Peptide gefunden, bei denen noch eine spezifische Trypsinspaltung möglich gewesen wäre. Noch unbefriedigender fiel das Ergebnis beim Lysozym aus. Hier hätte eine

vollständige Hydrolyse zu 14 Peptiden geführt, von denen jedoch nur 4 detektiert wurden. Zu 4 weiteren gemessenen Massen passten längere Peptidketten, in denen sich jedoch noch ein bis drei spaltfähige Gruppen befanden. Mit diesen Ergebnissen war es natürlich nicht möglich, die Proteine mittels Datenbank nachzuweisen. Die Ursache für die schlechte Spaltfähigkeit der benannten Proteine lag am Vorhandensein von Disulfidbrücken. Diese entstehen durch die Oxidation von Cysteinresten. Lysozym besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, die durch vier Disulfidbrücken quervernetzt ist. Das dadurch in nativer (gefalteter) Form vorliegende Protein ist stark resistent gegen die Trypsin-Aktivität. Durch den Zusatz von Denaturierungsmitteln (z. B. Dithiothreitol, n-Octyl-Pyranoglucoosid) können die Disulfidbrücken reduziert werden und es kommt zu einer Entfaltung der Molekülstruktur. Nach diesem Schritt sollte der Verdau eine ausgeprägte Proteinspaltung liefern [83]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde diese Möglichkeit jedoch nicht weiter verfolgt, denn mit dem Cytochrom c konnten nach der Spaltung eine große Anzahl an Peptiden erreicht werden. Das hauptsächliche Anliegen dieser Untersuchung lag in der Auftrennung dieser zahlreichen Fragmente mittels CE und der anschließenden Detektion durch die ESI-MS. Dies war mit der vorliegenden Kopplung möglich. Durch die beschriebene Datenbanksuche kann man bei bekannter Aminosäuresequenz mit der ESI-MS zu mindest die Identität eines Analyten bestätigen. Bei unbekanntem Proben wäre als Detektor ein Tandem-Massenspektrometer (MS-MS) günstiger. Dabei erfolgt als erstes die Detektion der einzelnen Peptidmassen. Anschließend werden einige Massen fragmentiert. Die Differenz zwischen einigen Fragmentmassen entspricht der Masse bestimmter Aminosäuren, wodurch man einen Teil der Peptidsequenz ablesen kann. Mit dieser speziellen Zusatzinformation lässt sich die Aminosäuresequenz und damit das Protein mit Hilfe der Datenbank weitaus genauer bestimmen [86]. Außerdem ist auch eine de-novo Sequenzierung möglich mit dem Ziel, gänzlich unbekannte Proteine/Peptide aufzuklären, um sie anschließend in eine Datenbank aufnehmen zu können.

4.4. Trennung von Analyten in realen Proben

Nachdem die bisher vorgestellten Methoden nur mit Standardproteinen durchgeführt wurden, sollte die Anwendbarkeit auf reale Proben untersucht werden. Da sich matrixbelastete Proben in vielen Fällen durch unkontrollierte biologische Prozesse anders verhalten als das reine Protein, sind vor der eigentlichen Analyse oft Reinigungsschritte nötig. Dazu werden meist chromatographische Trennmethode genutzt. In wie weit alternativ dazu die

Kapillarelektrophorese mit HEMA-beschichteten Kapillaren die Bestandteile eines realen Gemisches trennt, soll in den nachfolgenden Abschnitten einmal erläutert werden.

4.4.1. CZE und CIEF von Hühnereiweiß

Eine einfach zugängliche und recht proteinreiche natürliche Quelle ist das Hühnereiweiß. In diesem Teil des Ei's sind mehrere Proteine in unterschiedlichster Konzentration zu finden .

Tabelle 4-10: Gehalt der Proteine im Hühnereiweiß [87]

Menge in %	Protein	M in Da	pI	Menge in %	Protein	M in Da	pI
54	Ovalbumin	45 000	4,5	0,8	Ovoflavoprotein	32 000	4,0
12	Ovotransferrin	77 700	6,0	0,5	Ovomacroglobulin	900 000	4,5
11	Ovomucoid	28 000	4,1	0,05	Avidin	68 300	10,0
3,4	Lysozym	14 300	10,7	0,05	Cystatin	12 700	5,1
3,0	Ovomucin	222 000	4,7	n. b.	Thiamin-binding-protein	38 000	n. b.
1,0	G3 Ovoglobulin	50 000	4,8	n. b.	Glutamyl aminopeptidase	320 000	4,2
1,0	G2 Ovoglobulin	47 000	5,0	n. b.	Minor glycoprotein 1	52 000	5,7
1,0	Ovoglobulin	24 400	3,9	n. b.	Minor glycoprotein 2	52 000	5,7

Das Eiweiß wurde mit der 20 – 100fachen Menge Wasser verdünnt, gerührt, filtriert und anschließend in die Kapillare injiziert [88]. Wie das nachfolgende Elektropherogramm (Abbildung 4-58) zeigt, konnten bei der Anwendung der Kapillarzonenelektrophorese 4 Peaks deutlich detektiert werden.

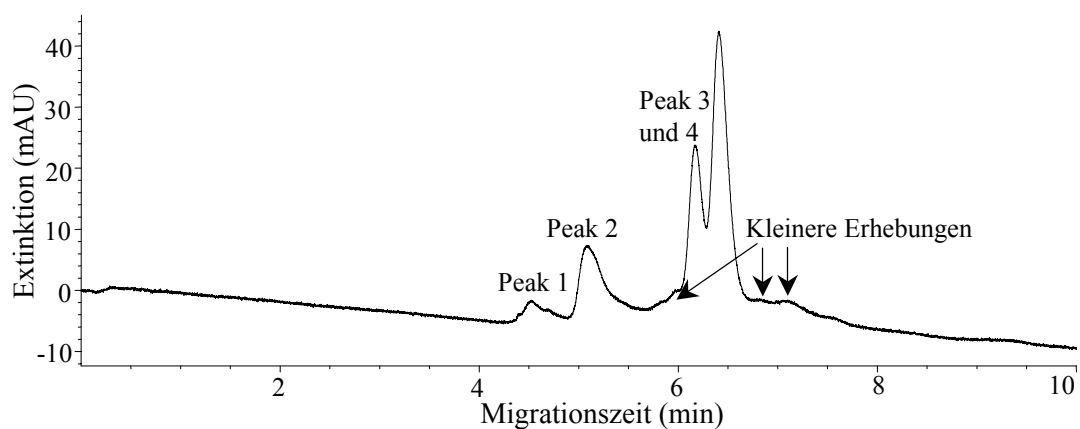


Abbildung 4-58: CZE von Hühnereiweiß/Wasser-Gemisch (1/20, v/v); chloralkylsilanisierter Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF; $L_{\text{tot}} = 44 \text{ cm}$; 20 mM Phosphatpuffer pH 3; $U = 30 \text{ kV}$; Injektion $40 \text{ mbar} \cdot 3 \text{ s}$

Mehrere kleinere Erhebungen in der Grundlinie könnten auf Signale weiterer Analyten hindeuten. Die Identifikation der Peaks an Hand dieses Ergebnisses ist schwierig. Mit den prozentuellen Mengenangaben in Tabelle 4-10 und den erhaltenen Signalfächern ist nur eine vorsichtige Abschätzung möglich.

Mehr Informationen wurden von der isoelektrischen Fokussierung erhofft, bei der man Aufschlüsse über den isoelektrischen Punkt der Analyten erhält und damit die Zahl der in Frage kommenden Proteine eingrenzen kann.

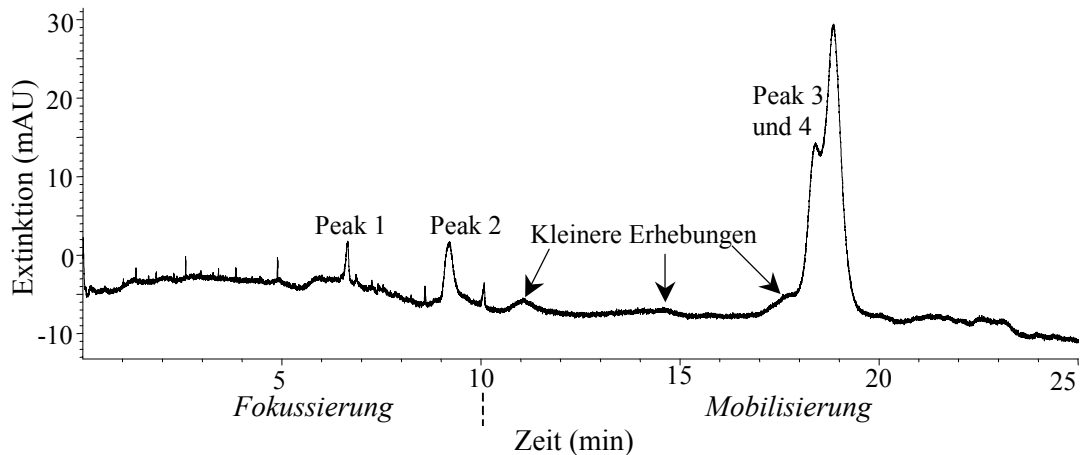


Abbildung 4-59: CIEF des Hühnereiweiß/Wasser-Gemisches (1:100, v/v) + 1,5 % Ampholin 3,5 – 10; chloralkylsilanisiertere Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF; $L_{\text{tot}} = 44$ cm; $U = 30$ kV und nach 10 min chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer

Das Elektropherogramm (Abbildung 4-59) der isoelektrischen Fokussierung dieses Eiweiß-Wasser-Gemisches zeigte deutlich Peaks von vier Komponenten, wobei zwei nur unzureichend voneinander getrennt waren. Auch hier deuteten kleinere Erhebungen auf Signale weiterer Probenbestandteile hin. Die isoelektrischen Punkte der Peaks 1 und 2 müssen über pH 9 liegen, denn bei einer gleichmäßigen Verteilung des pH-Gradienten über die 44 cm lange Kapillare würde sich vom Einlass bis zum optischen Fenster ein pH-Gradient von 3 bis 8,8 einstellen (Abbildung 4-60). Signale, die während der Fokussierung am Fenster vorbei wandern zeigen an, dass ihr pI-Wert über diesem liegt. Aufbauend auf dieser Überlegung kämen für die Peaks 1 und 2, in Abbildung 4-59 laut Tabelle 4-9, die Proteine Lysozym (pI = 10,7) und Avidin mit (pI = 10,0) in Frage.

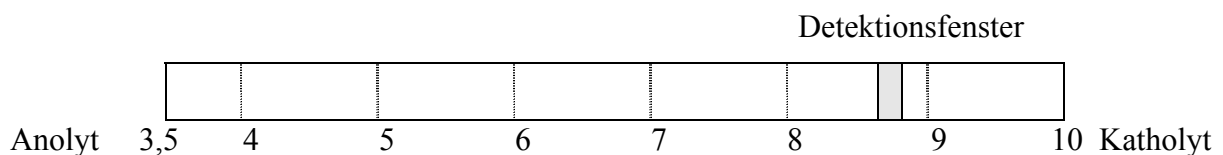


Abbildung 4-60: Schematische Verteilung des pH-Gradienten über die 44 cm lange Kapillare während der Fokussierung

Für die genaue Bestimmung der pI-Werte müssen dem Gemisch Standardproteine zugesetzt werden. In jedem Fall ist jedoch die anschließende Detektion mit einem Massenspektrometer unumgänglich, denn die Ausbildung der typischen Proteinspektren macht die Zuordnung zu den erwarteten Analyten bedeutend leichter. Mit der eingesetzten belegten Kapillare war zum Teil eine Trennung der Eiweißproteine möglich. Die erhaltenen Peaks wiesen eine gute Symmetrie auf und zeigten somit keine Anzeichen von Wechselwirkungen mit der Kapillarwand oder anderen Komponenten. Die unzureichende Trennung einiger Signale kann auf die zu hohe Konzentration der betreffenden Analyten zurückzuführen sein. Durch die recht unterschiedlichen Proteingehalte in realen Proben ist es schwierig, die optimale Verdünnung bzw. Injektionsmenge zu finden, bei der alle Komponenten akzeptable Signale liefern.

4.4.2. Auftrennung einer verunreinigten Staphylococcus Nucleaseprobe mittels CZE und anschließende Identifizierung mit ESI-MS

Im Zusammenhang mit der Aufklärung der Faltungsstruktur von Staphylococcus Nuclease (SNase) [89] war die Abtrennung des Analyten von weiteren in der Probe befindlichen Komponenten notwendig.

Mit Hilfe der entwickelten Kapillaren war es möglich, die SNase von drei weiteren Proteinen und 17 Peptiden abzutrennen, um so ein sauberes Proteinspektrum mit der ESI-MS zu erhalten (Abbildung 4-61).

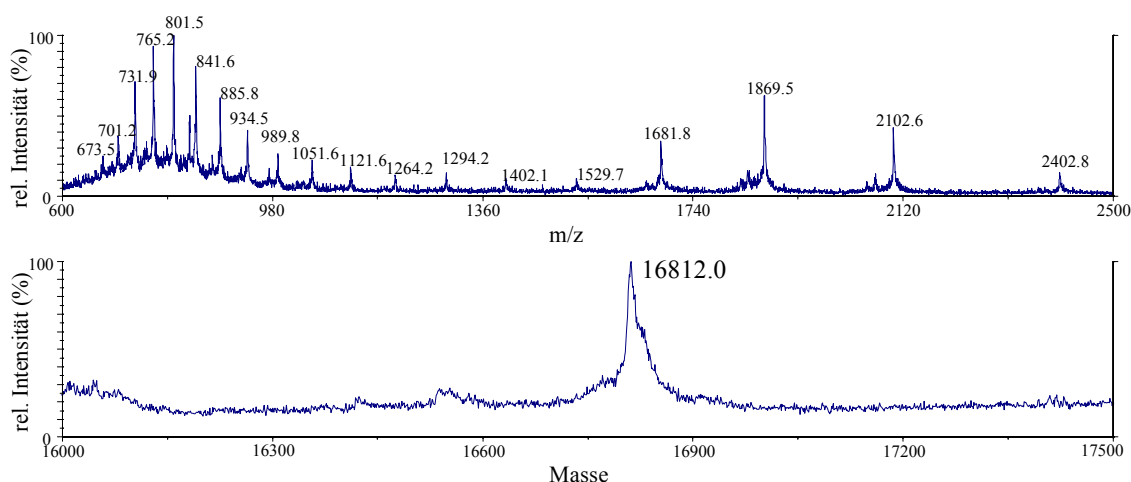


Abbildung 4-61: Oben: ESI-Massenspektrum der SNase;
unten: dazugehörige Deconvolution; M = 16 812 Da

Ein weiteres Protein lieferte ein Massenspektrum, das unter Durchführung einer Deconvolution (siehe Gleichung 2-10) eine Masse von 10 050 bzw. 10 159 ergab (Abbildung 4-62).

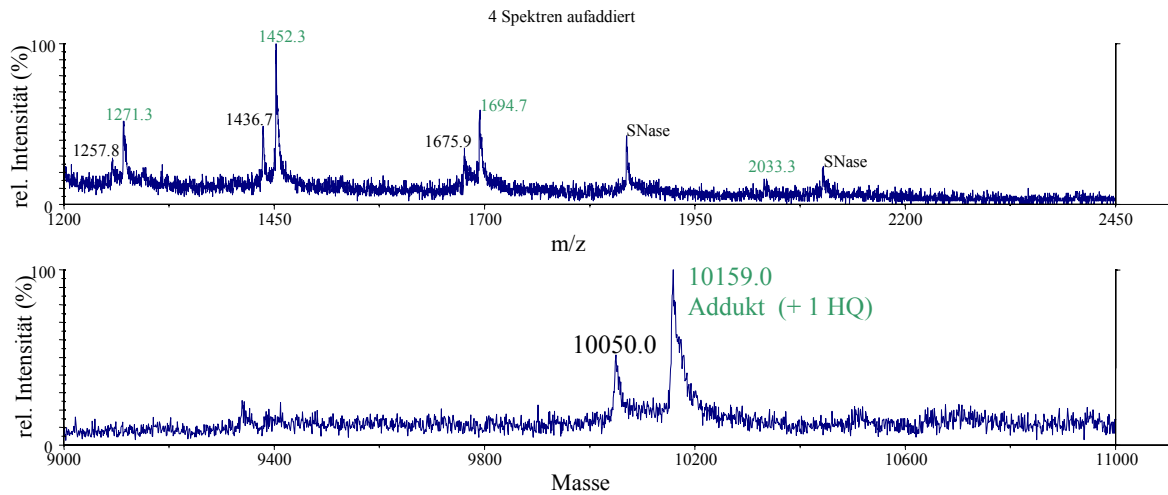


Abbildung 4-62: Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; $M = 10\ 050$ Da

Da der Massenunterschied ca. 110 g/mol betrug, wurde auch hier eine Adduktbildung zwischen dem Protein und einem Hydrochinon vermutet. Diese Reaktion wurde ja bereits hinreichend in Abschnitt 4.3.2. am Beispiel des Lysozyms und Lactalbumins beschrieben. Die Bildung dieser Addukte setzt voraus, dass sich im Protein Cysteinreste bzw. Sulfidbrücken befinden und erhöht so den Informationsgehalt des Spektres.

Weiterhin wurde ein Protein mit einer Masse von ca. 13 000 Da (Abbildung 4-63) und eins mit ca. 32 000 Da (Abbildung 4-64) nachgewiesen.

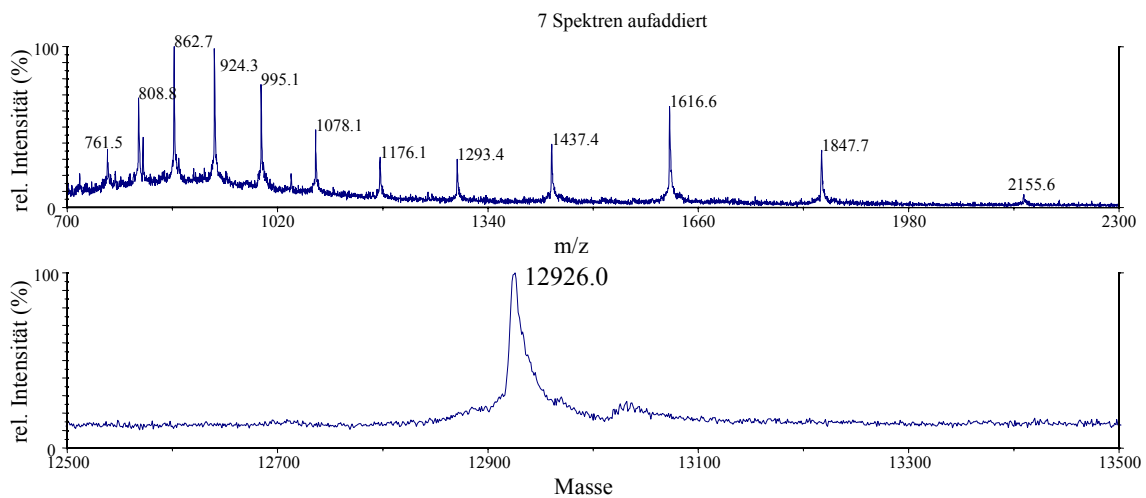


Abbildung 4-63: Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; $M = 12\ 926$ Da

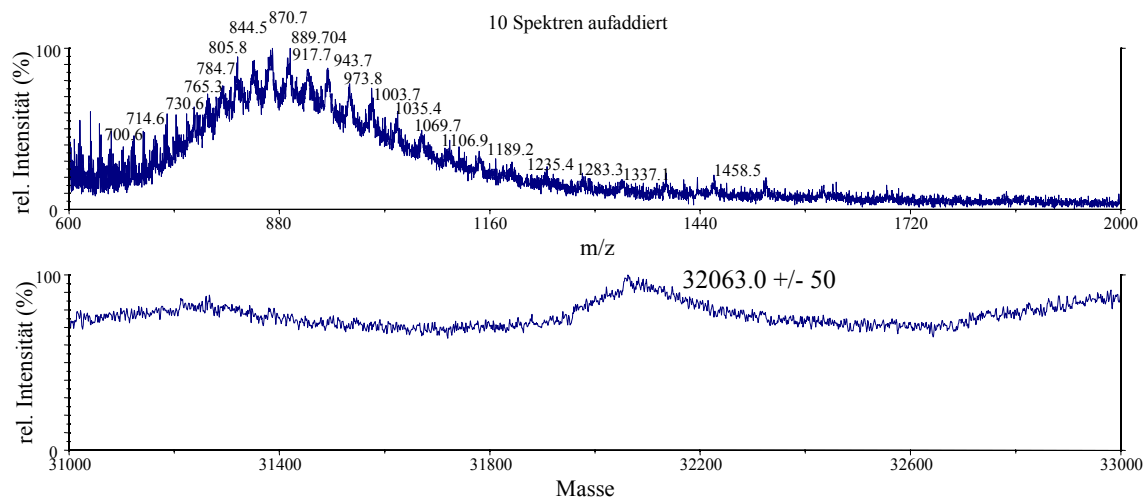


Abbildung 4-64: Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; $M = 32\,063\text{ Da}$

Das letzte Massenspektrum zeigt deutlich, wie schwierig sich Proteine höherer Molmassen detektieren lassen. Man erhält eine sehr breite Ladungsverteilung (in diesem Beispiel von + 20 bis + 46), aber insgesamt eine recht schwache Intensität.

Durch die Auftrennung der Nucleaseprobe war es nicht nur möglich, die Proteine voneinander zu trennen, sondern auch eine Vielzahl von Peptiden. Dabei konnte jedes einzelne oft in zwei Ladungszuständen detektiert werden, siehe Tabelle 4-11.

Tabelle 4-11: Gefundene Peptide bei der Auftrennung der SNase-Probe

Gefundene Masse	Ladungszustand	Masse Peptid	Lfd. Nummer
830,0	+2	1658,0	1
553,9	+3	1658,7	
415,8	+4	1659,0	
834,5	+2	1667,0	2
556,6	+3	1666,8	
417,5	+4	1667,0	
589,7	+3	1766,1	3
442,5	+4	1766,0	
782,4	+3	2344,2	4
587,1	+4	2344,2	
654,4	+3	1960,1	5
491,0	+4	1960,0	
937,9	+3	2810,7	6
703,4	+4	2809,6	
782,1	+4	3124,6	7
688,4	+2	1374,8	8
459,3	+3	1374,8	
344,7	+4	1374,9	
815,4	+3	2443,3	9
611,8	+4	2443,4	

Gefundene Masse	Ladungszustand	Masse Peptid	Lfd. Nummer
478,7	+2	955,5	10
319,5	+3	955,5	
652,6	+4	2606,5	11
535,3	+2	1068,6	12
357,2	+3	1068,6	
578,8	+2	1155,6	13
386,2	+3	1155,6	
355,2	+3	1062,6	14
532,3	+2	1062,5	
623,3	+2	1244,7	15
415,9	+3	1244,7	
690,7	+3	2069,1	16
518,3	+4	2069,1	
717,4	+2	1432,7	17
478,6	+3	1432,7	

Dieses Beispiel zeigt, dass mit den entwickelten Kapillaren in der Kapillarelektrophorese eine große Anzahl an Analyten aufgetrennt werden kann. Durch die anschließende Detektion mit der ESI-MS erhält man Aussagen über Ladungszustände und Molmassen der Verbindungen.

An hand dieser sehr komplexen Probe sollte nun auch die Identifizierung unter zu Hilfenahme eines Trypsinverdaus getestet werden. Nach entsprechender Inkubationszeit konnten nach der Auftrennung durch die CE insgesamt 163 Peptidfragmente (Anhang Tabelle II) erhalten werden, wovon 52 zur SNase gehörten (Anhang Tabelle III). Die Datenbanksuche [84] mit den zugeordneten Fragmenten ergab eine 55%ige Abdeckung mit der Aminosäuresequenz der eingesetzten Nuclease. Die Zuordnung der übrigen Peptide zu den entsprechenden Massen erwies sich als äußerst schwierig, da keine Aminosäuresequenzen vorlagen. Die Suche mit allen übrigen Fragmenten nach Proteinen entsprechender Massen war nie eindeutig genug, um sich auf ein bestimmtes Biomolekül festlegen zu können. Für eine genauere Identifizierung müssten weitere Methoden angewendet werden, wie Verdaue mit anderen Enzymen, die zu Überlappungen einzelner Fragmente führen und so mehr Informationen bezüglich der Aminosäuresequenz liefern. Außerdem wäre ein Tandem-Massenspektrometer, wie schon beschrieben wurde, der bessere Detektor für ein solches Problem. Da unser Ziel jedoch vorwiegend darin lag, ein sauberes Nuclease Spektrum zu erhalten, wurden weiterführende Analysen an der Probe nicht durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass sich die erhaltenen Proteinspektren, bezüglich ihrer Ladungsverteilung, nach der Auftrennung in den CE-Kapillaren wesentlich von denen unterschieden, die durch direkte Injektion in das Massenspektrum erhalten wurden. Dies lies einen Zusammenhang zwischen der Ladungsverteilung in den Proteinspektren und der angelegten CE-Spannung vermuten.

Wirkung der CE-Spannung auf die Ladungszustände der Nuclease

Um eine Abhängigkeit der resultierenden Ladungsverteilung in den Proteinspektren der SNase von dem angelegten elektrischen Feld in der CE festzustellen, wurde dieses variiert. Dabei stieg die Anzahl an niedrig geladenen Proteinpeaks mit der gewählten Trennungsspannung, aber gleichbleibendem Spraytip-Potenzial an. Das heißt, das statische elektrische Feld der CE bewirkte eine Konformationsänderung des Proteins.

In Untersuchungen zur Faltungsstruktur der Nuclease mittels ESI-MS konnte nachgewiesen werden, dass ein höheres Spraytip-Potenzial zur Denaturierung und damit zur Entfaltung des Proteins führt [89]. Auch der pH-Wert der Lösung beeinflusst die Faltungsstruktur von Proteinen, wobei bei jedem pH-Wert mindestens ein stabiles Konformer existiert. Untersuchungen von Gostomski [89] zeigten bei einem pH-Wert von 2,7 hauptsächlich eine intensive Ladungsverteilung von + 27 bis + 13. Die niedrigeren Ladungszahlen + 12 bis + 8 waren nur schwach ausgeprägt (Abbildung 4-65).

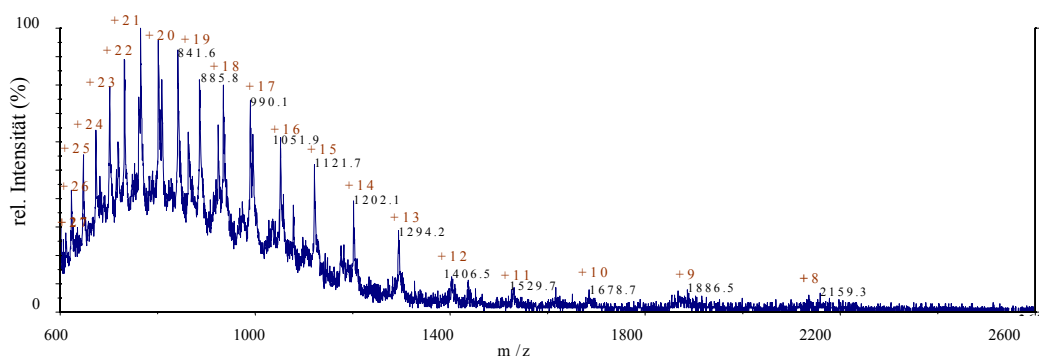


Abbildung 4-65: Ladungsverteilung der SNase im 10 mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 2,7, Spraytip-Potenzial 4200V [89], 4 Spektren addiert, braune Zahlen = Ladungszustand

Die vorherige kapillarzonen-elektrophoretische Auftrennung der Nuclease-Probe bei einer gewählten CE-Spannung von 15 kV bewirkte bereits eine Änderung der Faltungsstruktur des Proteins. Trotz des gering gewählten Spraytip-Potenzials von 2500 V konnten deutliche Ladungsverteilungen von + 8 bis +10 beobachtet werden (Abbildung 4-66).

Das Protein scheint sich also unter dem Einfluss des elektrischen Feldes zu falten, so dass bei diesem pH-Wert bisher geladene Aminosäuren für die Protonierung unzugänglich werden. Mit der Erhöhung der Trennungsspannung auf 30 kV nimmt dieser Effekt weiter zu (Abbildung 4-67).

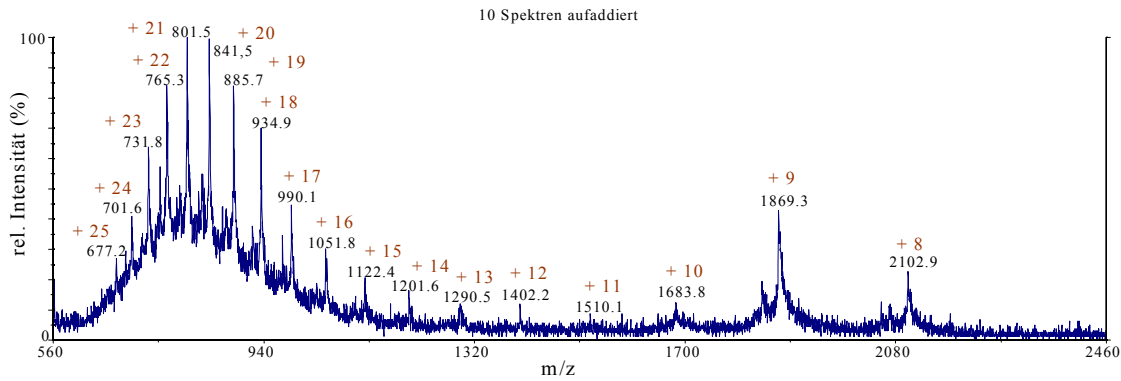


Abbildung 4-66: Ladungsverteilung der SNase nach der CZE; CE-Spannung = 15 kV; Spraytip-Potenzial = 2500 V; zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar; Trennmedium: 98,5/1,5 (v/v) Wasser/Ameisensäure-Gemisch (pH ca. 1,7); braune Zahlen = Ladungszustand

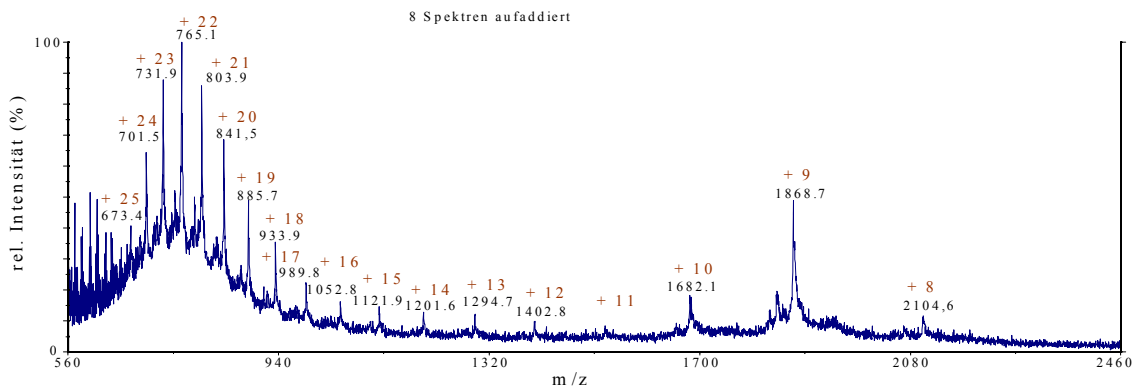


Abbildung 4-67: Ladungsverteilung der SNase nach einer CZE; CE-Spannung = 30 kV; Spraytip-Potenzial = 2500 V; zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar; Trennmedium: 98,5/1,5 (v/v) Wasser/Ameisensäure-Gemisch (pH ca. 1,7); braune Zahlen = Ladungszustand

Obwohl ein geringerer pH-Wert vorlag als bei den Messungen von Gostomski [85], war die Ladungsintensität der niedriger geladenen Zustände weitaus stärker ausgeprägt. Damit wird angenommen, dass die gewählte Trennungsspannung der Kapillarelektrophorese einen entscheidenden Einfluss auf die Faltungsstruktur des Proteins ausübt. Da dieser Effekt bisher nur bei der Nuclease so eindeutig beobachtet werden konnte, müsste diese Untersuchung noch mit weiteren Proteinen durchgeführt werden. Es ist für die Betrachtung der Faltungsstruktur von Proteinen sicher nicht unbedeutend, welche Strukturmerkmale für die beobachteten Änderungen in der Ladungsverteilungen verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die permanente hydrophile Beschichtung von fused silica Kapillaren mit 2-Hydroxyethylmethacrylat auf der Basis der ATRP beschrieben. Diese sollte dazu dienen, molekulare Wechselwirkungen zwischen den negativen Silanolgruppen des fused silica und positiv geladenen Analytionen, speziell der Proteine, zu unterbinden. Um einen möglichst vollständigen und gleichmäßigen Polymerfilm zu erhalten, wurden durch Variation unterschiedlicher Reaktionsparameter vier Beschichtungen hergestellt und diese auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Im Vordergrund stand dabei die erreichte Trennleistung und die Stabilität im basischen Medium. Beim Vergleich der Beweglichkeit der Neutralsubstanz DMSO zeigten Kapillaren, die als Startermolekül ein Bromalkylsilan besaßen, einen besonders niedrigen EOF und ließen eine besonders gleichmäßige Abdeckung der Silanolgruppen mit dem Polymer vermuten. Auch hinsichtlich der ersten Trennungen bei pH 3 bzw. 9 konnten mit solch beschichteten Kapillaren noch gute Trennstufenzahlen erreicht werden. Leider lies ihre Trennleistung mit der Zeit stark nach. Außerdem waren die Trennungen hinsichtlich der Migrationszeiten der Analyten schlecht reproduzierbar. Weitaus bessere Ergebnisse konnten mit chloralkylsilanisierten Kapillaren mit anschließender HEMA-Polymerisation erzielt werden, diese Kapillaren trennten die beiden Lactoglobuline A + B mit der höchsten Auflösung im Vergleich zu den übrigen Trennkapillaren. Besonders die Beschichtung, die in DMF hergestellt wurde, zeigte neben sehr hohen Trennstufenzahlen bei pH 3 (N/m ca. 600 000) auch kaum eine Veränderung in der Trennleistung während des Langzeittestes bei pH 9, was auf eine besonders hohe Stabilität im basischen Medium schließen lässt. Auch bei der Durchführung der isoelektrischen Fokussierung mit den unterschiedlich beschichteten Kapillaren wurden differenzielle Trennergebnisse erzielt. Neben breiteren Peaks zeigten die im wässrigen Medium polymerbeschichteten Kapillaren trotz gleicher Spannung einen höheren resultierenden Strom. Eine Begründung für dieses recht unterschiedliche Verhalten der Kapillaren sollten atomkraftmikroskopische Aufnahmen der Polymerschicht liefern. Dazu wurden planare Wafer auf gleiche Weise wie die Kapillaren beschichtet und anschließend ihre Oberfläche untersucht. Dabei zeigte die bei Raumtemperatur in nur 2 Stunden im wässrigen Medium erzielte HEMA-Beschichtung eine recht porige Struktur. In der unter milden Bedingungen sehr schnell verlaufenden Reaktion könnten Katalysatorionen in das Polymergerüst eingebaut worden sein und damit als leitfähige Ionen am Stromtransport mitwirken. Durch die ungleichmäßige Beschichtung ist es außerdem möglich, dass noch einige der hydrolyseempfindlichen Startermoleküle frei liegen

und es durch ihren Zerfall während der Trennungen zur allmählichen Ablösung der Polymerschicht kommt. Anders sieht es bei Beschichtungen aus, die in DMF hergestellt wurden. Hier beobachtet man eine sehr glatte Struktur mit immer wiederkehrendem Muster. Bei dieser recht langsam verlaufenden Polymerisation bildet sich also eine gleichmäßige Abdeckung, die sich vor allem bei den chloralkylsilanisierten Kapillaren durch hohe Stabilität ausweist. Da es bei den bromalkylsilanisierten Kapillaren bei gleicher Beschichtungsweise zu einer verminderten Trennleistung kommt, scheint ein Teil des Polymers nicht kovalent gebunden zu sein, sondern nur physikalisch adsorbiert. Dieser Anteil wird infolge von Spülvorgängen mit der Zeit abgetragen, so dass nach und nach die Kapillarenwand freigelegt wird und somit zu den beobachteten unerwünschten Effekten führt.

Trotz der recht unterschiedlichen Trennleistungen und Stabilitäten wurden die Kapillaren noch in Kopplungsversuchen zwischen Kapillarelektrophorese und ESI-MS eingesetzt. Dabei machte sich ihr unterschiedliches Verhalten aufgrund des leistungsstarken Detektors kaum bemerkbar. Um über die wesentlich längere Trenndauer in den fast doppelt so langen Kapillaren einen konstanten Strom zu gewährleisten, wurde dem Trennpuffer Hydrochinon zugesetzt und ein hydrodynamischer Fluss über die Trennung gelegt. Damit konnte das Zusammenbrechen des elektrischen Feldes aufgrund entstandener Gasblasen durch die elektrochemische Zersetzung des Elektrolyten weitestgehend unterbunden werden. In diesem Zusammenhang wurden aber bei Proteinen, welche die Aminosäure Cystein in ihrer Sequenz hatten, eine Adduktbildung mit dem Hydrochinon beobachtet.

Die Möglichkeit einer Identifizierung von Proteinen durch die hydrolytische Spaltung der Aminosäurekette mittels Trypsin sollte unter den gegebenen Bedingungen getestet werden. Nach fast vollständiger Auftrennung der entstandenen Peptidfragmente mit der CE erfolgte deren Detektion im ESI-Massenspektrometer. Der Abgleich der 36 gefundenen Fragmente mit der Proteindatenbank ergab im Fall des Cytochrom c eine Sequenzabdeckung von 78 %.

Die an Standardproteinen gesammelten Erfahrungen wurden dann auch an realen Proben getestet. So konnten bei der Untersuchung von Hühnereiweiß mit den beschichteten Kapillaren unter Anwendung der Kapillaronzonelektrophorese wie auch der isoelektrischen Fokussierung 4 Signale ohne auffällige Störung der Grundlinie detektiert werden. Weiterhin war es möglich, die Staphylococcus Nuclease aus einer verunreinigten Probe von drei weiteren Proteinen und 17 Peptiden zu trennen, um so ein sauberes Massenspektrum zu erhalten. Die Durchführung eines tryptischen Verdauens der SNase ergab nach dem Datenbankabgleich eine Aminosäuresequenzabdeckung von 55 %. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass das elektrische Feld in den

Kapillaren während der Trennung die Konformation der Nuclease beeinflusst. Die Intensitätserhöhung von Proteinpeaks, die auf niedrigere Ladungszustände zurückzuführen waren, deutete auf eine Faltung des Proteins hin, obwohl es bei dem gemessenen pH-Wert eigentlich kaum in seiner nativen Struktur vorliegen dürfte.

Bei der Durchführung aller Untersuchungen zeigten vor allem die chloralkylsilanierten Kapillaren, deren HEMA-Polymerisation in DMF stattgefunden hatte, eine breite Anwendbarkeit, wobei sehr gute Trennleistungen erreicht werden konnten. Die im wässrigen Medium beschichteten Kapillaren sollten vorwiegend im sauren Bereich zum Einsatz kommen, in dem sie auch hervorragende Trennstufenzahlen liefern. Als nicht besonders geeignet erwiesen sich die Polymerschichten, die auf der Basis eines Bromalkylsilans als Startermolekül entstanden. Durch die schlecht reproduzierbaren Migrationszeiten und die sinkenden Trennstufenzahlen sind hier kaum vergleichbare Messungen möglich.

6. Ausblick

Um die Stabilität der bromalkylsilanierten Kapillaren zu verbessern, müsste zunächst der Silanisierungsschritt selbst optimiert werden. Dieser wurde ja bisher analog zum Chloralkylsilan durchgeführt. Eventuell bringen andere Konzentrationsverhältnisse zwischen Silan und Toluol bessere Abdeckungserfolge. Weiterhin könnten die Reaktionstemperatur und die -zeit variiert werden. Eine gleichmäßige Anbindung einer höheren Anzahl Startermoleküle ist die Grundvoraussetzung für eine vollständige kovalente Anbindung des HEMA-Polymers. Weiterhin sollte in diesem Zusammenhang auch die Wirkung eines anderen Liganden für den Katalysatorkomplex untersucht werden. Der Ligand löst das Salz des Übergangsmetalle im organischen Medium und er reguliert das Redoxpotenzial des Metallzentrums, um eine angemessene Reaktivität und Dynamik für den Atomtransfer zu gewährleisten [37]. Während in dieser Arbeit nur Bipyridin eingesetzt wurde, konnte Matyjaszewski [90] mit 4,4'-Dialkyl substituierten Bipyridinen Styrene mit geringer Polydispersität polymerisieren. Shipp [91] polymerisierte unter Verwendung solcher Liganden Acrylat- und Methacrylat-Block-Copolymere. Vielleicht lässt sich durch die Optimierung dieser Parameter die Stabilität der Beschichtung erhöhen. Weiterhin könnte man durch die Zugabe von Quervernetzern zur Monomerlösung eine höhere Stabilität des resultierenden Polymergerüsts erreichen [56].

Für eine genauere Identifizierung von Proteinen durch die spezifische proteolytische Spaltung der Aminosäuresequenz sollte in jedem Fall ein Biomolekül mit verschiedenen Enzymen verdaut werden. Durch die Überlappung bestimmter Peptidsequenzen erhält man zusätzliche Informationen, die zur Identifizierung des gesuchten Peptides hilfreich sein können.

Besonders interessant dürfte jedoch die weitere Untersuchung des Konformationszustandes von Proteinen in Abhängigkeit von der gewählten CE-Spannung sein. Da dieser Effekt bisher nur an der Nuclease beobachtet wurde, wäre eine Versuchsreihe mit anderen Proteinen notwendig. Sollte sich die Faltungsstruktur nur einiger Proteine von einem statischen elektrischen Feld beeinflussen lassen, so wäre interessant, welche Zentren im molekularen Aufbau des Proteins dafür verantwortlich sind.

7. Literatur

1. Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.; Kapillarelektrophorese, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig/Wiesbaden, 1994
2. Günzel, H.; Analytiker-Taschenbuch 21, Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York 2000
3. Dörfler, H.-D.; Grenzflächen- und Kolloidchemie, VCH Weinheim New York Basel Cambridge Tokyo 1994
4. Steiner, F.; Hassel, M.; Electrophoresis 24 (2003), 399
5. Bello, M. S.; Capelli, L.; Righetti, P.G.; J. Chromatogr. A 684 (1994), 311
6. Lukacs, K. D.; Jorgenson, J. W.; J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 8 (1985), 407
7. Schwer, C.; Kandler, E.; Anal. Chem. 63 (1991) 1801
8. Liu, Q.; Liu, F.; Hartwick, R.; J. Chromatogr. Science 36, (1997), 126
9. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; Anal. Chem. 56 (1984), 111
10. Cohen, A. S.; Najarian, D. R.; Karger, B. L.; J. Chromatogr. 516 (1990), 49
11. Schrattenholz, A.; Methoden der Proteomforschung: molekulare Analyse der Proteinexpression, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2001
12. Nelson, D.; Cox, M.; Lehninger Biochemie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001
13. Zhu, M.; Rodriguez, R.; Wehr, T.; J. Chromatogr. 559 (1991), 479
14. Camilleri, P.; Capillary Electrophoresis, CRC Press, Boca Raton/Boston/New York/Washington D.C./London, 1998
15. Heiger, D.; High performance capillary electrophoresis: An Introduction, Agilent Technologies 2000
16. Meyer, R. J.; Pietsch, E. H. E.; Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie, Silicium Teil B, System Nr. 15, Verlag Chemie GmbH Weinheim 1959
17. Kohr, J.; Engelhardt, H.; J. Chromatogr. A 652 (1993), 309
18. Iler, R. K.; The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapor, 1979
19. Resch, R.; Grasserbauer, M.; Friedbacher, G.; Vallant, T.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H.; Appl. Surf. Sci. 140 (1999), 168
20. Leitner, T.; Friedbacher, G.; Vallant, T.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H.; Microchim. Acta 133 (2000), 331
21. Pullen, P.; Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Anal. Chem. 72, (2000), 2751

22. Baryla, N. E. ; Melanson, J. E.; McDermott, M. T.; Lucy, C. A.; Anal. Chem. 73 (2001), 4558
23. Rodriguez, I.; Li, S. F. Y.; Anal. Chim. Acta 383 (1999), 1
24. Hjertén, S.; J. Chromatogr. 347 (1985), 191
25. Cobb, K. A.; Dolnik, V.; Novotny, M.; Anal. Chem. 62 (1990), 2478
26. König, S.; Welsch, T.; J. Chromatogr. A 894 (2000), 79
27. Xu, R. J.; Vidal-Madjar, C.; Seville, B.; Diezmasa, J. C.; J. Chromatogr. A 730 (1996), 289
28. Gilges, M.; Kleemiss, M. H.; Schomburg, G.; Anal. Chem. 66 (1994), 2038
29. Patent PVA WO 96/23220
30. Bentreop, D.; Kohr, J.; Engelhardt, H.; Chromatographia 32 (1991), 171
31. Horváth, J.; Dolnik, V.; Electrophoresis 22 (2001), 644
32. Svec, F. ; Peters, E. C. ; Sýkora, D. ; Fréchet, J. M. J. ; J. Chromatogr. A 887 (2000), 3
33. Dulay, M. T.; Quirino, J. P.; Bennett, B. D.; Kato, M.; Zare, R. N.; Anal. Chem 73(16) (2001), 3921
34. Sakai-Sato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T.; Anal. Chem. 74 (2002), 2943
35. Kato, M.; Sakai-Kato, K.; Jin, H.; Kubota, K.; Miyano, H.; Toyo'oka, T.; Dulay, M. T.; Zare, R. N.; Anal. Chem. 76 (2004), 1896
36. J Wang, S.; Matyjaszewski, K.; Macromolecules 28 (1995) 7901
37. Matyjaszewski, K.; Xia, J.; Chem. Rev. 101 (2001) 2921
38. von Werne, T.; Patten, T. E.; J. Am. Chem. Soc. 121 (1999), 7409
39. von Werne, T.; Patten, T. E.; J. Am. Chem. Soc. 123 (2001), 7497
40. Perruchot, C.; Khan, M. A.; Kamitsi, A.; Armes, S. P.; Langmuir 17 (2001), 4479
41. Huang, X.; Doneski, L. J.; Wirth, M. J.; Anal. Chem. 70 (1998), 4023
42. James, P.; Proteom Research: Mass Spectrometry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001
43. Mariner Software Operator Training Course, Applied Biosystems, Februar 2000
44. Snyder, A. P.; Interpreting Protein Mass Spectra: A comprehensive Ressource, Oxford University Press 2000
45. www.uni-muenster.de/chemie.oc/service/mass/Methoden/Quadrupol/quadrupol.
46. Johnstone, R. A. W.; Rose, M. E.; Mass spectrometry for chemists and biochemists, Cambridge University Press 1996
47. Smith, R. D.; Barinaga, C. J.; Udseth, H. R.; Anal. Chem. 60, (1988), 1948
48. Choudhary, G.; Apffel, A.; Yin, H.; Hancock, W.; J. Chromatogr. A 887 (2000), 85

49. Wahl, J. H.; Smith, R. D.; *J. Capillary Electrophor.* 1 (1994), 62
50. Moini, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002); 466
51. Chang, Y. Z.; Chen, Y. R.; Her, G. R.; *Anal. Chem.* 73 (2001), 5083
52. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemie*, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1992
53. Cole, R. B.; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry - Fundamentals Instrumentation & Applications*, John Wileys & Sons, Inc. New York Chichester Weinheim Brisbane Singapore Toronto 1997
54. Walter, W.; Francke, W.; Beyer · *Walter Lehrbuch der Organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig 1998
55. Stryer, L.; *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1991
56. Leinweber, F. C.; Stein, J.; Otto, M.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370 (2001), 781
57. Matyjaszewski, K.; Miller, P. J.; Shukla, N.; Immaraporn, B.; Gelman, A.; Luokala, B. B.; Siclován, T. M.; Kickelbick, G.; Vallant, T.; Hoffmann, H.; Pakula, T.; *Macromolecules* 32 (1999), 8716
58. Lewis, L. N.; Colborn, R. E.; Grade, H.; Bryant, G. L.; Sumpter, C. A.; Scott, R. A.; *Organometallics* 14 (1995), 2202
59. Schirmer, A.; TU Bergakademie Freiberg, Diplomarbeit, 2001
60. Robinson, K. L.; Khan, M. A.; de Paz Banez, M. V.; Wang, X. S.; Armes, S. P.; *Macromolecules* 34 (2001), 3155
61. Matyjaszewski, K.; Shipp, D. A.; Wang, J-L.; Grimaud, T.; Patten, T. E.; *Macromolecules* 31 (1998), 6836
62. Hermsdorf, D.; TU Bergakademie Freiberg, Diplomarbeit 2003
63. Otto, M.; *Chemometrics*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998
64. Lottspeich, F.; Zorbas, H.; *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/Berlin, 1998
65. Pritchett, T. J.; *Electrophoresis* 17 (1996), 1195
66. Tao, L.; Xiao- Xia, S.; Rong, Z.; Qi- Chang, X.; *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 34/4 (2002), 423
67. Schirmer, A.; Claußnitzer, U.; Otto, M.; Friedbacher G.; Leinweber, F.; "Polymer coating of fused silica capillaries for the electrophoretic separation of biomolecules"; 5th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry, Blarney (Irland), September 8-12, 2001 (Poster)

-
68. Claußnitzer, U.; Schirmer, A.; Otto, M.; "CE-MS Separations of Peptides and Proteins with Permanently Coated Capillaries"; 24th International Symposium on Chromatography (ISC) 2002 Leipzig, 15.-20.9.2002 (Vortrag)
 69. Lechner, M. D.; D'Ans · Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1992
 70. Moelwyn-Hughes, E. A.; Physikalische Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1970
 71. Moini, M.; Cao, P.; Bard, A. J.; Anal. Chem. 71 (1999), 1658
 72. Boatman, R. J.; English, J. C.; Perry, L. G.; Fiorica, L. A.; Chem. Res. Toxicol. 13 (2000), 853
 73. Boatman, R. J.; English, J. C.; Perry, L. G.; Fiorica, L. A.; Chem. Res. Toxicol. 13 (2000), 861
 74. Mirza, U. A.; Chait, B. T.; Anal. Chem. 66, (1994), 2898
 75. Gumerov, D. R.; Dobo, A.; Kaltashov, I. A.; Eur. J. Mass Spectrom. 8 (2002), 123
 76. Dobo, A.; Kaltashov, I. A.; Anal. Chem. 73 (2001), 4763
 77. Otto, M., Knabe, F., Claußnitzer, U.; Chemom. int. lab. systems 72 (2004) 245-252
 78. Otto, M.; Analytische Chemie, VCH Weinheim New York Basel Cambridge Tokyo, 2000
 79. Tang, Q.; Harrata, A. K.; Anal. Chem. 69 (1997), 3177
 80. Tang, Q.; Harrata, A. K.; Lee, C. S.; Anal. Chem. 67 (1995), 3515
 81. Chi, Z.; Asher, S. A.; Biochem. 37 (1998), 2865
 82. Chen, J.; Gao, J.; Lee, C. S.; J. of Proteom Research 2 (2003), 249
 83. Follmann, H.; Biochemie-Grundlagen und Experimente, B. G. Teubner Stuttgart Leipzig, Wiesbaden, 2001
 84. Proteindatenbank PDB [www.rcsb.org/pdb]
 85. Protein Prospector [<http://prospector.ucsf.edu/>]
 86. Dass, C.; Principles and Practise of Biological Mass Spectrometry, Wiley-Interscience, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001
 87. www.ruhr-uni-bochum.de/mol-neutrobio/Lehrstuhl/BCGSS2001.pdf
 88. Cunliffe, J. M.; Baryla, N. E.; Lucy, C. A.; Anal. Chem. 74 (2002), 776
 89. Gostomski, I.; TU Bergakademie Freiberg, Diplomarbeit, 2004
 90. Matyjaszewski, K.; Patten, T. E.; Xia, J.; J. Am. Chem. Soc. 119 (1997), 674
 91. Shipp, D. A.; Wang, J.-L.; Matyjaszewski, K.; Macromolecules 31 (1998), 8005

8.1. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomkraftmikroskopie
ATRP	radikalische Atomtransferpolymerisation
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CGE	Kapillargelelektrophorese
CIEF	Kapillar-Isoelektrische Fokussierung
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
Da	Dalton (Masseinheit)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESEM	Environmental Scanning Elektronenmikroskop
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
ESI-TOF-MS	Elektrosprayionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
FE	Flächeneinheiten
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HQ	Hydrochinon
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Kat	Katalysator
LC	Flüssigchromatographie
MALDI-MS	Matrix unterstützte Laser Desorptions/Ionisierung-Massenspektrometrie
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MeOH	Methanol
MEKC	Micellarelektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometer
pI	Isoelektrischer Punkt
PVA	Poly(vinylalkohol)
R _a	Rauigkeit, arithmetisches Mittel
RT	Raumtemperatur
SNase	Staphylococcus Nuclease
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF-MS	Time-of-flight-Massenspektrometrie
W	Wasser

Symbolverzeichnis

v	Wanderungsgeschwindigkeit [m/s]
v_{EOF}	Wanderungsgeschwindigkeit des EOF [m/s]
μ_{eo}	elektrophoretische Mobilität [m ² /Vs]
μ_{eof}	elektroosmotische Mobilität [m ² /Vs]
μ_{DMSO}	DMSO-Beweglichkeit [m ² /Vs] entspricht μ_{eof}
E	elektrische Feldstärke [V/m]
q	Ladung des Analyten [C]
r	STOKESScher Radius eines hydratisierten Ions [cm]
ϵ	Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten [C ² /Jm]
η	Viskosität des Elektrolyten [Ns/m ²]

ζ	Zetapotenzial [V]
σ	Ladungsdichte an der Kapillaroberfläche
V	magnetische Spannung
ω	Kreisfrequenz [s^{-1}]
t	Zeit
T	Temperatur [K]
ϑ	Temperatur [$^{\circ}C$]
R	universale Gaskonstante [8,314 J/Kmol]
F	FARADAY-Konstante [$9,648 \cdot 10^4$ As/mol]
L_{eff}	effektive Kapillarlänge [m]
L_{tot}	Gesamtlänge der Kapillare [m]
t_m	Migrationszeit [min]
U	Spannung [kV]
c	Konzentration [mol/l]
m	Masse des Analyten [g]
t	Zeit [s]
s	Wegstrecke [m]
E_{kin}	kinetische Energie [J]
z	Anzahl an Ladungen
M	molare Masse des Analyten [g/mol]
FE	Flächeneinheiten
N	Trennstufenzahl pro Meter
D	Diffusionskoeffizient [cm^2/s]
I	Ionenstärke [mol/l]
α	Protolysegrad
K_s	Säurekonstante [mol^2/l^2]
r	Korrelationskoeffizient

Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	O	Glutamin
E	Glutaminsäure	P	Prolin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	T	Theonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	T	Tyrosin

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht, des Potenzialverlaufes an den Grenzflächen sowie des Zetapotenzials an der Scherebene:	6
Abbildung 2-2:	Darstellung des Elektroosmotischen Flusses mit seinem Strömungsprofil und seine Wirkung auf die Analyten	7
Abbildung 2-3:	Schematische Darstellung des Fokussierungsschrittes bei der CIEF oben: vor Fokussierung, Kapillare mit Ampholyt-Analytgemisch gefüllt unten: nach Fokussierung, Anordnung der Analyten im pH-Gradient	9
Abbildung 2-4:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Kapillarquerschnittes	12

8. Verzeichnisse

Abbildung 2-5:	Schematische Darstellung der ATRA und der sich davon ableitenden ATRP	15
Abbildung 2-6:	Schematischer Aufbau des verwendeten Mariner ESI-TOF-Masenspektrometers [43]	17
Abbildung 2-7:	Ionenbildung bei der Elektrospray-Ionisation	18
Abbildung 2-8:	Aufbau des Quadrupol-Systems [45]	19
Abbildung 2-9:	Wegstrecke von Ionen im Reflektor-TOF-Flugrohr	20
Abbildung 2-10:	ESI-MS Spektrum von Cytochrom c; braune Zahlen über den Peaks geben den Ladungszustand wieder	21
Abbildung 2-11:	Berechnete Isotopenverteilung für das dreifach geladene Molekülion des Peptides Angiotensin I (DRVYIHPFHL)	23
Abbildung 2-12:	Tryptische Spaltung einer Peptidbindung	24
Abbildung 3-1:	Silanisierung der fused silica Oberfläche mit dem Chloralkylsilan (Schritt A) oder dem Bromalkylsilan (Schritt B)	26
Abbildung 3-2:	Silanisierung mit einem Silan geringerer sterischer Größe (Schritt C) und Hydrolyse mit verdünnter Essigsäure (Schritt D)	26
Abbildung 3-3:	Anbindung des HEMA an die mit Startermolekülen modifizierte Kapillarinnenwand (Schritt E)	28
Abbildung 4-1:	Mittlerer prozentualer Umsatz, ermittelt aus zwei Messungen (Spannweite), an HEMA in bromalkylsilanierten Kapillaren im Reaktionsmedium DMF bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten; Kat: CuBr in niedriger Konzentration	37
Abbildung 4-2:	Mittlerer prozentualer Umsatz, ermittelt aus zwei Messungen (Spannweite), an HEMA in bromalkylsilanierten Kapillaren im Reaktionsmedium Wasser/Methanol bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten; Kat: CuBr in niedriger Konzentration	37
Abbildung 4-3:	DMSO-Beweglichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert in bromalkylsilanierten Kapillaren mit anschließender HEMA-Polymerisation in DMF	39
Abbildung 4-4:	Relative Standardabweichung der DMSO-Beweglichkeiten über drei Läufe in bromalkylsilanierten Kapillaren mit anschließender HEMA-Polymerisation in DMF	39
Abbildung 4-5:	DMSO-Beweglichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert in unterschiedlich beschichteten Kapillaren	40
Abbildung 4-6:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer fused silica Kapillare	41
Abbildung 4-7:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer chloralkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in DMF	42
Abbildung 4-8:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer chloralkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in Wasser/Methanol	43
Abbildung 4-9:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer bromalkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in DMF	43
Abbildung 4-10:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer bromalkylsilanierten Kapillare, polymerisiert in Wasser/Methanol	44
Abbildung 4-11:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer PVA-Kapillare	44
Abbildung 4-12:	Proteintrennung bei pH 3 mit einer eCap TM Neutral-Kapillare	45
Abbildung 4-13:	Mittlere Trennstufenzahl N/m für die Proteintrennung bei pH 3 für jede untersuchte Kapillare am Beispiel des Cytochrom c und Chymotrypsinogen.	46
Abbildung 4-14:	Graphische Darstellung der höchsten, niedrigsten und mittleren Trennstufenzahl für Cytochrom c in den unterschiedlichen Kapillaren	47
Abbildung 4-15:	Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten für Cytochrom c und Chymotrypsinogen bei pH 3 in unterschiedlich beschichteten Kapillaren	48

8. Verzeichnisse

Abbildung 4-16:	4. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 in chloralkylsilanisierter Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF; abgebildete Elektropherogramme sind gegeneinander versetzt	49
Abbildung 4-17:	3. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 in chloralkylsilanisierter Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel Wasser/Methanol	49
Abbildung 4-18:	7. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer PVA-Kapillare	50
Abbildung 4-19:	1. und 101. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer eCap TM Neutral-Kapillare	50
Abbildung 4-20:	4. und 50. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer bromalkylsilanisierter Kapillare und HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF	51
Abbildung 4-21:	3. und 66. Lauf der Proteintrennung bei pH 9 mit einer bromalkylsilanisierter Kapillare und HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel Wasser/Methanol	52
Abbildung 4-22:	Trennstufenzahlen der ersten 10 und letzten 10 Läufe am Beispiel des Lactoglobulin A	53
Abbildung 4-23:	Reproduzierbarkeit der Migrationszeit für Lactoglobulin A über den Langzeittest	54
Abbildung 4-24:	UV-Spektrum in 3-D-Darstellung; aufgenommen mit einem Diodenarray-detektor während einer CIEF von Myoglobin in 2 % Ampholin 3,5 – 10	55
Abbildung 4-25:	ESI-Massenspektrum des Ampholin 3,5 - 10 in 49/50/1 Wasser/Methanol/ Essigsäure (v/v/v) .	56
Abbildung 4-26:	Ausschnitt des ESI-Massenspektrums (Abbildung 4-25) mit 2fach geladenen Peaks	57
Abbildung 4-27:	CIEF von Myoglobin (200 µg/ml) in Kapillare HEMA/DMF, 2 % Ampholin 3-10, $L_{\text{eff}} = 24,5$ cm, Fokussierung: 7 min 15 kV, chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer	58
Abbildung 4-28:	Relative Standardabweichung der Migrationszeit und Peakflächen von 10 Messungen bei unterschiedlichen Mobilisierungstechniken am Beispiel des Myoglobins und Chymotrypsinogens.	59
Abbildung 4-29:	CIEF von Myoglobin (200 µg/ml) in fused silica Kapillare, 2 % Ampholin 3-10, $L_{\text{eff}} = 24,5$ cm, Fokussierung: 2 min 15 kV, chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer	60
Abbildung 4-30:	CIEF von Myoglobin (200 µg/ml) in beschichteten Kapillaren, 2 % Ampholin 3-10, $L_{\text{eff}} = 23,5$ bis 26 cm, Fokussierung: 2 min 15 kV, chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer, A: HEMA/W/MeOH; B: HEMA DMF; C: HEMA/W; D: Br/HEMA/DMF	60
Abbildung 4-31:	AFM des unbehandelten Wafers	63
Abbildung 4-32:	AFM nach Behandlung mit Trichlorsilyl-(m/p-chlormethylphenyl)ethan links: Oberfläche des Wafers rechts: Oberfläche des Kapillarinnenkanals	63
Abbildung 4-33:	links: AFM nach Behandlung mit 3-Chlorpropyltrichlorsilan rechts: AFM nach Hydrolyse mit Essigsäure	64
Abbildung 4-34:	links: AFM nach Behandlung mit 11-(2-Brom-2- methyl)-propionyloxy)undecyltrichlorsilan rechts: AFM nach zusätzlicher Behandlung mit 3-Chlorpropyltrichlorsilan	64
Abbildung 4-35:	AFM der bromalkylsilanisierter Wafer nach Hydrolyse	65
Abbildung 4-36:	AFM nach Polymerisation von HEMA in DMF auf der Grundlage verschiedener Initiatormoleküle links: Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan rechts: 11-(2-Brom-2-methyl)-propionyloxy)-undecyltrichlorsilan	65
Abbildung 4-37:	AFM der Kapillarinnenseite nach Polymerisation von HEMA in DMF auf der Grundlage von Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan	66

Abbildung 4-38:	AFM nach Polymerisation von HEMA in Wasser/Methanol auf der Grundlage verschiedener Initiatormoleküle links: Initiator: Trichlorsilyl-(m/p-Chlormethylphenyl)ethan rechts: 11-(2-Brom-2-methyl)-propionyloxy)-undecyltrichlorsilan	67
Abbildung 4-39:	Vergleich der erreichten Trennstufenzahlen mit einem Natriumphosphatpuffer und einem Ammoniumformiatpuffer als Trennmedium; Trennkapillare chloralkylsilanisiert und HEMA entweder in DMF oder in Wasser/Methanol polymerisiert	68
Abbildung 4-40:	Vergleich der erreichten Trennstufenzahlen bei unterschiedlicher Konzentration des Ammoniumformiatpuffers; Trennkapillare chloralkylsilanisiert und HEMA entweder in DMF oder Wasser/Methanol polymerisiert	70
Abbildung 4-41:	Stromverlauf während der Messung mit (grün) und ohne (schwarz) Hydrochinon (HQ) zum Puffersystem, $U = 30 \text{ kV}$, nach 6 min zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar	71
Abbildung 4-42:	Elektropherogramm das zusätzlich während der CE/ESI-MS Kopplung aufgenommen wurde; $L_{\text{eff}} = 22 \text{ cm}$; $L_{\text{tot}} = 90 \text{ cm}$; $U = 30 \text{ kV}$; Trennmedium: Wasser + 1,5 % Ameisensäure mit (grün) und ohne (schwarz) Zusatz von Hydrochinon (HQ);	72
Abbildung 4-43:	Oben: Masse-Ladungsverteilung des Hydrochinon-Lysozym-Adduktes; braune Zahlen über den Peaks geben Ladungszustand wieder unten: dazugehörige Deconvolution	73
Abbildung 4-44:	Reaktionsgleichung der Adduktbildung zwischen Hydrochinon und Cystein nach dem Prinzip der Michael-Addition	73
Abbildung 4-45:	Oben: Masse-Ladungsverteilung des Lactalbumin (schwarz) und seines Hydrochinon-Adduktes (grün); braune Zahlen = Ladungszustand unten: dazugehörige Deconvolution	74
Abbildung 4-46:	Proteinstruktur des Lysozyms (links) und des Lactalbumins (rechts); die über Disulfidbrücken (gelb) verbundenen Cysteinreste sind orange gekennzeichnet	75
Abbildung 4-47:	Vergleich der Proteintrennung nach einer Trennstrecke von 22 cm im Trennmedium 98,5/1,5 Wasser/Ameisensäure (v/v) (schwarz) und 20 mM Formiatpuffer (grün); $U = 30 \text{ kV}$	77
Abbildung 4-48:	ESI-Massenspektren von Lactalbumin unter Verwendung unterschiedlicher Trennmedien bei der CZE; braune Zahlen = Ladungszustand oben: mit 98,5/1,5 Wasser/Ameisensäure (v/v) unten: mit 20 mM Ammoniumformiatpuffer	78
Abbildung 4-49:	Resultierende Ladungsverteilungen des Myoglobins bei unterschiedlichen Ampholytkonzentrationen; Spektren addiert; braune Zahlen = Ladungszustand	80
Abbildung 4-50:	Stromverlauf während der isoelektrischen Fokussierung, Bedingungen: 1% Ampholyt, Kapillare $L_{\text{tot}} = 90 \text{ cm}$, $U = 30 \text{ kV}$	81
Abbildung 4-51:	Extrahiertes Ionen-Elektropherogramm des Myoglobins in 0,5 % Ampholin nach einer Fokussierzeit von 10 min (links) bzw. 20 min (rechts); $U = 30 \text{ kV}$; Kapillare $L_{\text{tot}} = 90 \text{ cm}$; hydrodynamische Mobilisierung mit 50 mbar	82
Abbildung 4-52:	Oben: ESI-Massenspektrum des Apo-Myoglobins (schwarz) und Holo-Myoglobins (grün) nach 15 min Fokussierung bei 30 kV mit 1 % Ampholin 3,5 - 10, hydrodynamische Mobilisierung mit 50 mbar, braune Zahlen = Ladungszustand unten: Deconvolution zum oberen Massenspektrum	82

8. Verzeichnisse

Abbildung 4-53:	ESI-Massenspektrum des Myoglobins bei pH 5 (10 mM Ammonium-acetatpuffer); Holo-Form (grün); Apo-Form (schwarz); Spraytip-Potenzial 3800 V; Spektren addiert; braune Zahlen = Ladungszustand	83
Abbildung 4-54:	Kalibrationskurve der Migrationszeit gegen den pI der Analyten bei unterschiedlichem Druck, Reihenfolge der Analyten: Ribonuclease (pI = 9,45); Myoglobin (pI = 6,9); Angiotensin (pI = 6,8); Lactoglobulin A (pI = 5,15); Lactoglobulin B (pI = 5,3); r = Korrelationskoeffizient	84
Abbildung 4-55:	Oben: extrahiertes Ionen-Elektropherogramm der Proteine nach erfolgter elektrokinetischer Injektion und Fokussierung in 0,5 % Ampholin 3,5 - 10; mitte und unten: dazugehörige ESI-Massenspektren der aufgetrennten Proteine; braune Zahlen = Ladungszustand	85
Abbildung 4-56:	Mikroskopische Aufnahme des Kapillarfensters nach Fokussierung, im Innenkanal ist weiß die Proteinfällung zu sehen	86
Abbildung 4-57:	Erwartete Peptide durch den tryptischen Verdau der Aminosäuresequenz des Cytochrom c [84]	87
Abbildung 4-58:	CZE von Hühnereiweiß/Wasser-Gemisch (1/20, v/v); chloralkylsilanierte Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF; $L_{tot} = 44$ cm; 20 mM Phosphatpuffer pH 3; U = 30 kV; Injektion 40 mbar · 3 s	90
Abbildung 4-59:	CIEF des Hühnereiweiß/Wasser-Gemisches (1:100, v/v) + 1,5 % Ampholin 3,5 – 10; chloralkylsilanierte Kapillare mit HEMA-Polymerisation im Lösungsmittel DMF; $L_{tot} = 44$ cm; U = 30 kV und nach 10 min chemische Mobilisierung mit kathodischem Mobilizer	91
Abbildung 4-60:	Schematische Verteilung des pH-Gradienten über die 44 cm lange Kapillare während der Fokussierung	91
Abbildung 4-61:	Oben: ESI-Massenspektrum der SNase unten: dazugehörige Deconvolution	92
Abbildung 4-62:	Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; M = 10 050 Da	93
Abbildung 4-63:	Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; M = 12 900 Da	93
Abbildung 4-64:	Oben: ESI-Massenspektrum eines von der SNase abgetrennten Proteins; unten: dazugehörige Deconvolution; M = 32 063 Da	94
Abbildung 4-65:	Ladungsverteilung der SNase im 10 mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 2,7; Spraytip-Potenzial 4200V [89]; 4 Spektren addiert, braune Zahlen = Ladungszustand	96
Abbildung 4-66:	Ladungsverteilung der SNase nach der CZE; CE-Spannung = 15 kV; Spraytip-Potenzial = 2500 V; zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar; Trennmedium: 98,5/1,5 (v/v) Wasser/Ameisensäure-Gemisch (pH ca. 1,7); braune Zahlen = Ladungszustand	97
Abbildung 4-67:	Ladungsverteilung der SNase nach einer CZE; CE-Spannung = 30 kV; Spraytip-Potenzial = 2500 V; zusätzlicher hydrodynamischer Fluss von 50 mbar; Trennmedium: 98,5/1,5 (v/v) Wasser/Ameisensäure-Gemisch (pH ca. 1,7); braune Zahlen = Ladungszustand	97
Abbildung I:	Darstellung der Verteilung von N/m über den Langzeittest bei pH 9 mit unterschiedlich beschichteten Kapillaren und für drei verschiedene Proteine	I

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Reaktionsbedingungen für die Polymerbeschichtung von Kapillaren und Wafern	27
Tabelle 4-1:	Mittlerer Umsatz an HEMA Monomer in % unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Katalysator CuCl (geringe Konz. = 2 mg/ml CuCl und hohe Konz. = 14,7 mg/ml CuCl)	35
Tabelle 4-2:	Mittlerer Umsatz an HEMA Monomer in % unter Verwendung unterschiedlicher Mengen an Katalysator CuBr (geringe Konz. = 2,9 mg/ml CuBr und hohe Konz. = 21,3 mg/ml CuBr)	36
Tabelle 4-3:	Ergebnisse der KAISERSchen Peaktrennung für die zwei Peaks Lactoglobulin A + B	45
Tabelle 4-4:	Die über den Langzeittest erreichten Mediane der Trennstufenzahl N/m mit unterschiedlich beschichteten Trennkapillaren für drei verschiedene Proteine.	53
Tabelle 4-5:	Resultierender Strom in unterschiedlich beschichteten Kapillaren bei einer angelegten Spannung von 15 kV, Kapillarinhalt: 2 % Ampholin 3,5 – 10 mit Myoglobin (200 µg/ml)	61
Tabelle 4-6:	Resultierende Ströme in µA bei Anlegen einer gleichen Spannung von 30 kV unter Verwendung unterschiedlich konzentrierter Puffersysteme; Kapillare HEMA/DMF $L_{\text{eff}} = 56$ cm; Kapillare HEMA/W/MeOH $L_{\text{eff}} = 46$ cm	69
Tabelle 4-7:	Migrationsreihenfolge der Proteine in Abhängigkeit vom Trennmedium	77
Tabelle 4-8:	Berechnung der freien Fomiationenkonzentration in den Trennmedien unter Beachtung der Gesamtkonzentration c und des Protolysegrades α	79
Tabelle 4-9:	Gefundene Fragmente des Cytochrom c nach tryptischem Verdau	88
Tabelle 4-10:	Gehalt der Proteine im Hühnereiweiß [87]	90
Tabelle 4-11:	Gefundene Peptide bei der Auftrennung der SNase-Probe	94
Tabelle I:	Größe der ermittelten p-Werte bei der Untersuchung auf Normalverteilung der erreichten N/m während des Langzeittestes. Blaue Werte bedeuten, die Grundgesamtheit von N/m ist „normalverteilt“ und schwarze Werte bedeuten „nicht normalverteilt“	III
Tabelle II:	Erhaltene Fragmente aus dem Nuclease-Verdau, die nicht der Nuclease zugeordnet werden konnten	III
Tabelle III:	Fragmente aus dem Nuclease-Verdau, die der Nuclease zugeordnet werden konnten	V

8.4. Material- und Geräteverzeichnis*Kapillaren*

Fused silica Kapillaren, 50 µm i. D., 360 µm a. D.; Microquartz GmbH München Deutschland
PVA- Kapillaren, 50 µm i. D., Agilent Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
eCAP™ Neutral-Kapillaren 50 µm i. D., Beckman-Coulter GmbH, Unterschleißheim-Lonhof, Deutschland

Chemikalien

Ameisensäure p.A. 98-100 %	Merck, Frankfurt, Deutschland
Ammoniumacetat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Bipyridin	Chemicals, Gleiwitz, Polen
(3-Chloropropyl)-trichlorsilan	Fluka, Buchs, Schweiz
CuBr 99,999 %	Aldrich, Milwaukee, WI, USA

CuCl >98 %	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs, Schweiz
Essigsäure p.A. 100 %	Merck, Frankfurt, Deutschland
2-Hydroxyethylmethacrylat, ophthalmic grade >99,8 %	Polyscience Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Methanol, gradient grade	Merck, Frankfurt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
N, N,- Dimethylformamid	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Salzsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Trichlorsilyl(m/p-chloromethyl- phenyl)ethan	ABCR GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Toluol, ultra resi analyzed	J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA

Proteine

α -Chymotrypsinogen f. Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Cytochrom c from Horse Heart	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Holo-Myoglobin, research grade	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
α -Lactalbumin from Bovine milk	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
β -Lactoglobulin A +B from Bovine milk	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Lysozym from Chicken Egg White	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Molecular Weight Marker Kit Range 14.000- 70.000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Nuclease, Micrococcal from Staphylococcus aureus	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Ribonuclease A from Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
CE-IEF kathodischer Mobilizer	BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA

Wafer

4'' Quarzwafer, D = 100 +/- 0,5 mm Dicke 525 +/- 25 μ m, beidseitig poliert	Sico Wafer GmbH, Jena, Deutschland
--	------------------------------------

Geräte

Kapillarelektrophorese

HP3D Kapillarelektrophorese System von Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland

Elektrosprayionisations-Massenspektrometer

Mariner ESI-TOF-Massenspektrometer, Applied Biosystems

Gaschromatograph

Gaschromatograph HP 5880A Series mit Flammenionisationsdetektor

ESEM

Philips XL30 ESEM

Atomkraftmikroskop

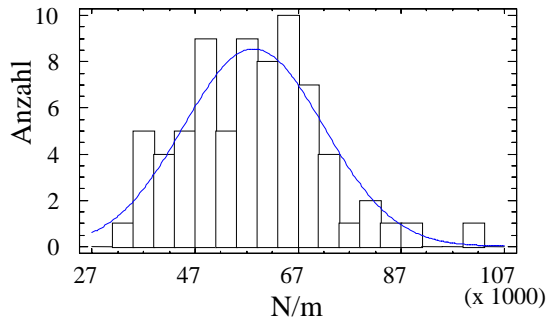
AFM TMX 2010 von Topometrix, CSC-12-B Silizium-Spitze der Firma Mikromasch mit Federkonstante von ca. 1,75 N/m und einer Resonanzfrequenz von 255 kHz

Sonstige Laborausstattung

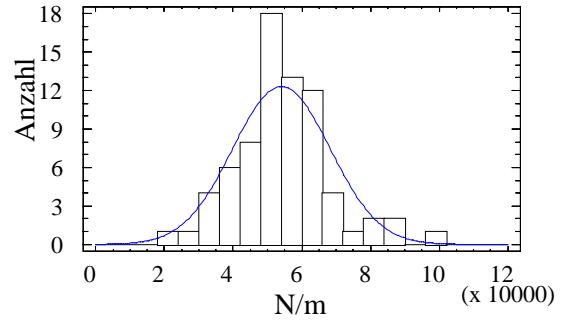
Spül- und Belegsysteem Typ CS aus Edelstahl	CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
Ultrasonic Compact Cleaner	Tesla, Prag, ČSSR
HI 9321 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Deutschland
Microwaage	Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland
Muffelofen	VEB MLW Labortechnik, Ilmenau
Temperaturregler Micromega	Omega, Stamford, USA

Abbildung I: Darstellung der Verteilung von N/m über den Langzeittest bei pH 9 mit unterschiedlich beschichteten Kapillaren und für drei verschiedene Proteine

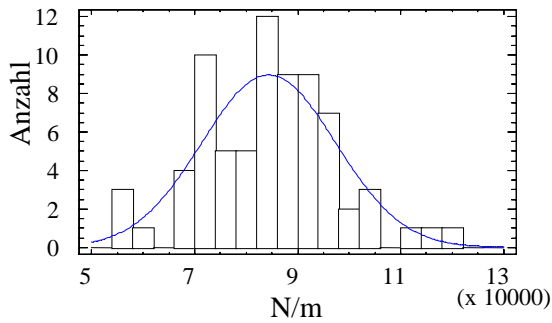
Chloralkylsilan, HEMA/DMF, Lactoglobulin A



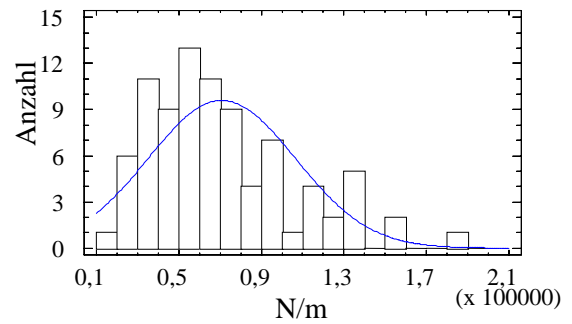
Chloralkylsilan, HEMA/DMF, Lactoglobulin B



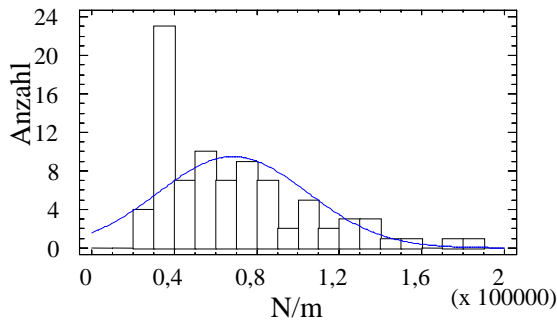
Chloralkylsilan, HEMA/DMF, Lactalbumin



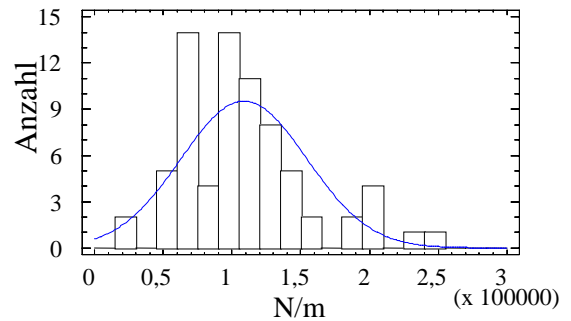
Chloralkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactoglobulin A



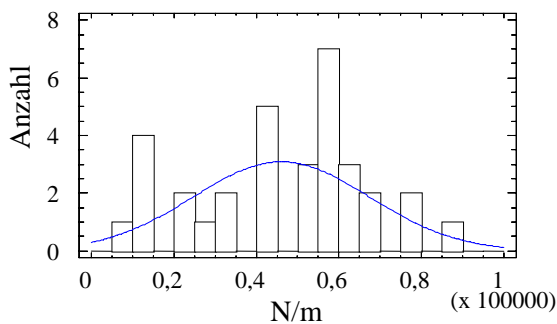
Chloralkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactoglobulin B



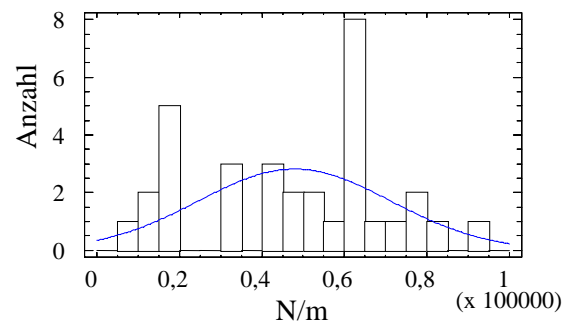
Chloralkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactalbumin



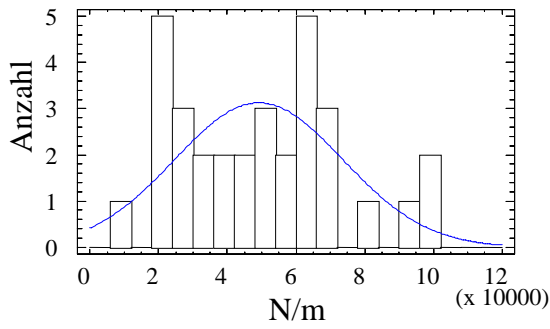
Bromalkylsilan, HEMA/DMF, Lactoglobulin A



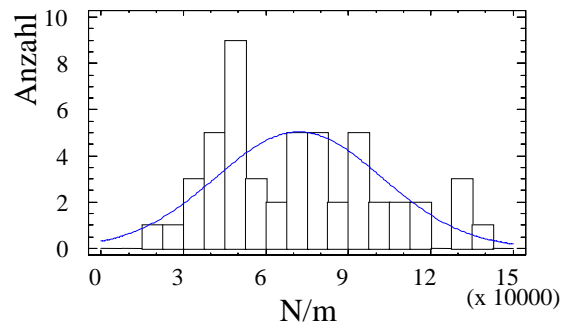
Bromalkylsilan, HEMA/DMF, Lactoglobulin B



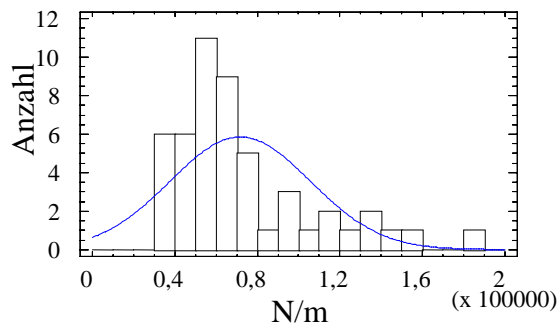
Bromalkylsilan, HEMA/DMF, Lactalbumin



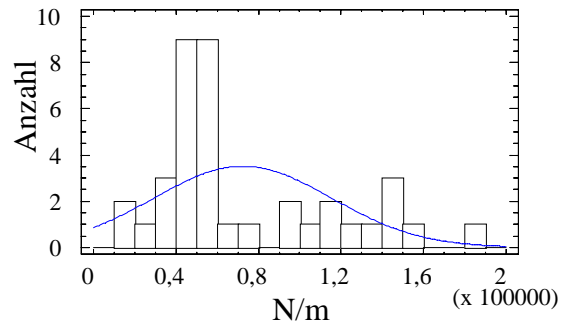
Bromalkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactoglobulin A



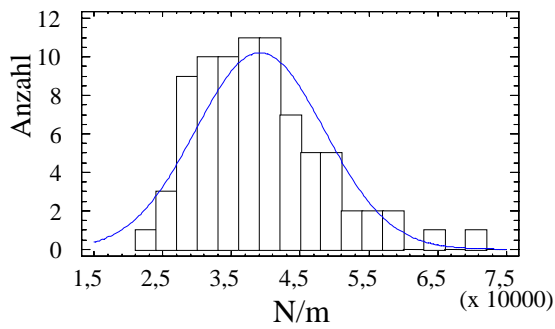
Bromalkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactoglobulin B



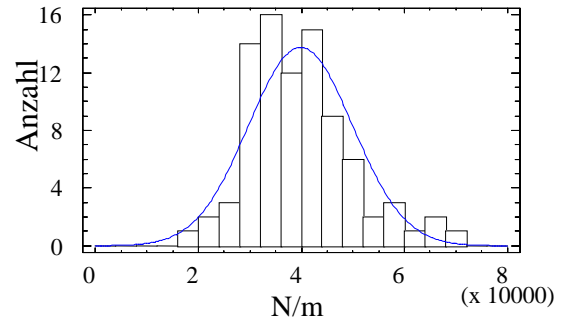
Bromalkylsilan, HEMA/W/MeOH, Lactalbumin



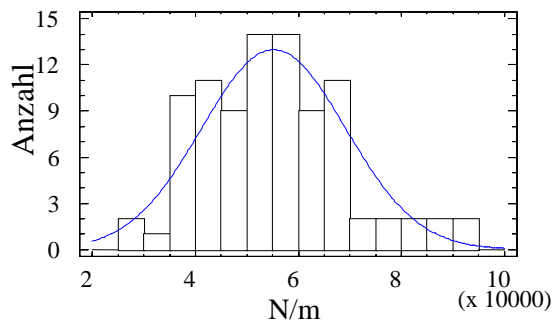
eCap-Kapillare, Lactoglobulin A



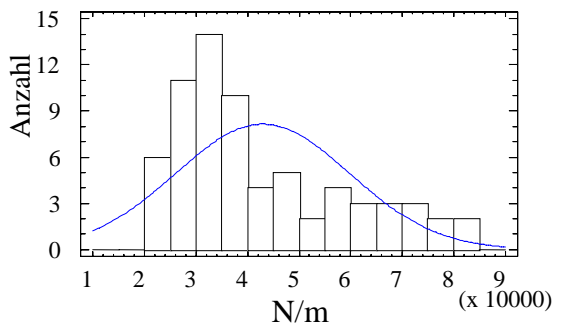
eCap-Kapillare, Lactoglobulin B



eCap-Kapillare, Lactalbumin



PVA-Kapillare, Lactoglobulin A



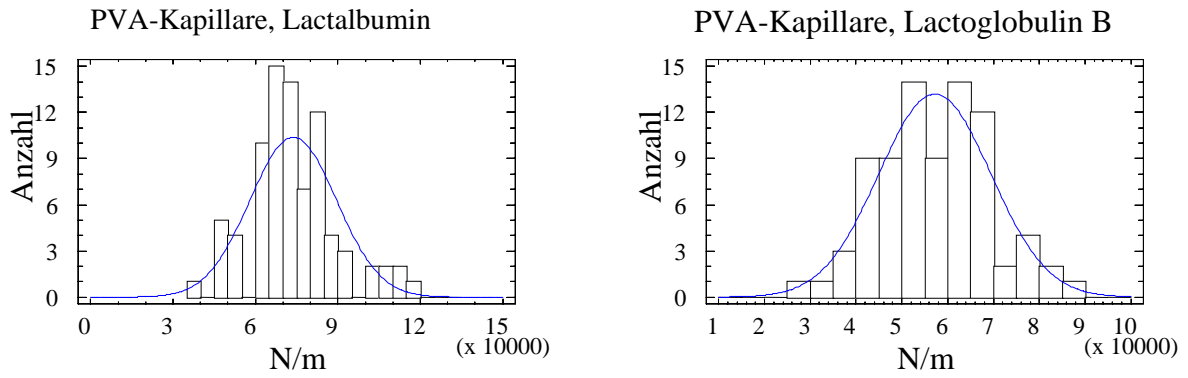


Tabelle I: Größe der ermittelten p-Werte bei der Untersuchung auf Normalverteilung der erreichten N/m während des Langzeittestes. Blaue Werte bedeuten, die Grundgesamtheit von N/m ist „normalverteilt“ und schwarze Werte bedeuten „nicht normalverteilt“

Kapillaren	p-Werte		
	(Lactoglobulin A)	(Lactoglobulin B)	(Lactalbumin)
Chloralkylsilan, HEMA/DMF	0,568	0,100	0,883
Chloralkylsilan, HEMA/W/MeOH	0,021	0,000	0,052
Bromalkylsilan, HEMA/DMF	0,030	0,093	0,479
Bromalkylsilan, HEMA/W/MeOH	0,168	0,001	0,000
eCap	0,115	0,163	0,383
PVA	0,000	0,444	0,133

Tabelle II: Erhaltene Fragmente aus dem Nuclease–Verdau, die nicht der Nuclease zugeordnet werden konnten

Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid	Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid
377,0289	+4	1505,0919	567,4029	+2	1133,7979
377,9307	+3	1131,7763	577,3570	+2	1153,7061
378,6084	+3	1133,8094	581,0579	+3	1741,1579
380,7557	+2	760,5035	583,0191	+3	1747,0415
388,2767	+2	775,5455	588,8550	+2	1176,7021
405,5468	+4	1619,1635	589,6945	+3	1767,0677
409,7633	+4	1636,0295	596,7150	+3	1788,1292
414,2963	+2	827,5847	601,3994	+4	2402,5739
414,6749	+5	2069,3429	607,8997	+2	1214,7915
415,9389	+3	1245,8009	691,4222	+1	691,4222
427,4484	+1	427,4484	612,3631	+3	1835,0735

Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid	Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid
430,3212	+1	430,3212	613,3869	+2	1225,7659
430,7818	+2	860,5557	616,9335	+2	1232,8591
435,6060	+3	1304,8022	617,7903	+3	1851,3551
435,7966	+4	1740,1627	624,4312	+2	1247,8545
436,3962	+1	436,3962	631,3787	+4	2522,4911
437,6456	+3	1310,9210	643,0926	+3	1927,262
437,6562	+3	1310,9528	644,8883	+4	2576,5295
445,1817	+1	445,1817	645,6391	+4	2579,5327
447,7822	+4	1788,1051	650,4760	+2	1299,9441
449,2178	+1	449,2178	651,4103	+1	651,4103
459,3294	+3	1375,9724	652,8983	+2	1304,7887
462,6300	+3	1385,8742	659,9205	+2	1318,8331
474,3110	+2	947,6141	661,4570	+2	1321,9061
476,8022	+2	952,5965	662,1093	+3	1984,3121
477,3074	+2	953,6069	665,9214	+4	2660,6619
482,8187	+2	964,6295	669,7818	+3	2007,3296
484,3172	+2	967,6265	672,4526	+2	1343,8973
495,6511	+3	1484,9375	685,9184	+2	1370,8289
501,3415	+3	1502,0087	686,4164	+2	1371,8249
502,3597	+3	1505,0633	688,4781	+2	1375,9483
503,3540	+2	1005,7001	690,7869	+3	2070,3449
505,0108	+3	1513,0166	691,4222	+1	691,4222
508,8753	+4	2032,4775	697,6953	+4	2787,7575
510,8340	+2	1020,6601	706,9406	+2	1412,8733
510,8416	+2	1020,6753	708,4413	+2	1415,8747
517,8474	+4	2068,3659	713,4681	+2	1425,9283
518,0827	+4	2069,3071	714,4289	+2	1427,8499
525,3628	+2	1049,7177	717,4520	+2	1433,8961
526,8347	+2	1052,6615	724,7888	+3	2172,3506
530,3689	+1	530,3689	746,0210	+2	1491,0341
531,8353	+2	1062,6627	759,1681	+3	2275,4885
537,6236	+4	2147,4707	761,8342	+3	2283,4868
539,3801	+2	1077,7523	768,7391	+4	3071,9327
546,0188	+3	1636,0406	772,0164	+4	3085,0419
546,3442	+3	1637,0168	801,8629	+3	2403,5729

Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid	Gem. Masse	Ladung	Masse Peptid
550,0551	+3	1648,1495	841,5380	+3	2522,5982
554,3548	+3	1661,0486	859,8727	+3	2577,6023
557,4380	+2	1113,8681	918,0298	+2	1835,0517
558,3634	+5	2787,7854	930,1870	+3	2788,5452
566,3732	+3	1697,1038	935,5438	+3	2804,6156
566,3871	+2	1131,7663	1024,3104	+4	4094,2179

Tabelle III: Fragmente aus dem Nuclease-Verdau, die der Nuclease zugeordnet werden konnten

T1		T2	T3	T4	T5	T6
ATSTK	K	LHK	EPATLIK	AIDGDTVK	LMYK	GQPMTFR
T7	T8		T9		T10	
LLLVDPETK		HPK	K	GVEK	YGPEASAFTK	K
T11		T12	T13	T14	T15	T16
MVENAK	K	IEVEFDK	GQR	TDK	YGR	GLAYIYADGK
T17		T18		T19		
MVNEALVR		QGLAK		VAYVYKPNNTHEQHLR	K	
T20		T21	T22			
SEAQAK	K	EK	LNIWSEDNADSGQ			

	m gemessen	Ladung	m Fragment gemessen	m theoretisch
T1	507,3391	+1	507,3391	507,2779
T18	516,3773	+1	516,3773	516,3146
K-T9	560,3692	+1	560,3692	560,3408
T20	317,2066	+2	633,4053	633,3208
T1-K	318,2328	+2	635,4577	635,3728
T11	691,4222	+1	691,4222	691,3449
T11	346,2203	+2	691,4327	691,3449
T14-T15	739,4702	+1	739,4702	739,3739
T14-T15	370,2391	+2	739,4703	739,3739
K-T20	381,2613	+2	761,5147	761,4157
T3	386,2961	+2	771,5843	771,4616
T11-K	410,2761	+2	819,5443	819,4398
K-T11	410,2761	+2	819,5443	819,4398
T6	418,7660	+2	836,5241	836,4089
T12	440,2819	+2	879,5559	879,4464

	m gemessen	Ladung	m Fragment gemessen	m theoretisch
K-T20-K	445,3101	+2	889,6123	889,5107
T17	466,3131	+2	931,6183	931,5035
K-T11-K	931,6440	+1	931,6440	931,5035
T20-K-T21	474,3191	+2	947,6303	947,5348
T20-K-T21	509,8185	+2	1018,6291	1018,5533
T10	340,2245	+3	1018,6576	1018,5533
T16	1070,6670	+1	1070,6670	1070,5159
T7	535,8400	+2	1070,6721	1070,5522
T2-T3	564,8984	+2	1128,7889	1128,6516
T2-T3	383,9537	+3	1149,8452	1149,6996
T2-T3	575,4268	+2	1149,8457	1149,6996
T10-K	599,8873	+2	1198,7667	1198,6108
T10-K	400,2660	+3	1198,7821	1198,6108
T12-T13	407,6092	+3	1220,8117	1220,6275
K-T2-T3	639,4770	+2	1277,9461	1277,7945
K-T2-T3	426,6590	+3	1277,9611	1277,7945
K-T12-T13	674,9399	+2	1348,8717	1348,7225
K-T12-T13	450,3039	+3	1348,8958	1348,7225
T4-T5	677,4386	+2	1353,8693	1353,7088
T4-T5	451,9681	+3	1353,8884	1353,7088
T5-T6	457,9620	+3	1371,8701	1371,6920
T5-T6	686,4164	+2	1371,8249	1371,6920
T9-T10	742,4502	+2	1483,8925	1483,7433
T9-T10	495,3136	+3	1483,9249	1483,7433
T7-T8	497,6866	+3	1491,0439	1490,8583
T9-T10-K	806,4953	+2	1611,9827	1611,8382
K-T9-T10	806,4953	+2	1611,9827	1611,8382
T7-T8-K	810,0591	+2	1619,1103	1618,9532
T7-T8-K	540,3860	+3	1619,1421	1618,9532
T21-T22	569,3449	+3	1706,0182	1705,7669
K-T21-T22	612,0291	+3	1834,0714	1833,8619
T19	985,0847	+2	1969,1615	1969,0044
T19	657,0887	+3	1969,2502	1969,0044
T19	493,0682	+4	1969,2489	1969,0044

	m gemessen	Ladung	m Fragment gemessen	m theoretisch
T19	394,6601	+5	1969,2687	1969,0044
T16-T17	661,7606	+3	1983,2659	1983,0374
T16-T17	992,1187	+2	1983,2295	1983,0374
T4-T5-T6	543,6008	+4	2171,3794	2171,0990
T4-T5-T6	724,4533	+3	2171,3440	2171,0990

Danksagung

Die abschließenden Worte möchte ich denen widmen, sie mich bei der Ausarbeitung dieser Arbeit unterstützt haben. Ich danke:

Herrn Prof. Otto,
der mir die Möglichkeit zu dieser Promotion gab und in den wöchentlich stattfindenden „CE-Meetings“ der Arbeit immer wieder neue Impulse gab. Damit sind nicht nur seine wissenschaftlichen Beiträge gemeint, sondern auch sein positive Lebenseinstellung, mit der er mich auch nach mehreren Misserfolgen immer wieder neu motivierte;

Frau Dr. Claußnitzer,
die mir vor allem bei der experimentellen Umsetzung der CE/ESI-MS-Kopplung mit Rat und Tat zur Seite stand und auch sonst bei auftretenden Problemen immer bereit war mit nach Lösungen zu suchen;

Herrn Prof. Friedbacher,
und seinem Arbeitskreis an der TU Wien, die zahlreiche Versuche unternahmen, den Innenkanal der beschichteten Kapillaren mit Hilfe der AFM sichtbar zu machen;

Herrn Dr. Seidel,
der die modifizierten Wafer atomkraftmikroskopisch untersuchte und mit mir gemeinsam auswertete;

Dem Institut für Anorganische Chemie,
welches mit seiner Ausrüstung und dem fachlichen Verständnis für die Synthese des Bromalkylsilans sorgte;

Der DFG,
für die finanzielle Unterstützung;

Meiner Familie,
die immer hinter mir stand und mich emotional wie auch finanziell unterstützte, was vor allem in den letzten Monaten des Zusammenschreibens sehr nötig war,

Allen Nichtgenannten,
die in einem Erfahrungsaustausch oder mit aufbauenden Worte ihren Beitrag zu dieser vorliegenden Dissertation geliefert haben.