

# **Pharmazeutische Chemie**

## **Bestimmung von Dinukleosid- polyphosphaten in Humanthrombozyten mittels Kapillarelektrophorese**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Martin Knobloch**

aus Lampertheim / Hessen

2002

Dekan:	Prof. Dr. V. Leute
Erster Gutachter:	Prof. Dr. G. Blaschke
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. M. Lehr
Tag der mündlichen Prüfung:	24., 25., 26. Juni 2002
Tag der Promotion:	26. Juni 2002

Die vorliegende Arbeit entstand am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von

***Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Gottfried Blaschke***

Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis,  
die interessante Themenstellung, seine großzügige finanzielle Unterstützung,  
die mir auch die Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen  
ermöglichte, und vor allem seine ständige Diskussionsbereitschaft. Meine  
Promotionszeit ist dadurch für mich zu einer sehr wertvollen Zeit geworden.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank

***Herrn Priv.-Doz. Dr. Hartmut Schlüter***

für zahlreiche kritische und anregende Diskussionen auf dem Gebiet der  
Dinukleosidpolyphosphate sowie für das zur Verfügung Stellen von Referenz-  
substanzen, Ionenaustauschern und Thrombozytenproben.

## ***Ein ganz herzliches Dankeschön***

an *Herrn Dr. Joachim Jankowski*, Freie Universität Berlin, für viele hilfreiche Tipps und fachliche Unterstützung auf dem Gebiet der Dinukleosidpolyphosphate, für die Gewinnung von Thrombozytenproben und für die Durchführung von HPLC- und MALDI-TOF-MS-Untersuchungen,

an *Frau Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinic* und *Herrn Marco Jovanovic*, Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster, für ihre Unterstützung bei der Durchführung von MALDI-TOF-MS-Messungen,

an *Frau Beate Tollkühn* für ihren Einsatz wenn es galt, Arbeitsmaterial und Arbeitsgeräte schnell und kostengünstig zu organisieren,

an *Frau Alwine Schulze-Elfringhoff* für ihre Unterstützung beim Arbeiten mit Thrombozytenproben und Buffy-Coats,

an *Frau Annemarie Erdt* und die *Herren Rolf Ulbrich, Eberhard Sachs* und *Martin Hiller* für die Unterstützung der Werkstatt bei zahlreichen größeren und kleineren Problemen im Verlaufe dieser Dissertation,

an *Herrn Heribert Wennemer* für seine fast schon legendären Fähigkeiten bei der Instandsetzung von elektrischen und elektronischen Geräten,

an meine *Kollegen bei der Betreuung der Praktika* für die gute Zusammenarbeit,

an *Frau Kirstin Ebert* für ihre engagierte und gewissenhafte Mitarbeit bei der Aufarbeitung der Thrombozytenproben sowie ihre Hilfsbereitschaft und ihren Ideenreichtum bei einer Vielzahl von anderen Problemen,

an *Herrn Dirk Schepmann* für seine Unterstützung bei der CE/MS-Kopplung, seine Mitarbeit bei der Wartung der Computersysteme und seine freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen,

an die *aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Blaschke* für viele anregende Diskussionen, Hilfen in vielerlei Weise und die schöne gemeinsame Zeit im Labor,

an *Frau Dr. Susanne Ding*, Biberach a. d. Riß, die mir während ihrer eigenen Assistentenzeit fachlich und persönlich stets ein Vorbild war und meine Begeisterung für die Pharmazeutische Chemie noch verstärkt hat,

an *alle, die hier nicht genannt sind*, aber dennoch auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

*Meinen Eltern*



# **Inhaltsverzeichnis**



<b>I. THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Eigenschaften und Pharmakologie .....</b>	<b>7</b>
2.1 Strukturen und Eigenschaften .....	7
2.2 Pharmakologie.....	10
<b>3 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Dinukleosidpolyphosphate.....</b>	<b>13</b>
3.1 Überblick .....	13
3.2 Schwach saure und neutrale Puffersysteme .....	13
3.2.1 Citrat-Puffer.....	14
3.2.1.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat .....	14
3.2.1.2 Guanosin-Derivate.....	24
3.2.1.3 Diadenosinhepta- und -octaphosphat .....	27
3.2.2 Phosphat-Puffer .....	34
3.2.2.1 Diadenosin-Verbindungen.....	34
3.2.2.2 Guanosin-Derivate.....	37
3.2.3 Acetat- bzw. Formiat-Puffer.....	39
3.2.4 Einsatz von mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren .....	40
3.2.4.1 Zielsetzung .....	40
3.2.4.2 Herstellung der Kapillaren .....	41
3.2.4.3 Ergebnisse .....	42
3.2.4.4 Zusammenfassung.....	46
3.2.5 Zusammenfassung der sauren und neutralen Puffersysteme.....	47
3.3 Alkalische Puffersysteme .....	48
3.3.1 Borat-Puffer.....	49
3.3.2 Carbonat-Puffer .....	54
3.3.2.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat .....	54
3.3.2.2 Guanosin-Derivate.....	62
3.3.2.3 Diadenosinhepta- und -octaphosphat .....	63
3.3.3 Validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in wässrigen Lösungen .....	64
3.3.4 Zusammenfassung alkalische Puffersysteme .....	68

---

3.4	Einsatz von Magnesium-Ionen als Komplexbildner.....	69
3.4.1	Carbonatpuffer.....	71
3.4.2	Citratpuffer .....	75
3.5	Versuche zur Empfindlichkeitserhöhung .....	78
3.5.1	Verbesserung der Detektion.....	78
3.5.2	Erhöhung der Substanzmenge in der Kapillare .....	80
3.6	Zusammenfassung der Methodenentwicklung .....	83
<b>4</b>	<b>Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in humanen Thrombozyten ....</b>	<b>85</b>
4.1	Isolierung der Dinukleotide aus der Probenmatrix .....	85
4.1.1	Gewinnung der Blutplättchen .....	85
4.1.2	Freisetzung der Zellbestandteile und Proteinfällung .....	86
4.1.3	Affinitätschromatographische Aufkonzentrierung der Dinukleotide .....	86
4.1.4	Entsalzung und Trocknung .....	88
4.2	Untersuchung von Thrombozyten-Konzentraten und <i>Buffy-Coats</i> .....	89
4.3	Bestimmung aus humanem Vollblut.....	99
4.3.1	Interner Standard.....	99
4.3.2	Validierung .....	104
4.3.2.1	Selektivität .....	104
4.3.2.2	Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	108
4.3.2.3	Präzision.....	111
4.3.2.4	Wiederfindung .....	112
4.3.2.5	Robustheit .....	113
4.3.2.6	Zusammenfassung .....	116
4.3.3	Untersuchung von Probandenblutproben.....	117
4.3.4	Vergleich von Normo- und Hypertonikerproben.....	121
<b>5</b>	<b>Anhang: Versuche zur CE/MS-Kopplung.....</b>	<b>125</b>
5.1	Einführung .....	125
5.2	Ergebnisse.....	127

---

<b>6</b>	<b>Anhang: Versuche zur Fluoreszenzderivatisierung</b> .....	<b>133</b>
6.1	Fluoreszierende Derivate.....	133
6.2	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion.....	134
6.3	ARGOS 250B-Fluoreszenzdetektor.....	136
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>139</b>
<b>II. EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....		<b>145</b>
<b>1</b>	<b>Allgemeines</b> .....	<b>147</b>
1.1	Geräte .....	147
1.1.1	Allgemeine Geräte.....	147
1.1.2	Kapillarelektrophorese .....	148
1.1.3	Hochdruck-Flüssigchromatographie .....	149
1.1.4	Massenspektrometrie.....	149
1.2	Reagenzien .....	150
1.3	Mono- und Dinukleotide .....	150
1.4	Allgemeine Methoden und Verfahrensweisen .....	152
1.4.1	Handhabung der Mono- und Dinukleotide.....	152
1.4.2	Kalibration des pH-Meters .....	152
1.4.3	Herstellung der Elektrophoresepuffer .....	153
1.4.4	Durchführung der Kapillarelektrophorese.....	153
<b>2</b>	<b>Kenngößen und Abkürzungen</b> .....	<b>155</b>
2.1	Kenngößen .....	155
2.1.1	Elektrophoretische Kenngößen.....	155
2.1.2	Massenspektrometrische Kenngößen.....	156
2.1.3	Statistische Kenngößen und Kenngößen der Validierung .....	156
2.2	Verwendete Abkürzungen.....	156

---

<b>3</b>	<b>Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Dinukleosidpolyphosphate .....</b>	<b>159</b>
3.1	Allgemeines .....	159
3.2	Schwach saure und neutrale Puffersysteme .....	159
3.2.1	Citratpuffer .....	159
3.2.1.1	Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat .....	159
3.2.1.2	Guanosin-Derivate .....	161
3.2.1.3	Diadenosinhepta- und octaphosphat .....	162
3.2.2	Phosphat-Puffer .....	163
3.2.2.1	Diadenosinverbindungen .....	163
3.2.2.2	Guanosin-Derivate .....	164
3.2.3	Acetat- bzw. Formiat-Puffer .....	164
3.2.4	Einsatz von mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren .....	164
3.2.4.1	Herstellung der Kapillaren .....	164
3.2.4.2	Ergebnisse .....	166
3.3	Alkalische Puffersysteme .....	168
3.3.1	Borat-Puffer .....	168
3.3.2	Carbonat-Puffer .....	169
3.3.2.1	Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat .....	169
3.3.2.2	Guanosin-Derivate .....	171
3.3.2.3	Diadenosinhepta- und -octaphosphat .....	171
3.3.3	Validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate aus wässrigen Lösungen .....	172
3.3.3.1	Bedingungen .....	172
3.3.3.2	Interner Standard .....	172
3.3.3.3	Bestimmte Dinukleotide .....	173
3.3.3.4	Kalibration .....	173
3.3.3.5	Präzision und Richtigkeit .....	176
3.4	Einsatz von Magnesium-Ionen als Komplexbildner .....	179
3.4.1	Carbonatpuffer .....	179
3.4.2	Citratpuffer .....	180
3.5	Versuche zur Empfindlichkeitserhöhung .....	181

---

<b>4</b>	<b>Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in humanen Thrombozyten..</b>	<b>183</b>
4.1	Isolierung der Dinukleotide aus der Probenmatrix.....	183
4.1.1	Gewinnung der Blutplättchen.....	183
4.1.1.1	Thrombozytenkonzentrate .....	183
4.1.1.2	<i>Buffy-Coats</i> .....	184
4.1.1.3	Humanes Vollblut.....	184
4.1.2	Freisetzung der Zellbestandteile und Proteinfällung.....	185
4.1.3	Selektive Aufkonzentrierung der Dinukleotide.....	186
4.1.4	Entsalzung und Trocknung.....	186
4.2	Untersuchung von Thrombozytenkonzentraten und <i>Buffy-Coats</i> .....	188
4.2.1	Kapillarelektrophoretische Bedingungen .....	188
4.2.2	Bedingungen für MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	189
4.3	Bestimmung aus humanem Vollblut .....	189
4.3.1	Interner Standard .....	189
4.3.1.1	NAD <sup>+</sup> .....	189
4.3.1.2	$\epsilon$ -Ap <sub>2</sub> A.....	190
4.3.2	Validierung.....	192
4.3.2.1	Selektivität.....	192
4.3.2.2	Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	192
4.3.2.3	Präzision .....	196
4.3.2.4	Wiederfindung.....	196
4.3.2.5	Robustheit.....	197
4.3.3	Untersuchung von Probandenblutproben .....	198
4.3.4	Vergleich von Normo- und Hypertonikerproben .....	199
<b>5</b>	<b>Versuche zur CE/MS-Kopplung .....</b>	<b>201</b>
5.1	Kapillarelektrophoretische Bedingungen .....	201
5.2	Massenspektrometrische Bedingungen .....	201
<b>6</b>	<b>Versuche zur Fluoreszenzderivatisierung.....</b>	<b>203</b>
6.1	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion.....	203
6.2	ARGOS 250B-Fluoreszenzdetektor .....	203
<b>III. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>205</b>



# **I. Theoretischer Teil**



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Dinukleosidpolyphosphate repräsentieren eine vielfältige und interessante Gruppe von extra- und intrazellulären Mediatoren mit Einfluss auf zahlreiche physiologische Funktionen.<sup>1</sup> Sie bestehen aus zwei Nucleosiden, die durch eine Polyphosphatkette unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind. Die Polyphosphatkette ist dabei über Esterbindungen mit den 5'-Hydroxygruppen der beiden Riboseeinheiten verknüpft. Die übliche Kurzschreibweise für diese Verbindungen ist  $Np_nN'$ , wobei N und N' für die verschiedenen Nucleoside und n für die Zahl der Phosphatgruppen stehen.

Innerhalb der großen Gruppe der Dinukleosidpolyphosphate bilden die Diadenosinpolyphosphate ( $Ap_nA$ ) eine Familie endogener Purindinucleotide. Aus natürlichen Quellen sind bis heute Diadenosinpolyphosphate mit einer Kette aus zwei bis sieben Phosphatgruppen bekannt. Als erster Vertreter wurde 1976 Diadenosintetraphosphat ( $Ap_4A$ ) durch RAPAPORT und ZAMECNIC in Säugetiergewebe (Hepatozyten) entdeckt.<sup>2</sup> FLOODGARD und KLENOW beschrieben 1982  $Ap_4A$  auch in humanen Thrombozyten.<sup>3</sup> Ein Jahr später konnten LÜTHJE und OGILVIE ebenfalls Diadenosintriphosphat ( $Ap_3A$ ) in humanen Blutplättchen nachweisen.<sup>4</sup> Zwei bis dahin unbekannte Vasopressoren aus Thrombozyten wurden 1994 durch SCHLÜTER und Mitarbeiter als Diadenosinpenta- bzw. -hexaphosphat ( $Ap_5A$  und  $Ap_6A$ ) identifiziert.<sup>5</sup> Einige Jahre später konnte schließlich Diadenosinheptaphosphat ( $Ap_7A$ ) durch JANKOWSKI und Mitarbeiter aus humanen Thrombozyten isoliert werden.<sup>6</sup> Der jüngste Vertreter dieser homologen Reihe ist Diadenosinpyrophosphat ( $Ap_2A$ ), das zuerst in humanem Herzgewebe entdeckt wurde<sup>7</sup>, mittlerweile aber auch in Thrombozyten nachgewiesen werden konnte.<sup>8</sup> Für die Monophosphatverbindung  $Ap_1A$  ist bisher kein natürliches Vorkommen bekannt.

In menschlichen Blutplättchen sind neben den Diadenosinpolyphosphaten mittlerweile auch die Adenosin-Guanosinpolyphosphate  $Ap_2G$  bis  $Ap_6G$  und die Diguanosinpolyphosphate  $Gp_2G$  bis  $Gp_6G$  beschrieben.<sup>8,9</sup> Darüber hinaus konnte mit  $Ap_6A$  auch die Existenz von Dinukleosidpolyphosphaten in humanen Erythrozyten nachgewiesen werden.<sup>10</sup>

Dinukleosidpolyphosphate werden in sezernierbaren Vesikeln in Thrombozyten, in menschlichem Herzgewebe, in chromaffinen Granula des Nebennierenmarks sowie in Synaptosomen gespeichert und können nach Aktivierung der verschiedenen Zellsysteme durch Degranulationsmechanismen und regulierte Exocytose in den Blut-

kreislauf abgegeben bzw. in interzelluläre Bereiche wie den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden.<sup>11</sup> Bezogen auf das Blutvolumen, aus dem die Thrombozyten gewonnen wurden, findet man die Diadenosinpolyphosphate in  $10^{-7}$  molaren Konzentrationen;<sup>12</sup> in den sekretorischen Granula hingegen liegen wesentlich höhere Konzentrationen im millimolaren Bereich vor.<sup>13</sup> Die nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzten Diadenosinpolyphosphate dürften deshalb lokal kurzfristig Konzentrationen im mikromolaren Bereich ( $10^{-5}$  mol/L) erlangen.<sup>11</sup> Die Konzentrationen der Diguanosin- bzw. Adenosin-Guanosinpolyphosphate sind bislang noch nicht bestimmt worden.

Aufgrund der ausgeprägten vasoaktiven Eigenschaften der Diadenosinpolyphosphate hat das Interesse an dieser Substanzklasse in den letzten Jahren stark zugenommen. Diadenosinpolyphosphate können den Gefäßtonus erhöhen oder senken.<sup>14</sup> Die jeweilige Wirkung ist dabei abhängig von der Zahl der Phosphatgruppen, der Gefäßart und der Vorbehandlung der Blutgefäße. Dieses uneinheitliche Verhalten kann durch die verschiedene Expression der Zielstrukturen der  $A_{P_n}A$ , der sog. Purinozeptoren, erklärt werden.<sup>11,14</sup> Es ist denkbar, dass die aus den Thrombozyten freigesetzten Diadenosinpolyphosphate aufgrund ihrer vasoaktiven Eigenschaften die essentielle Hypertonie fördern.<sup>5,14</sup> Darüber hinaus ist eine Rolle der Diadenosinpolyphosphate in der Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Plättchen und Endothel denkbar. Die Freisetzung der  $A_{P_n}A$  aus den Thrombozytenspeichern kann durch Plättchenaggregation induziert werden. Die Diadenosinpolyphosphate könnten als lokale parakrine Botenstoffe wirken und eine signifikante Rolle in der lokalen Regulation des Gefäßtonus spielen.<sup>5,14</sup>

Die Entwicklung verlässlicher und reproduzierbarer Bestimmungsmethoden für Diadenosinpolyphosphate wird zum einen erschwert durch deren relativ niedrige Konzentration in humanen Thrombozyten, zum anderen aber auch durch die Gegenwart der strukturell sehr ähnlichen Guanosinderivate und das Vorkommen der Adenosinmononukleotide in sehr viel größerer Menge. Die erste Bestimmung von  $Ap_4A$  basierte auf der Messung von ATP mittels eines Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz-Assay nach Spaltung von  $Ap_4A$  in ATP und AMP.<sup>15</sup> Später beschrieben IWATA und Mitarbeiter eine Methode zur chromatographischen Bestimmung von  $Ap_4A$  mit vorausgehender Fluoreszenzderivatisierung. Diadenosintetraphosphat wurde dabei mit Chloracetaldehyd in das fluoreszierende Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)adenosin-Derivat überführt.<sup>16</sup>

Mittlerweile sind in der Literatur chromatographische Methoden an *Reversed-Phase*-Materialien zur Bestimmung der Dinukleotide Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A in humanen Thrombozyten ohne vorherige Fluoreszenzderivatisierung beschrieben.<sup>12,14</sup> Da es sich bei den Dinukleosidpolyphosphaten um auch bei sauren pH-Werten mehrfach negativ geladene Moleküle handelt, ist in der RP-HPLC zur Erzielung einer ausreichenden Retention und damit Trennung die Verwendung von Ionenpaar-Reagenzien nötig. Eine vollständige Trennung der Analyten gelingt allerdings nur durch Gradientenelution. Mit dieser Technik konnten Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A innerhalb von 15 Minuten (JANKOWSKI und Mitarbeiter<sup>12</sup>) bzw. 45 Minuten (HOLLAH und Mitarbeiter<sup>14</sup>), zuzüglich ca. 15–20 Minuten für die Reäquilibration der Säule, bestimmt werden. Eine gleichzeitige Quantifizierung der Guanosinderivate ist bisher für Proben aus biologischen Matrices nicht beschrieben worden. Das für diese HPLC-Untersuchungen erforderliche Proben- und Injektionsvolumen liegt bei etwa 20 µL. Sollen danach weitere Untersuchungen an dieser Probe durchgeführt werden, ist das Auffangen des Eluates und die Reisolierung der Analyten erforderlich.

Die Extraktion der Dinukleosidpolyphosphate aus humanen Thrombozyten gliedert sich in mehrere Schritte: Nach Freisetzung der Analyten aus den intrazellulären Speichern durch Einfrieren und Wiederauftauen erfolgt zunächst eine Proteinfällung. Danach werden die Dinukleotide mittels einer Boronat-Affinitätschromatographie selektiv angereichert. Vor der chromatographischen Untersuchung ist außerdem eine Entsalzung des Eluates aus der Affinitätschromatographie erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate und – falls möglich – auch ihrer Guanosinderivate in humanen Thrombozyten mittels Kapillarelektrophorese zu entwickeln und zu validieren. Die so erhaltenen Ergebnisse sollten dann mit den bereits publizierten Daten aus chromatographischen Untersuchungen verglichen werden. Schwerpunkt der Untersuchungen bildeten die bei Beginn dieser Arbeit in Thrombozyten nachgewiesenen Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und deren Guanosinderivate; nach Identifizierung von Ap<sub>7</sub>A in humanen Blutplättchen 1999 wurde auch diese Verbindung in die Methodenentwicklung einbezogen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich die für die Chromatographie erforderliche zeit- und arbeitsaufwändige Probenvorbereitung bei der Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate aus biologischen Matrices vereinfachen lässt.

Der Einsatz der Kapillarelektrophorese ist in der Analytik von Nukleotiden und Nukleinsäuren weit verbreitet<sup>17</sup>, allerdings fanden sich zu Beginn dieser Arbeit keine Arbeiten auf dem Gebiet der Dinukleosidpolyphosphate.

In der Kapillarelektrophorese erfolgt die Trennung der Moleküle aufgrund ihres unterschiedlichen Ladungs-Masse-Verhältnisses. Dies stellt ein im Vergleich zur Chromatographie völlig anderes Trennprinzip dar. Aufgrund der Eigenladung der Analyten bei nahezu allen pH-Werten können einfache Puffersysteme verwendet werden; der Zusatz spezieller Additive wie in der Ionenpaar-HPLC ist nicht erforderlich. Selektivität und Trennleistung sind in der Kapillarelektrophorese für ionische Verbindungen in der Regel sehr hoch. Das zu einer Untersuchung benötigte Probenvolumen liegt in der Kapillarelektrophorese etwa bei 10  $\mu\text{L}$ , wovon jedoch nur wenige Nanoliter tatsächlich injiziert werden.

Damit bietet sich die Kapillarelektrophorese als orthogonales Verfahren zur Bestimmung von Dinukleosidpolyphosphaten an, da einerseits ein völlig anderer Trennmechanismus zu Grunde liegt, andererseits die Proben nach der kapillarelektrophoretischen Trennung aufgrund der extrem geringen Injektionsvolumina noch für eine flüssigchromatographische oder massenspektrometrische Untersuchung zur Verfügung stehen.

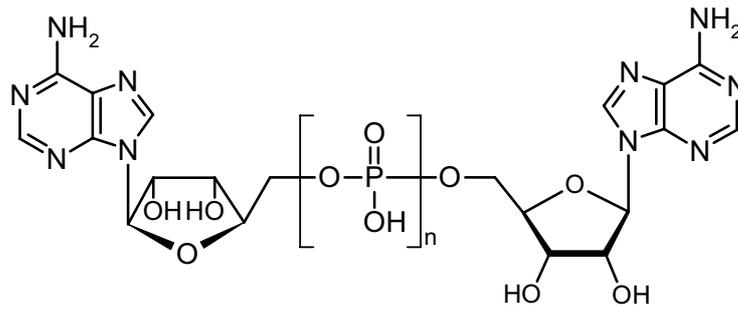
## 2 Eigenschaften und Pharmakologie

### 2.1 Strukturen und Eigenschaften

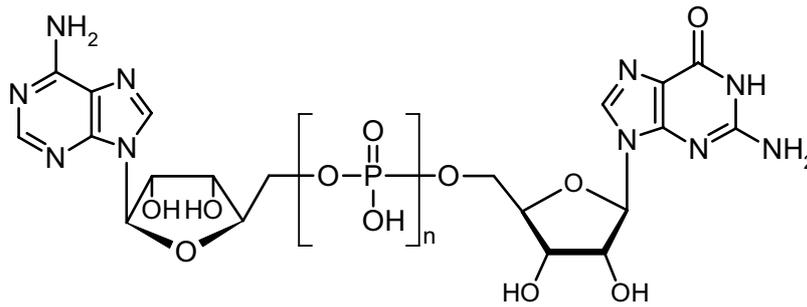
Allgemeiner chemischer Name für die in dieser Arbeit untersuchten  $\alpha,\omega$ -Dinukleotide ist Nukleosid-(5')-oligophospho-(5')-nukleosid oder Dinukleosid-(5',5''')-p<sup>1</sup>,p<sup>n</sup>-polyphosphat, abgekürzt Np<sub>n</sub>N'. Wie vorstehend beschrieben, bestehen diese Verbindungen aus zwei durch eine Polyphosphatkette miteinander verbundenen Nukleosiden N bzw. N'. Dieses sog. Phosphatrückgrat ist dabei über Esterbindungen mit den 5'-Hydroxygruppen der beiden Ribosemoleküle verknüpft. Die Zahl der Phosphatgruppen bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen variierte zwischen zwei und acht. In Abb. 2.1 sind die Strukturen der untersuchten Mono- und Dinukleotide mit undissoziierten Phosphatgruppen dargestellt. Am Beispiel der Adenosinmononukleotide ist außerdem auch die Bezifferung des Purinringes angegeben.

Die dreidimensionale Struktur der Dinukleosidpolyphosphate ist in den letzten Jahren mehrfach durch NMR- und CD/ORD-spektroskopische Methoden untersucht worden.<sup>18-22</sup> Danach kommt es bei diesen Verbindungen – wie auch bei Oligonukleotiden und Nukleinsäuren – zu einem sog. *Stacking* der Nukleobasen: Die Heterozyklen lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen parallel aneinander an. Dies zeigt sich u. a. in einer sog. Hypochromizität der Verbindungen: Die UV-Absorption einer Dinukleotidlösung ist aufgrund des Basenstackings niedriger als die einer doppelt so konzentrierten Mononukleotidlösung, d. h. einer Mononukleotidlösung mit gleicher Anzahl chromophorer Gruppen. Für Dinukleotide mit drei und mehr Phosphatgruppen soll dieses Stacking durch einen sog.  $\alpha/\alpha$ -Kontakt der Nukleobasen stattfinden – im Gegensatz zu den Polynukleotiden, wo ein sog.  $\alpha/\beta$ -Stacking beobachtet wird. Die sog.  $\alpha$ -Seite der Nukleobase ist dabei diejenige, die in der *anti*-Form auf die Hydroxygruppe an Pos. 2 der Ribose blickt. Für Ap<sub>2</sub>A wurde von HOLLER und Mitarbeitern ein  $\beta/\beta$ -Stacking angenommen.

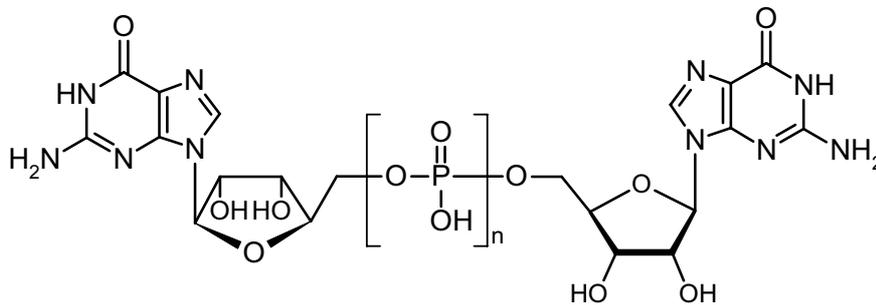
Das Ausmaß des Basenstackings hängt dabei unter anderem von der Länge der Phosphatkette ab: Während sich die Basen in Ap<sub>2</sub>A nahezu vollständig aneinanderlagern, nimmt das Stacking mit zunehmender Zahl an Phosphatgruppen ab bis auf einen Plateauwert von ca. 20–30 % für Ap<sub>6</sub>A. Dieses Verhalten wurde von HOLLER mit einer Zunahme der inneren Beweglichkeit der Moleküle erklärt – die abnehmende Spannung innerhalb der Moleküle durch die längere Phosphatkette erlaubt die Ausbildung neuer Konformationen.



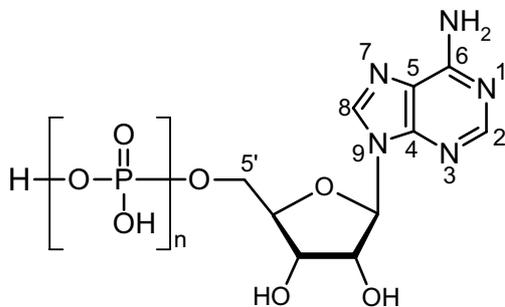
**Diadenosinpolyphosphate,  $Ap_n A$**



**Adenosin-Guanosinpolyphosphate,  $Ap_n G$**



**Diguanosinpolyphosphate,  $Gp_n G$**



$n = 1$  Adenosinmonophosphat, AMP

$n = 2$  Adenosindiphosphat, ADP

$n = 3$  Adenosintriphosphat, ATP

**Adenosinphosphate,  $Ap_n$**

Abb. 2.1 Strukturen der untersuchten Mono- und Dinukleotide

Die Anordnung der Basen zueinander zeigt eine Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Mediums. Während bei physiologischen pH-Werten das Basenstacking dominiert, konnten KOLODNY und Mitarbeiter nachweisen, dass bei pH 1–2 zumindest Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A kein nennenswertes Stacking der Basen zeigen und überwiegend in einer entfalteten Konformation vorliegen. Bei pH 4–5 dagegen nehmen diese beiden Verbindungen eine stark „gefaltete“ Konformation ebenfalls ohne nennenswertes Basenstacking ein. In dieser räumlichen Anordnung sind die Phosphatgruppen auf beiden Seiten durch die Adeninringe abgeschirmt.

Die verschiedenen Konformationen der Dinukleotide sind für die kapillarelektrophoretische Untersuchung insoweit von Bedeutung, als die Trennung der Analyten durch das Verhältnis von Ladung zu Stokes-Radius bestimmt wird. Der Stokes-Radius seinerseits hängt neben der Molekülmasse auch von der Konformation der Analyten ab. Kommt es also zu einer deutlichen Veränderung der Raumstruktur, sind Einflüsse auf das Migrationsverhalten zu erwarten bzw. Veränderungen des Migrationsverhaltens können durch eine veränderte Konformation der Analyten verursacht sein.

Die pK<sub>S</sub>-Werte der untersuchten Verbindungen sind in Tab. 2.1 zusammengefasst. Wie die Tabelle zeigt, sind Mono- und Dinukleotide bei pH-Werten > 1 negativ geladen. Zur Erzielung von Selektivität zwischen adenin- und guaninhaltigen Verbindungen bietet sich einerseits der pH-Bereich von 3–5 und andererseits der Bereich über pH 9,5 an. Bei schwach sauren pH-Werten sollte Adenin aufgrund der Protonierung an N<sup>1</sup> positiv geladen sein; im Alkalischen trägt Guanin aufgrund der Deprotonierung der Lactamstruktur eine negative Ladung.

	<b>Strukturelement</b>	<b>pK<sub>S</sub>-Wert</b>	<b>Referenz</b>
Adenin	N <sup>1</sup>	(3,6)	23
Guanin	C <sup>2</sup> -NH <sub>2</sub>	(2,4)	24
	N <sup>1</sup> -H	9,24	17
Phosphat	prim. OH	~ 1,5	17
	sek. OH	6,4	17
Ribose	C <sup>2</sup> -OH oder C <sup>3</sup> -OH	12,4	23

Tab. 2.1 pK<sub>S</sub>-Werte der Dinukleosidpolyphosphate; eingeklammerte Werte bezeichnen die pK<sub>S</sub>-Werte der zu einer basischen Struktur konjugierten Säure

Im Gegensatz zu den Mononukleotiden sind die Dinukleosidpolyphosphate wenig hydrolyseempfindlich. So war z. B. Ap<sub>4</sub>A in wässriger Lösung bei einer 6-stündigen Inkubation bei 80 °C weitgehend stabil.<sup>16</sup> Auch im Rahmen dieser Arbeit erwiesen sich die Dinukleotide als hydrolysestabil. Selbst bei mehrtägigem Aufbewahren von wässrigen Lösungen im Kühlschrank oder bei mehrstündigem Wärmeeinfluss auf dem ungekühlten Probenhalter der Kapillarelektrophorese-Systeme wurde nahezu kein Abbau beobachtet.

## 2.2 Pharmakologie

Aufgrund der Beobachtung, dass in Prokaryoten die intrazellulären Substanzkonzentrationen während verschiedener Stress-Stimuli steigen, erhielt die Gruppe der Dinukleosidpolyphosphate schon früh die Bezeichnung „Alarmon“ (= Alarm + Hormone). Diese Funktion als Alarmon ist möglicherweise ein Hinweis auf eine evolutionsgeschichtlich frühe Rolle als intrazellulärer Botenstoff. Im weiteren Verlauf der Evolution hat sich die Rolle als Botenstoff auf den extrazellulären Bereich ausgedehnt.

Wie bereits in Kap. 1 erläutert, werden die Dinukleosidpolyphosphate in sezernierbaren Vesikeln in Thrombozyten, menschlichem Herzgewebe, chromaffinen Granula des Nebennierenmarks sowie Synaptosomen gespeichert und nach Stimulation der entsprechenden Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dabei dürften lokal kurzfristig Konzentrationen im Bereich von 10<sup>-5</sup> mol/L erreicht werden. In den Vesikeln fungieren die Dinukleosidpolyphosphate vermutlich als Cotransmitter zu Adenosin-triphosphat.

Pharmakologisch betrachtet zählen die Dinukleosidpolyphosphate zur Gruppe der Purinozeptoragonisten, zu denen auch Adenosin, AMP, ADP, ATP sowie UDP und UTP gehören. Ihre Wirkungen werden sowohl über Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (P2X-Rezeptoren) als auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (P1- oder Adenosin- sowie P2Y-Rezeptoren) vermittelt. Daneben gibt es Hinweise für die Existenz von spezifischen Dinukleosidpolyphosphat-Rezeptoren. Diese gehören wahrscheinlich zur Familie der Rezeptor-gesteuerten Calcium-Kanäle.

Bis heute ist eine Vielzahl physiologischer Wirkungen der Dinukleosidpolyphosphate beschrieben worden.<sup>11</sup> Danach werden von dieser Substanzklasse beeinflusst:

- Herz-Kreislauf-System
- Nierenfunktionen
- Thrombozytenaggregation
- Stoffwechselfunktionen wie Glukoneogenese und Insulin-Sekretion
- Immunsystem
- Nervensystem
- Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose

Vor allem die Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate auf Elemente des Herz-Kreislauf-Systems wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei ist die Bedeutung dieser Verbindungen als Mediatoren im Herz-Kreislauf-System deutlich geworden.

In Blutgefäßen können Dinukleosidpolyphosphate sowohl Vasokonstriktionen als auch Vasodilatationen auslösen: Eine Stimulation der P2X-Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt eine Gefäßkontraktion, während die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren der Gefäßendothelzellen eine Erweiterung der Gefäße verursacht. Die Wirkung der Substanzen auf ein individuelles Gefäß ist dabei zum einen abhängig von der Länge der Phosphatkette und der Art der Nukleobasen. Daneben wird die Wirkung auch von der jeweiligen Expression der verschiedenen P2Y-Rezeptoren auf den Endothelzellen und dem Expressionsgrad der P2X-Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen bestimmt. Weiter spielt auch der Expressionsgrad abbauender Ektohydrolasen und die Präsenz löslicher, aus synaptischen Nervenzellen freigesetzter Nukleotidasen im extrazellulären Raum eine Rolle. Vergleicht man die vasokonstringierende Wirkung an der isolierten perfundierten Niere, so ergibt sich folgende Rangfolge:  $Ap_5A > Ap_5G \approx Ap_6A > Ap_6G > Ap_4A > Ap_4G \gg Gp_5G \approx Gp_6G > Gp_4G$ .<sup>11</sup> Vorkontrahierte Nierengefäße werden dagegen von  $Ap_2A$ ,  $Ap_3A$  und  $Ap_4A$  dilatiert.<sup>11</sup>

Dinukleosidpolyphosphate beeinflussen nicht nur den Gefäßtonus, sondern können auch das Wachstum von Mesangialzellen und glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren. Diese Wirkung ist dabei nicht wie bei der Vasokonstriktion und -dilatation nur auf Diadenosin- und Adenosin-Guanosinpolyphosphate beschränkt, sondern wird auch nach Inkubation der glatten Gefäßmuskelzellen mit Diguanosinpolyphosphaten beobachtet. Die stärkste wachstumsstimulierende Wirkung haben die Dinukleosidpolyphosphate mit fünf Phosphatgruppen ( $Ap_5A$ ,  $Ap_5G$ ,  $Gp_5G$ ).

Der Abbau der Dinukleosidpolyphosphate erfolgt durch eine Vielzahl von spezifischen und unspezifischen hydrolytischen Enzymen: Die Endothelzellen der Gefäße exprimieren eine Reihe von Nukleotidasen, die auch die Dinukleosidpolyphosphate hydro-

lysieren können. Da diese Enzyme in der äußeren Zellwand fixiert sind, werden sie auch als Ektonukleotidasen bezeichnet. Bei diesem Abbau handelt es sich in der Regel um eine asymmetrische Spaltung der Polyphosphatkette nach dem Prinzip  $Np_nN' \Rightarrow NMP + N'p_{n-1}$ . Der Abbau der Hydrolyseprodukte durch sukzessive Abspaltung der Phosphatgruppen wird durch weitere Nukleotidasen wie z. B. die unspezifische alkalische Phosphatase katalysiert. Endprodukt des hydrolytischen Abbaus ist in der Regel Adenosin. Im menschlichen Blut ist die Lebensdauer der Dinukleosidpolyphosphate im Vergleich zu ATP (Halbwertszeit  $< 1$  min) mit einer Halbwertszeit von 17 min wesentlich höher.<sup>25</sup>

Das purinerge Hormonsystem ist durch die Vielzahl endogener Agonisten und Rezeptoren sehr komplex und wird durch die Eigenschaft der Gefäßzellen, gleichzeitig mehrere unterschiedliche Purinozeptorsubtypen zu exprimieren, weiter kompliziert. So können Endothelzellen  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  und  $P2Y_6$ -Rezeptoren exprimieren. Dieses Expressionsmuster kann sich bei Bedarf außerdem schnell verändern. Weiter vervielfacht sich die Komplexität des purinergen Systems durch die enzymatische Spaltung der Mono- und Dinukleotide direkt am Wirkort. Die entstehenden Metabolite – Mononukleotide wie zum Beispiel AMP, ADP und ATP sowie Adenosin – können ihrerseits wieder verschiedene Purinozeptoren aktivieren. In der Summe ergibt sich hieraus ein Signalsystem, das weitaus komplexer ist als die bisher bekannten Hormonsysteme.

Vor allem ATP galt lange Zeit als der wichtigste Agonist des purinergen Systems. Die in den Thrombozyten im Vergleich zu ATP niedrigere Konzentration der Dinukleosidpolyphosphate wird durch deren viel langsamere Metabolisierung wettgemacht, so dass die Dinukleosidpolyphosphate nach Sezernierung aufgrund ihrer Stabilität über einen längeren Zeitraum eine effektive Wirkkonzentration erreichen. Diese Eigenschaften geben den Dinukleosidpolyphosphaten eine vergleichbar wichtige Stellung als Purinozeptoragonisten wie dem ATP.<sup>11</sup>

Der bei Hypertonikern erhöhte Gefäßtonus könnte durch erhöhte extrazelluläre Konzentrationen der vasokonstringierend wirksamen Purinozeptoragonisten erklärbar sein, zu denen  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  zählen. Daneben kommen aber auch andere Möglichkeiten in Betracht, wie z. B. vermehrte Expression von  $P2X$ - oder verminderte Expression von endothelialen  $P2Y$ -Rezeptoren oder ein verändertes, die Halbwertszeiten vasokonstringierender Purinozeptoragonisten verlängerndes Expressionsmuster der Hydrolasen.<sup>11</sup>

## 3 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Dinukleosidpolyphosphate

### 3.1 Überblick

In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung von Trennmethoden für Diadenosinpolyphosphate ( $Ap_nA$ ) und ihre Guanosinderivate ( $Ap_nG$ ,  $Gp_nG$ ) mittels Kapillarelektrophorese beschrieben. Dabei wurde nach dem verwendeten pH-Bereich (schwach sauer bis neutral bzw. alkalisch) und innerhalb der pH-Bereiche nach der Art des verwendeten Puffersystems unterteilt. Außerdem werden Versuche zum Einsatz von  $Mg^{2+}$  als Beispiel eines komplexbildenden Pufferzusatzes dargestellt.

Um die Methodenentwicklung mit einer solchen Vielzahl von Analyten handhabbar zu gestalten, wurde zunächst das Verhalten der Diadenosinpolyphosphate  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  sowie der Adenosinphosphate AMP / ADP / ATP untersucht, da es sich hierbei um die primär interessierenden Analyten handelt. Trennsysteme, in denen eine Auftrennung dieser Analyten gelang, wurden in einem zweiten Schritt mit den zur Verfügung stehenden Guanosinderivaten (in der Regel  $Ap_2G$  bis  $Ap_6G$ ,  $Gp_2G$  und  $Gp_6G$ ) getestet. Nachdem zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit auch Diadenosinhepta- und -octaphosphat ( $Ap_7A$  bzw.  $Ap_8A$ ) verfügbar wurden, konnten abschließend die bis dahin entwickelten Methoden auch auf ihre Selektivität bezüglich dieser neuen Analyten untersucht werden.

### 3.2 Schwach saure und neutrale Puffersysteme

Sowohl die Mono- als auch die Dinukleosidphosphate liegen im sauren und neutralen pH-Bereich aufgrund der dissoziierten Phosphatgruppen als Anionen vor, d. h. sie migrieren entgegen den EOF. Da der EOF unterhalb pH 5–6 noch relativ schwach ausgeprägt ist<sup>26</sup> und so die Migration der Analyten zur Anode nicht kompensieren kann, wurde die Kapillarelektrophorese in Reverspolung durchgeführt. Hierbei erfolgt die Probenaufgabe an der Kathoden-, die Detektion an der Anodenseite der Kapillare.

Da bei dieser Versuchsführung  $\mu_{EOF}$  und damit auch die effektive Mobilität  $\mu_{eff}$  der Analyten nicht bestimmt werden können, wird im folgenden die scheinbare Mobilität  $\mu_{app}$  zur Charakterisierung des Migrationsverhaltens der Analyten herangezogen.

### 3.2.1 Citrat-Puffer

Citronensäure ist eine dreibasige Säure mit den  $pK_S$ -Werten 3,1, 5,9 und 6,4.<sup>26</sup> Dadurch besitzt sie in einem breiten pH-Bereich von 2 bis etwa 7 ausreichende Pufferkapazität. Das Citrat-Anion weist bereits bei pH-Werten  $> 4$  eine hohe negative Ladungsdichte und damit auch eine hohe elektrophoretische Mobilität auf. Dies ist besonders zur Trennung mehrfach geladener Anionen wie der (Di-)Nukleosidphosphate vorteilhaft, da zur Erzielung hoher Trennleistungen und symmetrischer Peakformen die Mobilität von Puffer- und Probenionen weitgehend übereinstimmen müssen.<sup>27</sup> Auf der anderen Seite kommt es durch die hohe Leitfähigkeit und die daraus resultierenden hohen Ströme von Citrat-Puffern auch zu einer starken Wärmeentwicklung während der Trennung, so dass der Einsatz hoher Feldstärken nur begrenzt möglich ist. Außerdem müssen wegen der geringen mikrobiologischen Stabilität von Citronensäure die Pufferlösungen im Kühlschrank aufbewahrt und spätestens nach zwei bis drei Tagen verworfen werden.

#### 3.2.1.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Migrationsverhalten dieser Substanzen in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht. Abb. 3.1 zeigt die scheinbaren Mobilitäten  $\mu_{app}$  von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  sowie von ADP und ATP in einem 50 mM-Citratpuffer im pH-Bereich von 2,8 bis 6,75. Die Mobilität von AMP hat aufgrund der geringeren negativen Ladung einen deutlich positiveren, d. h. näher bei Null liegenden Wert als  $Ap_2A$ , so dass AMP in der gewählten Laufzeit nicht detektiert werden konnte.

Die Trennung der Dinukleotide untereinander und von den Mononukleotiden gelingt bei pH-Werten von 4,25 und höher. Der Betrag der scheinbaren Mobilität erreicht für alle Analyten bei pH 4,75 sein jeweiliges Maximum. Unterhalb dieses pH-Wertes erhöhen sich die Migrationszeiten durch die zunehmende Protonierung des Adeninrestes ( $pK_S$  3,6<sup>23</sup>), bei höheren pH-Werten werden die Wirkung des gegenläufigen EOF und die dadurch bedingte Migrationszeitverlängerung zunehmend sichtbar. Für die Gruppe der Dinukleotide und für ATP ist im Bereich von pH 4,25 bis 6,75 keine Änderung der Migrationsreihenfolge erkennbar, lediglich ADP zeigt oberhalb eines pH-Wertes von 5,75 eine schwächere Abnahme der scheinbaren Mobilität als die anderen Verbindungen. Dieses Verhalten kann mit den weitgehend identischen Säure-Base-Eigenschaften aller Adenosinmono- und -dinukleotide erklärt werden.

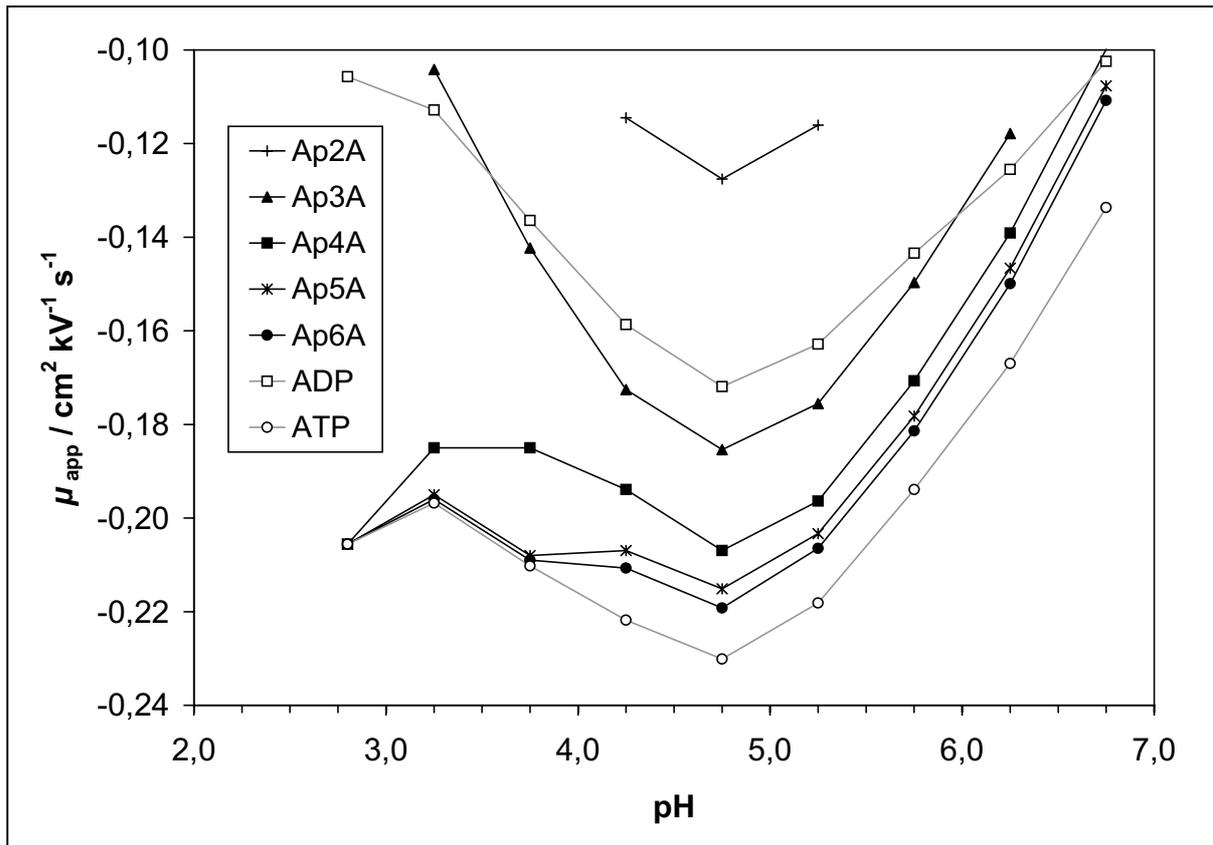


Abb. 3.1 Scheinbare Mobilitäten von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes  
(Citratpuffer 50 mmol/L, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)

Weiter wird aus Abb. 3.1 deutlich, dass die Mobilitätsdifferenzen zwischen den homologen Dinukleotiden von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A immer kleiner werden. Dies ist aus dem Trennmechanismus der Kapillarzonenelektrophorese herzuleiten. Das unterschiedliche Migrationsverhalten der Analyten – ausgedrückt durch  $\mu_{\text{app}}$  – basiert hier auf unterschiedlichen Verhältnissen von Ladung zu Molekülgröße. Maß für die Molekülgröße ist der sog. hydrodynamische oder Stokes-Radius, der sich ungefähr proportional zur Molekülmasse verhält. Das Migrationsverhalten kann damit näherungsweise durch das Verhältnis von Ladung zu Molekülmasse der Analyten (hier als Ladungs-Masse- oder  $q/m$ -Verhältnis bezeichnet) beschrieben werden. Mit zunehmender Anzahl der Phosphatgruppen im Molekül wird das Ladungs-Masse-Verhältnis zwar immer größer, d. h. die Moleküle migrieren immer schneller in Richtung der Anode, allerdings werden die Differenzen der  $q/m$ -Verhältnisse und damit auch die Mobilitätsdifferenzen homologer Verbindungen immer kleiner. Abb. 3.2 verdeutlicht diesen Zusammenhang graphisch. Die dort dargestellten  $q/m$ -Werte wurden unter Verwendung der bekannten Molekülmasse und der Gesamtladung der Moleküle berechnet. Vereinfachend wurde dabei

angenommen, dass die Phosphatgruppen vollständig ionisiert sind. Da dies im schwach sauren bis neutralen Milieu nicht der Fall sein wird, sind die Differenzen der  $q/m$ -Verhältnisse sicher größer dargestellt, als dies unter den Bedingungen der Abb. 3.1 der Fall ist. Außerdem dürfte die Zunahme des Stokes-Radius als Funktion der Phosphatkettlänge nicht einer einfachen Proportionalität zur Molekülmasse folgen. Die Verlängerung des Polyphosphat-Rückgrats vergrößert nämlich zugleich die abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den negativen Ladungen der Phosphatkette. Damit sollten sich die Polyphosphatketten in einer zunehmend raumerfüllenden Konformation anordnen.<sup>28</sup> Die Zunahme des Stokes-Radius ist damit bei den länger-kettigen Verbindungen größer, die Differenz der  $q/m$ -Verhältnisse kleiner als aufgrund der Massenzunahme erwartet.

Sollten die durch das Ladungs-Masse-Verhältnis bedingten Mobilitätsunterschiede bei länger-kettigen Verbindungen als  $\text{Ap}_6\text{A}$  für eine Trennung nicht mehr ausreichend sein, erlaubt der Trennmechanismus der Kapillaronoelektrophorese allerdings keine weitere Steigerung der Selektivität durch Änderung von pH-Wert bzw. Ionenstärke des Puffers oder der elektrischen Feldstärke. Eine Trennung könnte dann nur durch Einführung weiterer Selektivitätskriterien, z. B. durch Einsatz von Komplexbildnern (s. Kap. 3.4) oder Verwendung gelgefüllter Kapillaren mit Siebeffekt, ermöglicht werden.

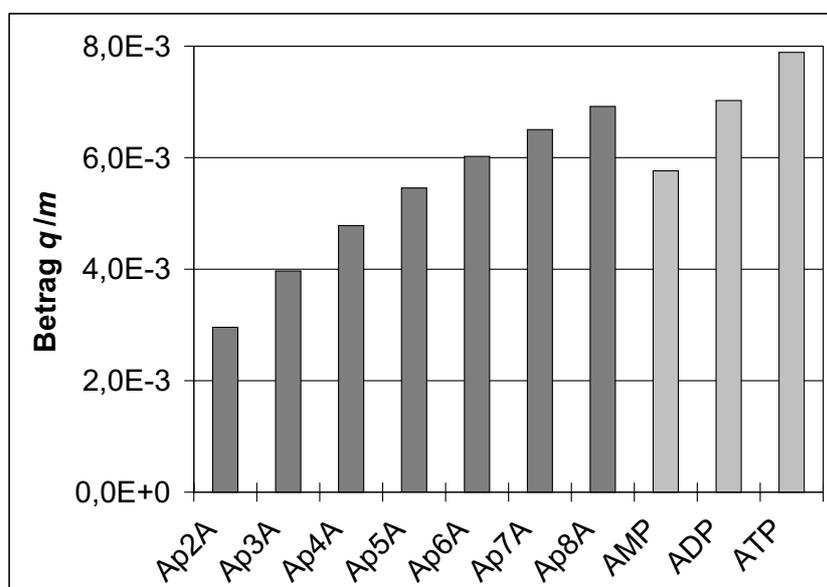


Abb. 3.2 Ladungs-Masse-Verhältnis ( $q/m$ -Verhältnis) für  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_8\text{A}$  und AMP / ADP / ATP unter Annahme vollständiger Ionisierung der Phosphatgruppen

In Abb. 3.3 sind die Auflösung des am schwierigsten zu trennenden Peakpaares  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  sowie der Trennleistungsparameter  $N$  dieser beiden Analyten in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Während die Auflösung für alle pH-Werte zwischen 4,75 und 6,75 größer als 1,5 ist, d. h. die beiden Analyten vollständig getrennt sind, erreicht der Trennleistungsparameter bei pH 5,25–5,75 sein Maximum. Dieser pH-Bereich ist also für die Trennung von Diadenosindi- bis Diadenosinhexaphosphat am besten geeignet. Da sich aber die scheinbaren Mobilitäten oberhalb pH 4,75 wieder in Richtung positiver Werte bewegen (s. Abb. 3.1) und die Migrationszeiten vor allem für  $Ap_2A$  damit deutlich länger werden, stellt pH 5,25 den besten Kompromiss aus Auflösung, Trennleistung und möglichst kurzer Analysendauer dar.

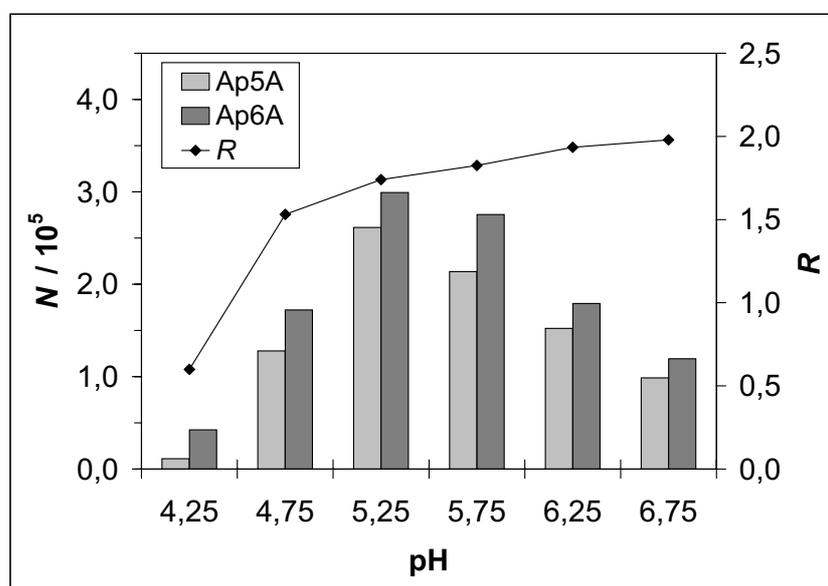


Abb. 3.3 Auflösung und Trennleistungsparameter von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes  
(Bedingungen wie Abb. 3.1)

Die Ionenstärke des Trennpuffers hat sowohl Einfluss auf die Trennleistung als auch auf die Auflösung. Wie Abb. 3.4 zeigt, nimmt die Trennleistung mit steigender Konzentration des Puffers zu, da die durch Elektrodipersion verursachte Peakverbreiterung von den Pufferionen immer stärker unterdrückt wird. Andererseits nimmt die Auflösung – hier wieder exemplarisch am kritischen Peakpaar  $Ap_5A / Ap_6A$  betrachtet – mit zunehmender Ionenstärke des Puffers ab. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der zunehmenden Unterdrückung des EOF zu suchen: Mit abnehmendem  $\mu_{EOF}$  wird  $\mu_{app}$  der Analyten zunehmend negativer, d. h. die Migrationszeiten verkürzen sich und die relativen Mobilitätsunterschiede zwischen den Analyten werden immer

kleiner. Als Kompromiss zwischen Trennleistung und Auflösung wurde eine Pufferkonzentration von 50 mmol/L verwendet.

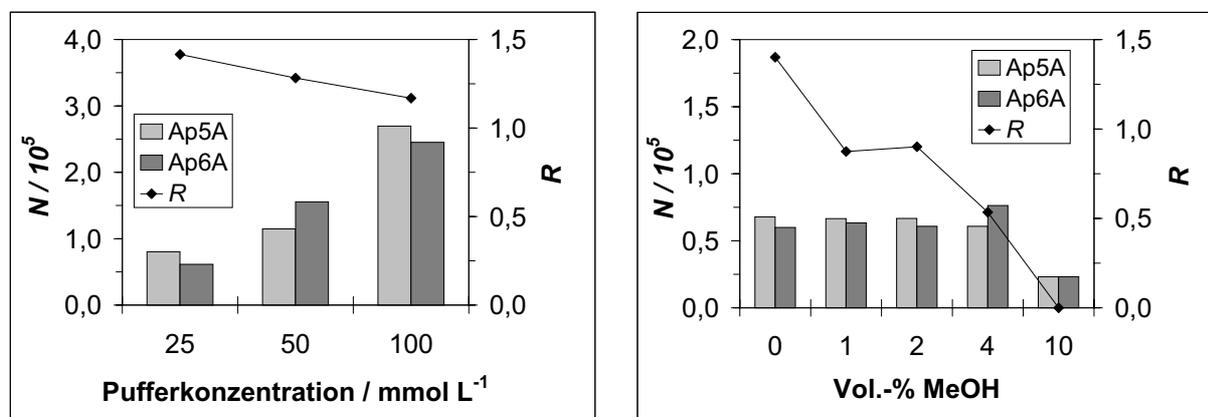


Abb. 3.4 Auflösung und Trennleistungsparameter von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit der Pufferkonzentration (links) bzw. des Methanolgehaltes im Puffer (rechts) (Citratpuffer pH 4,75, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV; Pufferkonzentration bei Variation des Methanolgehaltes 50 mmol/L)

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von organischen Pufferzusätzen – hier Methanol – auf die Trennleistung untersucht. Solche sog. Modifier beeinflussen die Polarität und die Viskosität des Puffers. In der Folge werden sowohl der EOF als auch die elektrophoretische Mobilität der Analyten verändert. Der Gesamteffekt eines solchen Zusatzes ist schwierig vorherzusagen. Im allgemeinen scheint Methanol die Mobilität zu erhöhen und Mobilitätsunterschiede zu verstärken,<sup>26</sup> während der Einfluss auf den EOF in Abhängigkeit der gewählten Konzentration sowohl hemmend als auch fördernd sein kann.<sup>27</sup> In Abb. 3.4 sind Trennleistung und Auflösung – wieder beispielhaft für Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A – in Abhängigkeit des Methanolgehaltes dargestellt. Es ist erkennbar, dass mit steigendem Methanolzusatz die Auflösung zunehmend geringer wird, bis bei 10 Vol.-% Methanol Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A komigrieren. Die Trennleistung ist bis zu 4 Vol.-% Methanol näherungsweise konstant, nimmt bei höheren Methanolgehalten allerdings deutlich ab. Nach diesen Befunden wurde auf den Zusatz von Methanol zum Trennpuffer verzichtet, da er keine Vorteile erbrachte.

Der Einfluss der Kapillartemperatur wurde im Bereich von 15–25 °C untersucht (Daten nicht gezeigt). Mit zunehmender Temperatur kam es zu einer Verkürzung der Migrationszeiten und zur Abnahme der Auflösung. Die Temperaturerhöhung bewirkt dabei eine Viskositätserniedrigung des Trennmediums und somit eine Erhöhung so-

wohl von  $\mu_{\text{EOF}}$  als auch von  $\mu_{\text{eff}}$  der Analyten. Da mit steigender Temperatur die scheinbaren Mobilitäten zunehmend negativer werden, scheint der Einfluss auf  $\mu_{\text{eff}}$  stärker ausgeprägt zu sein. Aus der Sicht der Methodenentwicklung ist daher eine möglichst niedrige Kapillartemperatur wünschenswert. Bauartbedingt erreichen die verwendeten Beckman-CE-Geräte allerdings nur Kapillartemperaturen von max. 5 °C unterhalb der Raumtemperatur. Für alle weiteren Experimente wurde daher eine Temperatur von 20 °C gewählt, um auch an wärmeren Tagen in dem nicht klimatisierten Labor bei gleicher Kapillartemperatur messen zu können.

Abb. 3.5 zeigt eine Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  und der Mononukleotide ADP und ATP unter den bisher am besten geeigneten Versuchsbedingungen. AMP ist mit einer Migrationszeit von mehr als 10 Minuten nicht mehr im Elektropherogramm dargestellt. Das Migrationsmuster der Dinukleotide ( $\text{Ap}_6\text{A}$ ,  $\text{Ap}_5\text{A}$ ,  $\text{Ap}_4\text{A}$ ,  $\text{Ap}_3\text{A}$ ,  $\text{Ap}_2\text{A}$ ) entspricht dem in dieser Reihenfolge abnehmenden  $q/m$ -Verhältnis der Moleküle (vgl. Abb. 3.2). Die Migrationsreihenfolge der Mononukleotide (ATP, ADP, AMP) folgt den gleichen Gesetzmäßigkeiten und ist so bereits auch in anderen schwach sauren Puffersystemen beobachtet worden.<sup>29-31</sup>

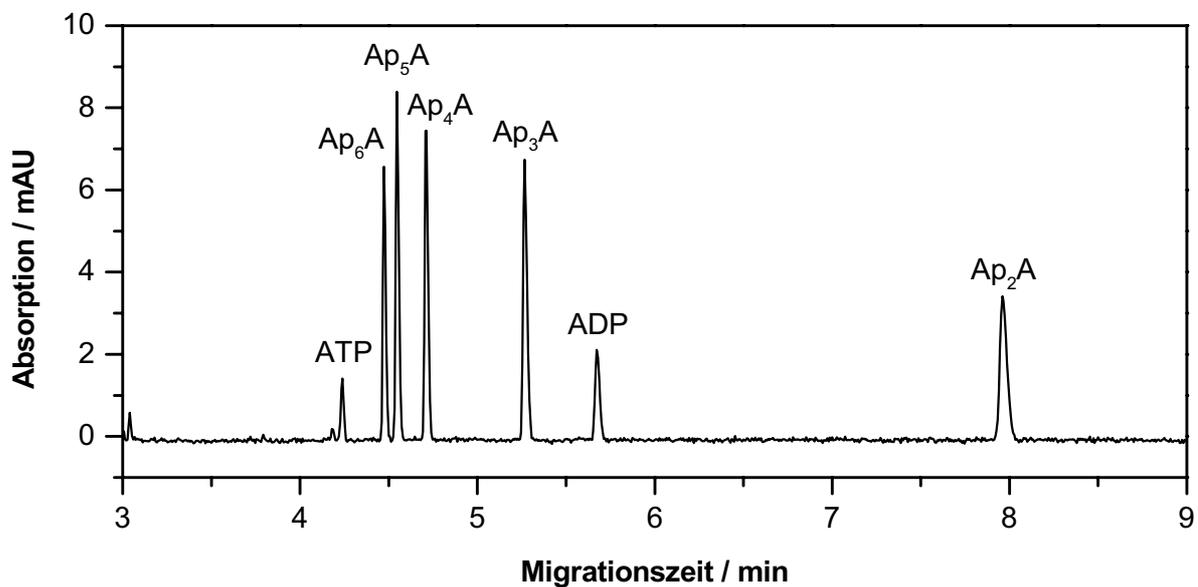


Abb. 3.5 Elektropherogramm einer Mischung aus  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  und ADP / ATP (Citratpuffer 50 mmol/L, pH 5,25, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)

Ein besonderes Problem beim Arbeiten in pH-Bereichen von 4 bis 7 ist das Erreichen eines konstanten, reproduzierbaren EOF. Vor allem bei Puffer-pH-Werten um 5 ist die pH-Abhängigkeit des EOF am stärksten ausgeprägt.<sup>26</sup> Außerdem zeigt der EOF bei einem zyklischen Pufferwechsel eine Hystereseerscheinung. Die größten Abweichungen treten dabei im pH-Bereich in der Nähe des  $pK_S$ -Wertes der Kieselsäure auf.<sup>27</sup> Schwankungen des EOF treten besonders deutlich zu Tage, wenn – wie es hier der Fall ist – mit Anionen in Reverspolung gearbeitet wird: Selbst kleine Unterschiede in  $\mu_{EOF}$  äußern sich in deutlichen Migrationszeitverschiebungen, die umso stärker ausfallen, je länger die Migrationszeit des jeweiligen Teilchens ist. Für reproduzierbares Arbeiten in unbelegten Kapillaren ist es daher erforderlich, die Spül- und Konditionierungszeiten der Kapillare zu standardisieren. Bei der Betrachtung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten muss außerdem zwischen der sog. *intraday*- (d. h. von Lauf zu Lauf innerhalb eines Tages) und der sog. *interday*- (d. h. Läufe an verschiedenen Tagen) Reproduzierbarkeit unterschieden werden.

In Tab. 3.1 sind die Migrationszeiten von  $Ap_6A$  (= Analyt mit kurzer Migrationszeit) und  $Ap_2A$  (= Analyt mit langer Migrationszeit) in Abhängigkeit der zwischen den Läufen angewendeten Spülmethode dargestellt. Der Spülvorgang mit Natronlauge und Puffer zeigt dabei die schlechteste *intraday*-Präzision (ausgedrückt durch die relative Standardabweichung der Migrationszeiten) – hier sind die pH-Unterschiede zwischen Puffer und Spüllösung am größten. Außerdem nehmen die Migrationszeiten von Lauf zu Lauf ständig zu. Umgekehrt sieht es bei der Verwendung eines Spülschrittes mit Phosphorsäure aus. Hier werden die Migrationszeiten von Lauf zu Lauf kürzer. Die Präzision ist jedoch etwas besser als beim Spülschritt mit Natronlauge. Die beste Reproduzierbarkeit zeigt ein nur aus Wasser und Puffer bestehender Spülschritt, da die pH-Unterschiede zwischen Elektrophorese und Spülen hier nur minimal sind. Bei allen drei Spülmethode lässt sich die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten deutlich verbessern, wenn anstelle der absoluten Migrationszeit die *relative* Migrationszeit, d. h. Migrationszeit bezogen auf eine Standardsubstanz, betrachtet wird. Dieses Vorgehen ist in Tab. 3.1 beispielhaft für  $Ap_2A$  dargestellt, dessen Migrationszeit auf  $Ap_6A$  (relative Migrationszeit 1) bezogen wurde.

Spülschritte	Lauf	Ap <sub>6</sub> A		Ap <sub>2</sub> A	
		MZ	rel. MZ	MZ	rel. MZ
2 min 0,1 M-NaOH / 3 min Puffer	1	4,23	1,00	7,96	1,88
	2	4,23	1,00	7,95	1,88
	3	4,25	1,00	8,03	1,89
	4	4,28	1,00	8,09	1,89
	5	4,29	1,00	8,12	1,90
	SDV	0,03		0,08	0,01
	<b>relSDV%</b>	<b>0,63</b>		<b>0,98</b>	<b>0,38</b>
5 min 0,1 M-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / 5 min H <sub>2</sub> O / 5 min Puffer	1	4,17	1,00	7,09	1,70
	2	4,16	1,00	7,06	1,70
	3	4,15	1,00	7,03	1,69
	4	4,13	1,00	6,98	1,69
	5	4,12	1,00	6,96	1,69
	SDV	0,02		0,05	0,00
	<b>relSDV%</b>	<b>0,52</b>		<b>0,75</b>	<b>0,24</b>
5 min H <sub>2</sub> O / 5 min Puffer	1	4,11	1,00	6,94	1,69
	2	4,12	1,00	6,97	1,69
	3	4,12	1,00	6,97	1,69
	4	4,12	1,00	6,95	1,69
	SDV	0,01		0,01	0,00
	<b>relSDV%</b>	<b>0,13</b>		<b>0,21</b>	<b>0,09</b>

Tab. 3.1 Migrationszeiten (MZ) für Ap<sub>2</sub>A und Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit der Spülmethode zwischen aufeinander folgenden Läufen (Citratpuffer 50 mmol/L pH 4,75, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)

Allerdings erlaubt eine gute *intraday*-Präzision noch keine Aussage über das *interday*-Verhalten. Vor allem nach dem Einbau einer neuen Kapillare erwies es sich als notwendig, die Kapillare für mehrere Minuten mit 1 M-NaOH zu spülen, um die Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche zu aktivieren. Ohne einen solchen Aktivierungsschritt war der EOF für eine effektive Trennung der Analyten zu schwach: Die Migrationszeiten waren zu kurz, um eine vollständige Trennung vor allem von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A zu ermöglichen. Obwohl die Kapillare nach einem solchen Spülschritt ausgiebig mit Puffer gespült und für 10–15 min mit angelegter Spannung betrieben wurde, waren die Migrationszeiten deutlich verlängert. Ähnlich verhielt es sich, wenn eine Kapillare nach Lagerung über Nacht wieder in Betrieb genommen wurde: Selbst nach ausgie-

bigen Spülvorgängen und mehreren Läufen unter Trennbedingungen unterschieden sich die Migrationszeiten zum Teil erheblich von denen des Vortages. Um das Problem zumindest weitgehend in den Griff zu bekommen, wurde für die weiteren Versuche mit Citrat-Puffern die Kapillare nach dem Einbau und am Beginn jedes Tages mit 1 M-NaOH, gefolgt von Trennpuffer, gespült. Anschließend wurde für mehrere Minuten eine Trennspannung angelegt. Als Spülschritt zwischen den einzelnen Läufen wurde 0,1 M-NaOH, gefolgt von Trennpuffer, verwendet. Dieses Verfahren lieferte zwar nach Tab. 3.1 die schlechteste *intraday*-Präzision, erwies sich aber im Hinblick auf Trennleistung und *interday*-Reproduzierbarkeit vorteilhaft. Ein Kontakt der Kapillare mit sauren Spültreagenzien wie z. B. Phosphorsäure wurde strikt vermieden, weil danach der EOF auch nach längerem Spülen mit Natronlauge seine alte Stärke nicht wieder erreichte. Außerdem wurden – falls erforderlich – die relativen Migrationszeiten für die Peakidentifizierung verwendet.

Am Rande sei das Auftreten eines störenden konzentrationsabhängigen Peaksplittings erwähnt: Überstieg die Probenmenge in der Kapillare einen bestimmten kritischen Wert, unabhängig ob durch Verlängerung der Injektionszeit oder Erhöhung der Probenkonzentration bei gleichbleibender Injektionsdauer, kam es zu einer drastischen Verschlechterung der Peakform und weiter zur Aufspaltung der Peaks. Dieses Verhalten wurde stets zuerst bei  $Ap_4A$  beobachtet, bei Erhöhung der injizierten Substanzmenge waren auch  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  betroffen; bei  $Ap_2A$  und  $Ap_3A$  trat dieses Phänomen nicht auf. Beispiele sind in Abb. 3.6 dargestellt.

Das Auftreten dieses Peaksplittings war an einen pH-Wert nahe 4,75 geknüpft. Bereits eine leichte Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 verhinderte das Splitting vollständig.

Ein solches Peaksplitting wurde bereits in dieser Arbeitsgruppe bei der Trennung schwach saurer phenolischer Arzneistoffe wie Paracetamol in Borat-Puffern beobachtet.<sup>32</sup> Lag dabei der Puffer-pH nahe am  $pK_S$ -Wert, d. h. wiesen die Analyten nur eine geringe Eigenmobilität auf, kam es ebenfalls zu einer Aufspaltung der Analytensignale. Allerdings wurde dort, anders als bei den Polyphosphaten, *keine* Abhängigkeit von der Analytenkonzentration in der Kapillare beobachtet. Dieses Peaksplitting ist als Grenzflächenphänomen, begründet in unterschiedlichen Borat-Konzentrationen der Proben- und Pufferzone, interpretiert worden.<sup>32</sup>

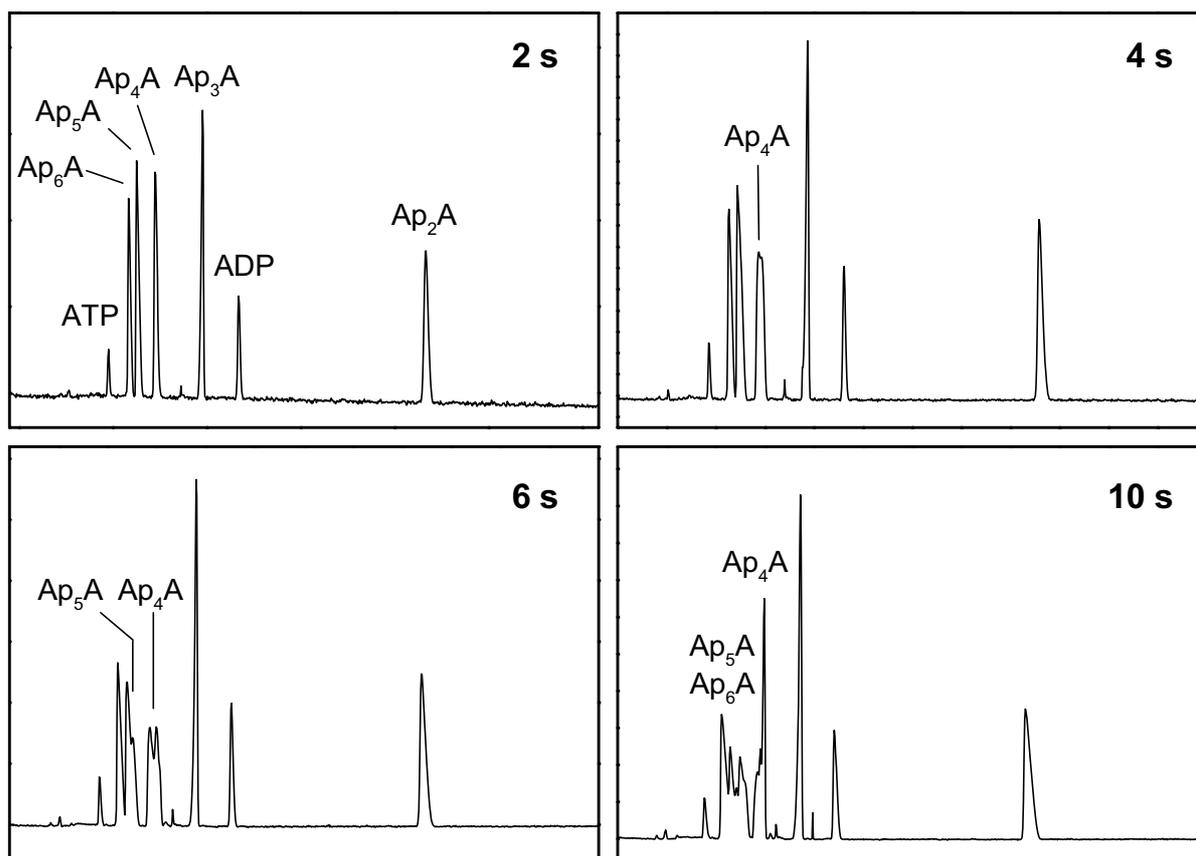


Abb. 3.6 Deformation und Splitting der Peaks von Ap<sub>4</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit der injizierten Substanzmenge, hier durch Variation der Injektionsdauer (Citratpuffer 50 mmol/L pH 4,75, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)

Diese Erklärung kann aber im Falle der Diadenosinpolyphosphate nicht zutreffend sein, da es sich nicht wie bei Paracetamol um Analyten handelt, die in der Nähe des  $pK_S$ -Wertes geringe Eigenmobilität aufweisen. Zudem weicht der  $pK_S$ -Wert des Adenins mit ca. 3,6 deutlich vom Puffer-pH 4,75 ab.

Prinzipiell könnte es sich hier auch um ein auf Elektrodispersion beruhendes Phänomen handeln, wie es bereits von MIKKERS<sup>33</sup> und ERMAKOV<sup>34,35</sup> beschrieben wurde. Dabei stellt sich allerdings die Frage, warum bei einer pH-Erhöhung und damit einer Verstärkung der negativen Ladungsdichte diese Peakverdoppelung nicht mehr auftritt. Außerdem wäre anzunehmen, dass dann die am höchsten negativ geladene Verbindung Ap<sub>6</sub>A zuerst vom Auftreten der Peakdeformation betroffen wäre.

Da die Ursache dieses Peaksplittings nicht zufriedenstellend erklärt und damit gezielt umgangen werden konnte, wurden zur Vermeidung des Problems stets Citratpuffer mit pH-Werten > 5 verwendet.

### 3.2.1.2 Guanosin-Derivate

Im nächsten Versuchsschritt wurde untersucht, ob das bisher für die Diadenosinpolyphosphate entwickelte Trennsystem auch geeignet ist, die Diadenosin-Verbindungen von den entsprechenden Mono- und Diguanosinderivaten abzutrennen und eine simultane Trennung der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  zu ermöglichen. Als Referenzsubstanzen standen dazu neben den  $Ap_nA$  die Verbindungen  $Ap_2G$  bis  $Ap_6G$  sowie  $Gp_2G$  und  $Gp_6G$  zur Verfügung.

Analog zu Abb. 3.1 sind in Abb. 3.7 die scheinbaren Mobilitäten der  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  bei verschiedenen pH-Werten dargestellt; zum Vergleich wurden die Mobilitäten der Diadenosinverbindungen mit eingezeichnet.

Betrachtet man zuerst die drei Vertreter der Diphosphate, so ist bei pH 4,75 die Migrationsreihenfolge  $Gp_2G - Ap_2G - Ap_2A$ ; je höher der Guanosinanteil im Molekül, desto schneller ist die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Adenosin- und Guanosinmononukleotiden bei pH-Werten unter 5 erhalten.<sup>36</sup> Dieses Verhalten ist vermutlich in der Basizität des Adeninringes begründet. Während bei pH 4,75 das  $N^1$ -Atom im Adenin noch zu einem geringen Anteil protoniert ist ( $pK_s$  3,6), ist der Guananteil bereits vollständig neutral ( $pK_s$  2,4). Die Basizität der semizyklischen Guanidin-Partialstruktur ist hier durch die vinyloge Stellung zur Carbonylgruppe drastisch reduziert. Bei Erhöhung des pH-Wertes kommt es etwa ab pH 5,25 zu einer Umkehrung der Migrationsreihenfolge; nun wandern diejenigen Moleküle schneller, bei denen der Adenosinanteil höher ist. Ein solches Verhalten ist ebenfalls für die entsprechenden Mononukleotide beschrieben.<sup>29-31</sup>

Dieses Migrationsverhalten kann nun nicht mehr durch unterschiedliche Säure-Base-Eigenschaften von Adenin und Guanin erklärt werden; als Ursache könnten z. B. unterschiedliche räumliche Anordnungen der Moleküle, bedingt durch den Austausch der Base, und daraus resultierende Änderungen des Stokes-Radius verantwortlich sein. Es fällt auf, dass der Mobilitätsunterschied zwischen  $Ap_2A$  und  $Ap_2G$  dabei deutlich größer ist als zwischen  $Ap_2G$  und  $Gp_2G$ : Während erstere stets gut getrennt werden, kommt es ab einem pH-Wert von 6,25 zur Komigration der beiden guanosinhaltigen Verbindungen.

Sehr ähnlich ist das Verhalten der Triphosphate. Während bei pH 4,75 das Adenosin-Guanosin-Derivat noch vor der Diadenosinverbindung migriert, ist ab pH 5,25 die Migrationsreihenfolge wie bei den Diphosphaten  $Ap_3A$  vor  $Ap_3G$  mit deutlichen Mobilitätsunterschieden zwischen diesen beiden Substanzen.

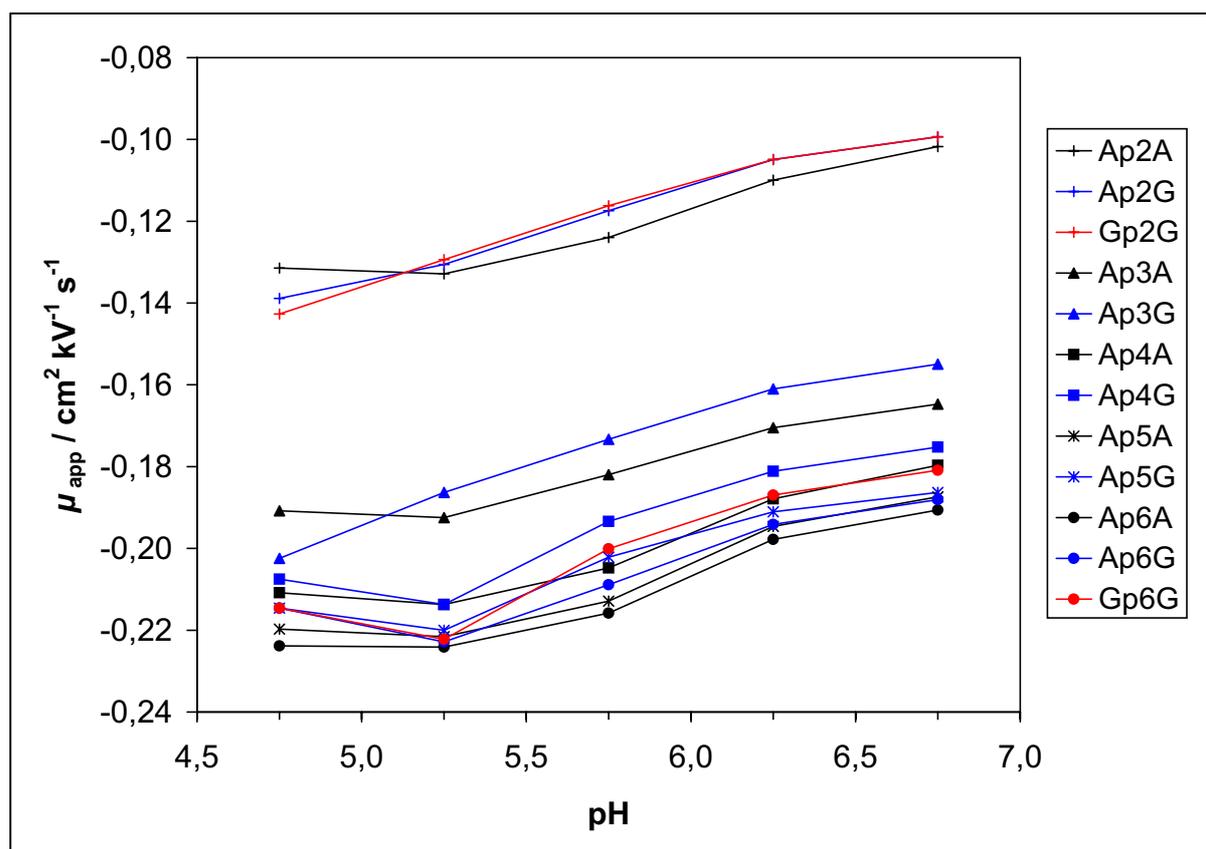


Abb. 3.7 Vergleich der scheinbaren Mobilitäten der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  (Citratpuffer 50 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV)

Bei den weiteren Homologen ändert sich jedoch das Bild: Schon bei pH 4,75 wandern hier die Adenosinderivate der Tetra-, Penta- und Hexaphosphate vor den guanosin-haltigen Verbindungen. Außerdem besteht bei diesem pH-Wert keine Selektivität zwischen  $Ap_5G$ ,  $Ap_6G$  und  $Gp_6G$ , zudem ist die Peakform für diese Analyten unbefriedigend. Bei höheren pH-Werten verbessern sich zwar Trennung und Peakform, grundlegende Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen adenosin- und guanosin-haltigen Dinukleotiden werden jedoch auch hier nicht beobachtet.

Zusammenfassend betrachtet ist es zwar möglich, jedes beliebige Paar der Diadenosin-, Adenosin-Guanosin- und Diguanosinpolyphosphate durch die Wahl eines geeigneten pH-Wertes zu trennen. Untersucht man jedoch alle Analyten gemeinsam, ergibt sich durch die teilweise nur geringen Mobilitätsunterschiede und das insgesamt recht ähnliche Migrationsverhalten ein sehr komplexes Migrationsmuster. Bezieht man außerdem noch die Mononukleotide AMP / ADP / ATP in die Betrachtung mit ein (aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 3.7 nicht gezeigt), so gibt es keinen pH-Wert, bei dem die simultane Trennung *aller* Analyten möglich wäre – es kommt immer zur

mehr oder weniger ausgeprägten Komigration von mindestens zwei Komponenten. Auch ein System, mit dem zumindest die *Diadenosinpolyphosphate* in Gegenwart der anderen Verbindungen selektiv bestimmt werden können, ist in diesem Puffersystem nicht möglich. Das beste in dieser Versuchsreihe erzielte Ergebnis mit allen Analyten ist in Abb. 3.8 gezeigt.

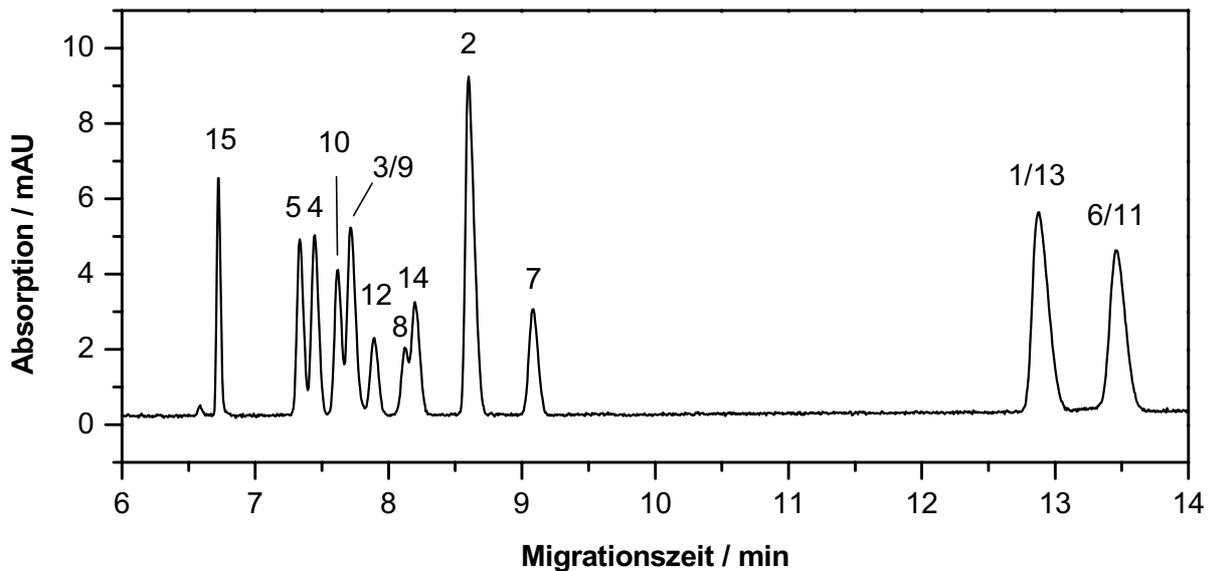


Abb. 3.8 Bestmögliche Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$ ,  $Ap_2G$  bis  $Ap_6G$ ,  $Gp_2G$ ,  $Gp_6G$  sowie AMP / ADP / ATP

1 =  $Ap_2A$ , 2 =  $Ap_3A$ , 3 =  $Ap_4A$ , 4 =  $Ap_5A$ , 5 =  $Ap_6A$ ,

6 =  $Ap_2G$ , 7 =  $Ap_3G$ , 8 =  $Ap_4G$ , 9 =  $Ap_5G$ , 10 =  $Ap_6G$ ,

11 =  $Gp_2G$ , 12 =  $Gp_6G$ , 13 = AMP, 14 = ADP, 15 = ATP

(Citratpuffer 50 mmol/L pH 6,25, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV)

Werden neben den Adenosinmono- und -dinukleotiden nur bestimmte Guanosinderivate einbezogen, ist es in der Regel möglich, durch die Wahl eines geeigneten pH-Wertes eine Trennung aller Analyten zu erreichen. In Abb. 3.9 ist dies am Beispiel von  $Ap_5G$ ,  $Ap_2G$  und  $Gp_2G$  dargestellt. Gegenüber Abb. 3.8 wurde dabei der pH-Wert nur geringfügig von 6,25 auf 6,10 erniedrigt.

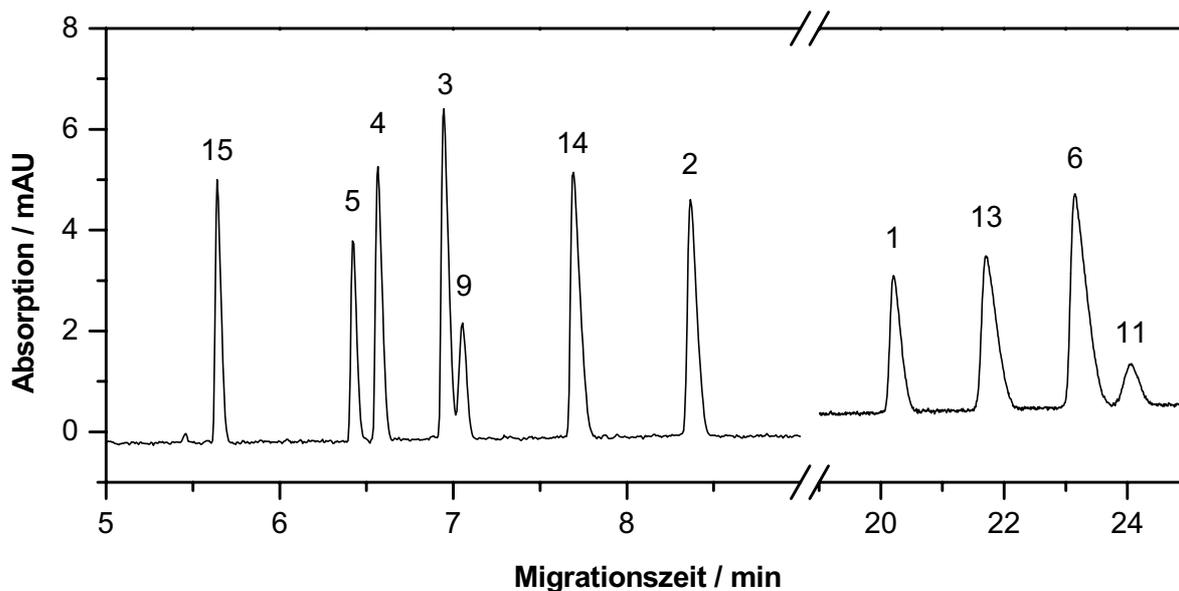


Abb. 3.9 Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$ ,  $Ap_2G$ ,  $Gp_2G$ ,  $Ap_5G$  sowie AMP / ADP / ATP  
 Zur Bezeichnung der Peaks s. Abb. 3.8.  
 (Citratpuffer 50 mmol/L pH 6,10, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)

### 3.2.1.3 Diadenosinhepta- und -octaphosphat

Wie bereits in Kap. 3.2.1.1 diskutiert wurde, werden die Mobilitätsdifferenzen zwischen den homologen Dinukleosidpolyphosphaten umso geringer, je länger das die beiden Nukleoside verbindende Phosphatrückgrat ist. In einem weiteren Versuchsschritt sollte daher untersucht werden, ob in einem Citratpuffer auch die Auftrennung von Diadenosinhepta- und -octaphosphat ( $Ap_7A$  bzw.  $Ap_8A$ ) möglich ist.

Unter den bisher am besten geeigneten Trennbedingungen (Pufferkonzentration 50 mmol/L, pH 5,25, Kapillarlänge 40/47 cm) war eine Auftrennung von  $Ap_5A$  bis  $Ap_8A$  nur sehr unvollständig möglich (s. Abb. 3.10 oben rechts):  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  sind zwar wie erwartet gut getrennt, allerdings kommt es zu völliger Komigration von  $Ap_6A$  und  $Ap_7A$ . Überraschenderweise kann aber  $Ap_8A$  zumindest als angetrennte Schulter vor dem  $Ap_6A/Ap_7A$ -Signal erkannt werden.

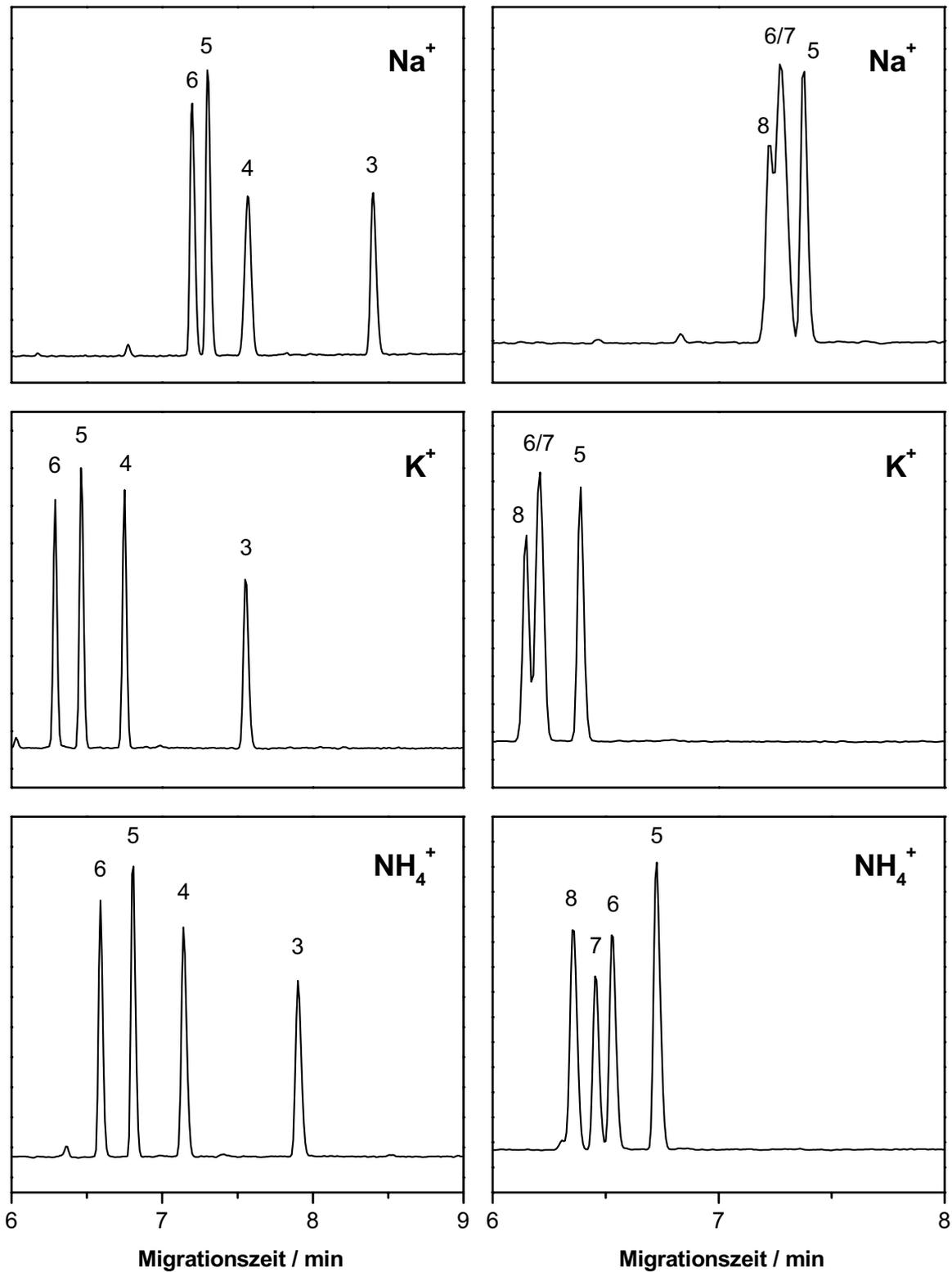


Abb. 3.10 Einfluss des Puffer-Gegenions auf die Trennung von Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A (linke Spalte) bzw. Ap<sub>5</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A (rechte Spalte)

Skalierung der Zeitachse innerhalb einer Spalte unverändert

3 = Ap<sub>3</sub>A, 4 = Ap<sub>4</sub>A, 5 = Ap<sub>5</sub>A, 6 = Ap<sub>6</sub>A, 7 = Ap<sub>7</sub>A, 8 = Ap<sub>8</sub>A

(Citratpuffer 50 mmol/L, pH 5,25 eingestellt mit NaOH, KOH bzw. NH<sub>4</sub>OH;

Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV)

Wie bereits diskutiert, beruht die ungenügende Auftrennung von Dinukleosidpolyphosphaten mit längerer Phosphatkette in der Kapillarzonenelektrophorese auf ihren nur geringfügig verschiedenen Ladungs-Masse-Verhältnissen und daraus resultierenden nur geringen Mobilitätsdifferenzen. Es ist auch nicht möglich, die Trennung durch Veränderung des pH-Wertes, der Pufferkonzentration oder der elektrischen Feldstärke entscheidend zu verbessern. Eine solche Verbesserung kann vielmehr nur durch Veränderung des Trennsystems an sich, z. B. Einsatz eines anderen Puffers oder Zugabe von Komplexbildnern, erfolgen. Der Zusatz von  $Mg^{2+}$  als komplexbildendes Agens ist in Kap. 3.4 beschrieben; hier soll nur auf eine Veränderung des Puffers bezüglich des Kations eingegangen werden. Dabei wurde – ausgehend von Citronensäure-Lösungen der Konzentration 50 mmol/L – der pH-Wert nicht wie bisher mit 5 M-Natronlauge, sondern mit 5 M-Kaliumhydroxid- bzw. 25%iger Ammoniumhydroxidlösung eingestellt.

Die resultierenden Elektropherogramme sind in Abb. 3.10 dargestellt; Trennleistungsparameter für  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  sowie die Auflösung dieses Peakpaares zeigt Abb. 3.11. Untersucht wurde zum einen eine Mischung aus  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  (linke Spalte in Abb. 3.10), zum anderen eine Mischung von  $Ap_5A$  bis  $Ap_8A$  (Abb. 3.10 rechte Spalte).

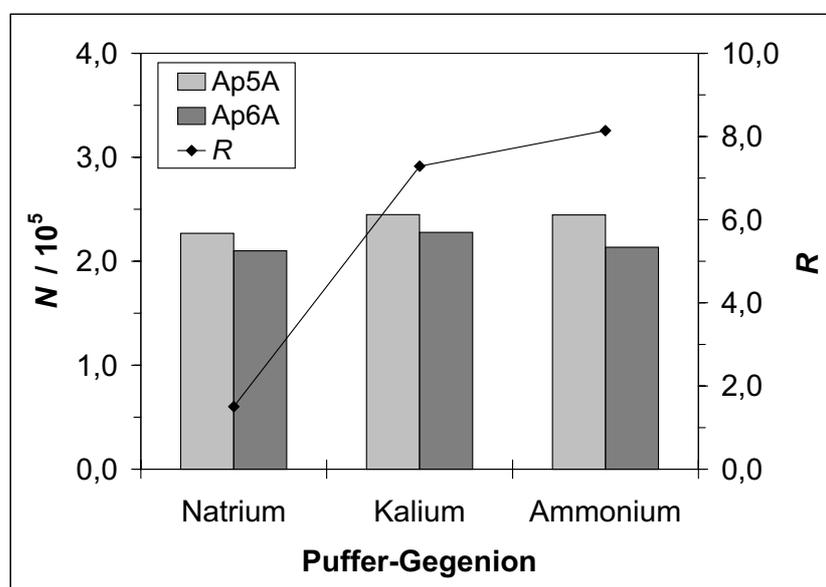


Abb. 3.11 Auflösung und Trennleistungsparameter von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  in Abhängigkeit des Puffer-Gegenions  
(Bedingungen s. Abb. 3.10)

Abb. 3.10 zeigt, dass sich durch Verwendung eines Kaliumcitrat-Puffers die Trennung der kürzeren Homologen trotz verringerter Migrationzeiten deutlich verbessert. Obwohl sich die Trennleistung gegenüber Natriumcitrat nicht signifikant verändert, steigt die Auflösung des Substanzpaares  $Ap_5A/Ap_6A$  von ca. 1,5 im natriumhaltigen Puffer jetzt auf über sieben an. Die Trennung der längerkettigen Verbindungen ist allerdings gegenüber dem Natriumcitrat-Puffer nicht entscheidend verbessert.

Verwendet man Ammoniumhydroxid zur pH-Einstellung, verbessert sich die Auftrennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  weiter: Die Auflösung von  $Ap_5A/Ap_6A$  erreicht nun einen Wert von über acht. Die Trennleistung ist allerdings auch hier nicht signifikant von einem Natriumcitrat-Puffer verschieden. Die Migrationszeiten liegen etwa in der Mitte zwischen dem natrium- und dem kaliumhaltigen System. Wichtiger ist allerdings die Auftrennung der längerkettigen Verbindungen:  $Ap_5A$  bis  $Ap_8A$  sind nun bei Migrationszeiten von unter sieben Minuten nahezu basisliniengetrennt (Abb. 3.10 unten rechts).

Beim Einsatz des kaliumhaltigen Puffers kommt es jedoch zur einer partiellen Überlappung von  $Ap_6A$  und ATP (hier nicht gezeigt), die sich im Ammoniumcitrat-Puffer zu völliger Komigration verstärkt. Damit sind diese verbesserten Trennsysteme für die Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate in biologischen Matrices, bei denen das Vorhandensein von Mononukleotiden nicht ausgeschlossen werden kann, nicht geeignet.

In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Untersuchungen. Es wurde zwar gezeigt, dass die Trennung der Ribonukleotide in einem Ammoniumphosphatpuffer ebenfalls besser als in einem Kalium- oder Natriumphosphatpuffer ist,<sup>29</sup> allerdings wurde die verbesserte Trennung allein auf die höhere Selektivität zwischen den verschiedenen Basen der gleichen Phosphorylierungsstufe (also ATP/GTP, ADP/GDP usw.) bezogen. Ein Einfluss des Pufferkations auf die Trennung von Mono- und Dinukleotiden mit gleicher Base aber verschiedener Phosphatgruppenzahl wurde bisher nicht beschrieben.

Eine Möglichkeit, dieses Verhalten zu erklären, beruht auf den unterschiedlichen sog. *taxigenen* Eigenschaften der verwendeten Kationen,<sup>26</sup> wie sie bereits vor über 100 Jahren von HOFMEISTER beschrieben wurden. Je höher das taxigene Potential eines Ions ist, desto stärker wird bei seiner Anwesenheit die innere Struktur des Wasser verfestigt: Die Selbstassoziation des Wassers wird verstärkt, die Ausbildung von Clusterstrukturen erleichtert. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der assoziierten Wassermoleküle, die Anzahl der nicht-assoziierten Wasserteilchen, die für die Hydra-

tisierung gelöster Substanzen zur Verfügung stehen, verringert sich. Als Nebeneffekt wird dadurch auch die Viskosität erhöht. Dieser Strukturverfestigung liegen die aus der Biochemie bekannten Aussalzvorgänge zugrunde.<sup>1)</sup> Dieses taxigene Potential nimmt nun in der Reihe  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  -  $\text{NH}_4^+$  zu.

Erhöht man nun die innere Struktur des Puffers durch Zusatz stärker taxigener Ionen ( $\text{K}^+$  und vor allem  $\text{NH}_4^+$ ), erscheint einleuchtend, dass zum einen das Hydratisierungspotential des Wassers abnimmt, die Hydrathüllen und damit die Stokes-Radien kleiner werden, zum anderen aber auch die räumliche Struktur der konformativ beweglichen Polyanionen verändert werden kann. Möglicherweise ordnet sich das negativ geladene Phosphatrückgrat aufgrund der schlechteren Lösungseigenschaften des Wassers in einer kompakteren und damit geringeren Reibungswiderstand aufweisenden Form an. Beide Effekte dürften sich umso deutlicher bemerkbar machen, je stärker das Teilchen geladen, d. h. je länger seine Phosphatkette, ist.

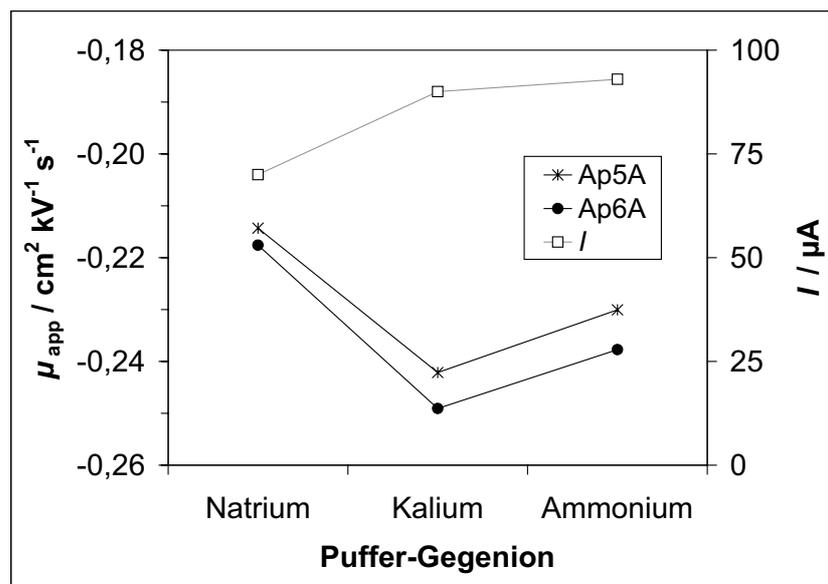


Abb. 3.12 Scheinbare Mobilität von  $\text{Ap}_5\text{A}$  und  $\text{Ap}_6\text{A}$  in Abhängigkeit des Puffer-Gegenions sowie resultierender Elektrophoresestrom (Bedingungen s. Abb. 3.10)

<sup>1)</sup> Der gegenteilige, strukturbrechende, Effekt, der die Lösungseigenschaften des Wassers verbessert, wird als *chaotrop* bezeichnet.

Weiter fällt bei Betrachtung der Abb. 3.12 auf, dass sich der resultierende Elektrophoresestrom bei Verwendung des kalium- oder ammoniumhaltigen Puffers gegenüber Natriumcitrat deutlich erhöht, während die elektrophoretische Mobilität der Analyten negativere Werte annimmt, die Migrationszeiten also gegenüber dem natriumhaltigen Puffer verkürzt sind. In Tab. 3.2 sind die zur Erklärung dieser Beobachtungen nötigen Eigenschaften der verwendeten Pufferkationen aufgeführt. Während der Radius der „nackten“ Ionen in der Reihe  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  -  $\text{NH}_4^+$  zunimmt, nimmt der für das Verhalten in wässriger Lösung entscheidende Radius der hydratisierten Teilchen in der gleichen Richtung ab: Da alle Ionen einfach positiv geladen sind, der Teilchenradius aber zunimmt, verringert sich die elektrische Ladungsdichte der Ionen und damit auch die anziehende Kraft auf die Wassermoleküle. Als Folge davon steigen die sog. Ionenäquivalentleitfähigkeiten bei unendlicher Verdünnung  $l_K$  und damit auch die Gesamtleitfähigkeit der Puffer an. Der Einfluss der Teilchengröße der Pufferionen auf den EOF und die Mobilität der Analyten wurde bereits in der Literatur beschrieben, wenn gleich auch nicht schlüssig erklärt. Bereits ATAMNA machte die Beobachtung, dass  $\mu_{\text{EOF}}$  in Alkali-Acetatpuffern mit steigendem Hydratationsradius des Pufferkations zunimmt,<sup>26</sup> während LI beschrieb, dass die elektrophoretische (d. h. effektive) Mobilität von *m*-Aminobenzoesäuren in einem kaliumhaltigen Puffer größer ist als bei Verwendung des Natriumsalzes.<sup>37</sup> Überträgt man diese Beobachtungen auf den hier diskutierten Fall, so sollte im  $\text{K}^+$ -/ $\text{NH}_4^+$ -haltigen Puffer  $\mu_{\text{EOF}}$  kleiner und  $\mu_{\text{eff}}$  der Analyten größer sein als im Natriumcitrat-Puffer. Beide Effekte wirken sich dabei gegenteilig auf die Migrationszeiten aus. Da es bei Kalium- und Ammoniumcitrat insgesamt zu einer Verkürzung der Migrationszeiten gegenüber Natriumcitrat kommt, überwiegt hier die Beeinflussung des EOF.

<b>Eigenschaft</b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>
Ionenradius (in pm) <sup>38</sup>	97	133	143
Hydratationsradius (in pm) <sup>38</sup>	276	232	k. A.
Ionenäquivalentleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung $l_K$ (in S cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> ) <sup>39</sup>	50,1	73,5	74

Tab. 3.2 Vergleichende Übersicht der Eigenschaften von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$

Durch die hohe Auflösung von  $\text{Ap}_5\text{A}$  und  $\text{Ap}_6\text{A}$  bei der Verwendung eines Ammoniumcitrat-Puffers war es möglich, die Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  auch in einer Kapillare mit 20 cm effektiver Länge durchzuführen. Die Migrationszeiten lagen dabei für alle Analyten unter 4,5 min. Ein entsprechendes Elektropherogramm ist in Abb. 3.13 gezeigt. Die Auftrennung von  $\text{Ap}_7\text{A}$  und  $\text{Ap}_8\text{A}$  war unter diesen Bedingungen ebenfalls möglich, allerdings reichte die Trennstrecke für eine Basislinientrennung von  $\text{Ap}_6\text{A}$  und  $\text{Ap}_7\text{A}$  nicht aus. Die unruhige Basislinie vor allem im Bereich von 2,2 und 3,8 Minuten trat nur bei der Verwendung eines ammoniumhaltigen Puffers und unabhängig von der Kapillarlänge immer bei den gleichen Migrationszeiten auf. Die Ursache dieser Störung konnte nicht geklärt werden.

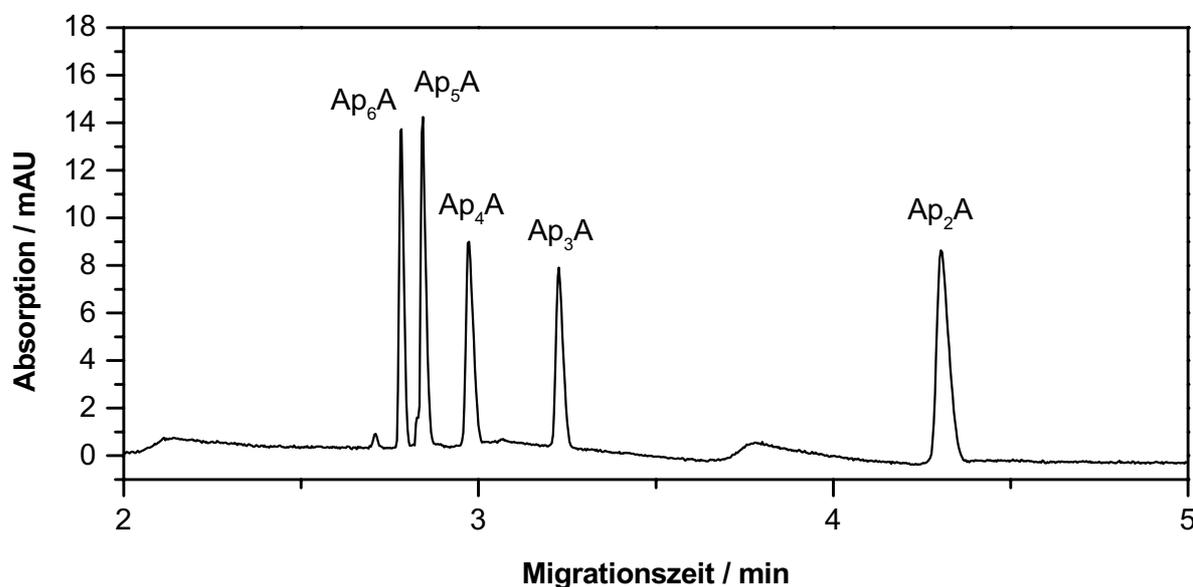


Abb. 3.13 Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  innerhalb von 5 Minuten in einer 20/27 cm-Kapillare  
(Citratpuffer 50 mmol/L, pH 5,25 mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  eingestellt, Spannung -11,5 kV)

Eine Verbesserung der Trennung durch Einstellung des pH-Wertes mit anderen Aminen wie Triethylamin oder TRIS konnte nicht erzielt werden. Im Vergleich zu Natriumcitrat kam es zu einem Verlust an Auflösung und zu einer teilweise dramatischen Verschlechterung der Peakform vor allem im Bereich der länger-kettigen Verbindungen.

### 3.2.2 Phosphat-Puffer

Phosphorsäure ist wie Citronensäure eine dreibasige Säure; die  $pK_S$ -Werte betragen 2,1, 7,2 bzw. 12,7.<sup>26</sup> Dadurch ist die Pufferkapazität im schwach-sauren bzw. neutralen Milieu nur in den pH-Bereichen von etwa 1,5–3 bzw. 6–8 ausreichend. Um die Ergebnisse mit den in Citratpuffern erhaltenen Daten vergleichen zu können, wurden Phosphatpuffer allerdings auch bei pH-Werten zwischen drei und sechs eingesetzt.

Wie das Citrat-Ion ist auch das Phosphat-Ion bereits bei schwach sauren pH-Werten negativ geladen, allerdings besitzt es aufgrund der höheren  $pK_S$ -Werte bei gleichen pH-Werten eine geringere negative Ladungsdichte und damit auch eine geringere elektrophoretische Mobilität. Dies lässt Einflüsse auf die erzielbare Trennleistung erwarten. Durch die geringere elektrische Leitfähigkeit ist allerdings auch der resultierende Stromfluss geringer, so dass bei Bedarf höhere elektrische Feldstärken als in Citratpuffern eingesetzt werden können und die Trennleistung damit gesteigert werden kann. Die mikrobiologische Stabilität von Phosphat-Puffern ist anders als bei Citronensäure bereits bei Raumtemperatur sehr gut.

#### 3.2.2.1 Diadenosin-Verbindungen

Das pH-Wert-abhängige Migrationsverhalten der Diadenosinphosphate ähnelt im Phosphatpuffer grundsätzlich dem Citratpuffer (vgl. Abb. 3.1), so dass auf eine entsprechende  $\mu$ -pH-Darstellung an dieser Stelle verzichtet wurde. Allerdings war es nicht möglich, mit einer dem Citrat entsprechenden Pufferkonzentration (50 mmol/L) befriedigende Ergebnisse zu erzielen. Im folgenden wurde daher eine Phosphationen-Konzentration von 100 mmol/L verwendet.

Abb. 3.14 zeigt die Trennleistung für  $Ap_3A$  bis  $Ap_6A$  in Abhängigkeit des pH-Wertes. Im hier untersuchten pH-Bereich wurden im Citrat-Puffer die besten Ergebnisse erzielt (vgl. Abb. 3.3). Während dort die Trennung von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  problematisch war, ist hier im Phosphatpuffer  $Ap_4A/Ap_5A$  das am schwierigsten zu trennende Substanzpaar: Die Auflösung erreicht bei keinem der untersuchten pH-Werte für eine Basislinientrennung ausreichende Werte. Außerdem sind die hier erzielten Trennleistungen deutlich niedriger als im citrathaltigen System. Der Trennleistungsparameter  $N$  liegt für  $Ap_5A$  bei ca. 250.000 und nimmt für  $Ap_6A$  sogar derart schlechte Werte von ca. 15.000 an, dass nur noch sehr kleine, breite Peaks detektiert werden. Bei Erniedrigung des pH auf Werte von unter 4–4,5 kam es sogar zu völligem Verlust der Auflösung zwischen

Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A, und die Trennleistungen für alle Analyten verschlechterten sich dramatisch.

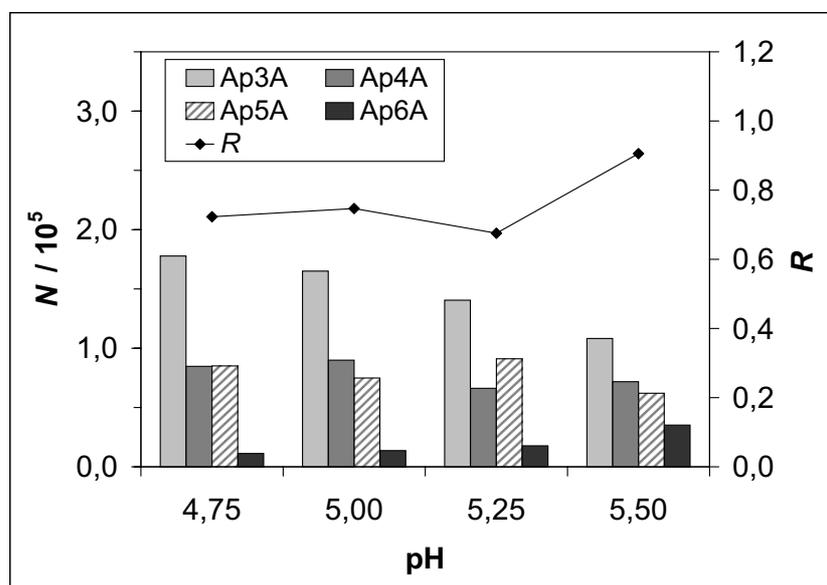


Abb. 3.14 Trennleistung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und Auflösung des Peakpaares Ap<sub>4</sub>A/Ap<sub>5</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes; pH-Einstellung mit äquimolarer Phosphat-Lösung (Puffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, E = -500 V/cm)

Die mit zunehmender Phosphatgruppenzahl deutlich abnehmende Trennleistung wurde als Indiz für eine zu geringe Ionenstärke in der Pufferlösung gewertet – vermutlich können die mit längerem Phosphatrückgrat stark zunehmende elektrostatische Abstoßung der Teilchen und die daraus resultierende Elektrodispersion nicht wirkungsvoll genug unterdrückt werden. Da eine weitere Erhöhung der Phosphationenkonzentration wegen zu starker Wärmeentwicklung und daraus resultierenden Stromzusammenbrüchen nicht möglich war, wurde die Ionenstärke durch Einstellung des pH-Wertes mit 5 M-Natronlauge (anstelle von 100 mM-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bzw. 100-mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung wie bisher) gesteigert. Außerdem wurde der pH-Wert nun auf Werte von über sechs erhöht, um zum einen in den optimalen Pufferbereich der Phosphorsäure zu gelangen und zum anderen die negative Ladung und damit die Mobilität des Phosphat-Anions durch Erreichen der nächsten Dissoziationsstufe zu erhöhen. Desweiteren wurde die elektrische Feldstärke von -500 V/cm auf -540 V/cm gesteigert.

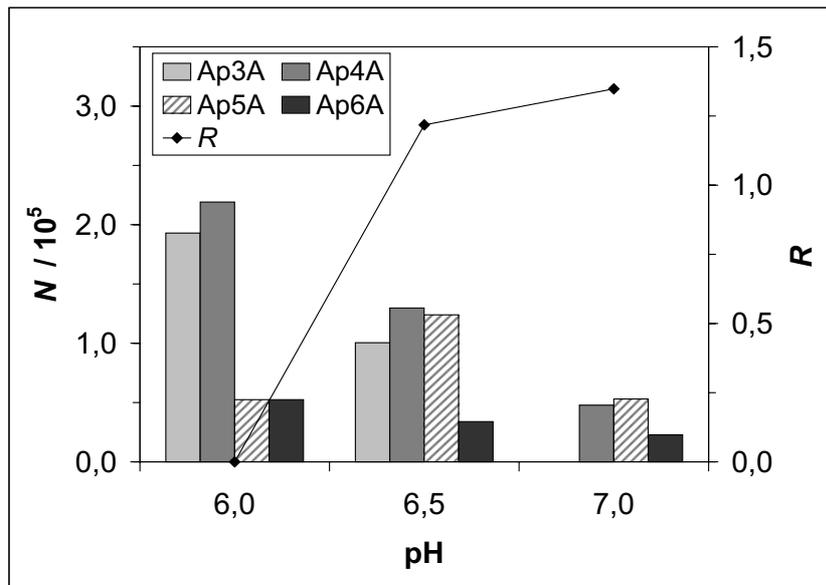


Abb. 3.15 Trennleistung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und Auflösung des Peakpaares Ap<sub>5</sub>A/Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes; pH-Einstellung mit 5 M-NaOH (Puffer Phosphorsäure 100 mmol/L, Kapillare 30/37 cm, E = -540 V/cm)

Das Ergebnis dieser Veränderungen ist in Abb. 3.15 dargestellt. Vor allem bei pH 6,0 ist die Trennleistung gegenüber den oben beschriebenen Versuchen deutlich erhöht. Doch kommt es hier zur Komigration von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A – das vorher schwierig zu trennende Substanzpaar Ap<sub>4</sub>A / Ap<sub>5</sub>A wurde dagegen bei allen untersuchten pH-Werten problemlos getrennt. Den besten Kompromiss stellt pH 6,5 dar: Die Auflösung von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A erreicht einen Wert von ca. 1,25, die Trennleistung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>5</sub>A liegt mit ca. 100.000 zwar immer noch deutlich niedriger als im Citratpuffer, erreicht jedoch bereits akzeptable Werte. Lediglich Ap<sub>6</sub>A fällt mit  $N = 34.000$  aus dem Rahmen, wenngleich die Trennleistung gegenüber den Bedingungen der Abb. 3.14 ( $N = 15.000$ ) deutlich verbessert ist. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 führt zu einem drastischen Einbruch der Trennleistung für alle Analyten. Ein repräsentatives Elektropherogramm bei pH 6,5 ist in Abb. 3.16 gezeigt.

Interessanterweise war es bei pH 6,25 möglich, auch das Gemisch Ap<sub>5</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A mit akzeptablen Auflösungsdaten zu trennen. Allerdings, bedingt durch die noch höhere negative Ladungsdichte von Ap<sub>7</sub>A und Ap<sub>8</sub>A und die dadurch verstärkte Elektrodispersion, lagen die erzielten Trennleistungen noch unter dem bescheidenen Wert für Ap<sub>6</sub>A, so dass hier auf eine Darstellung des Elektropherogramms verzichtet wird.

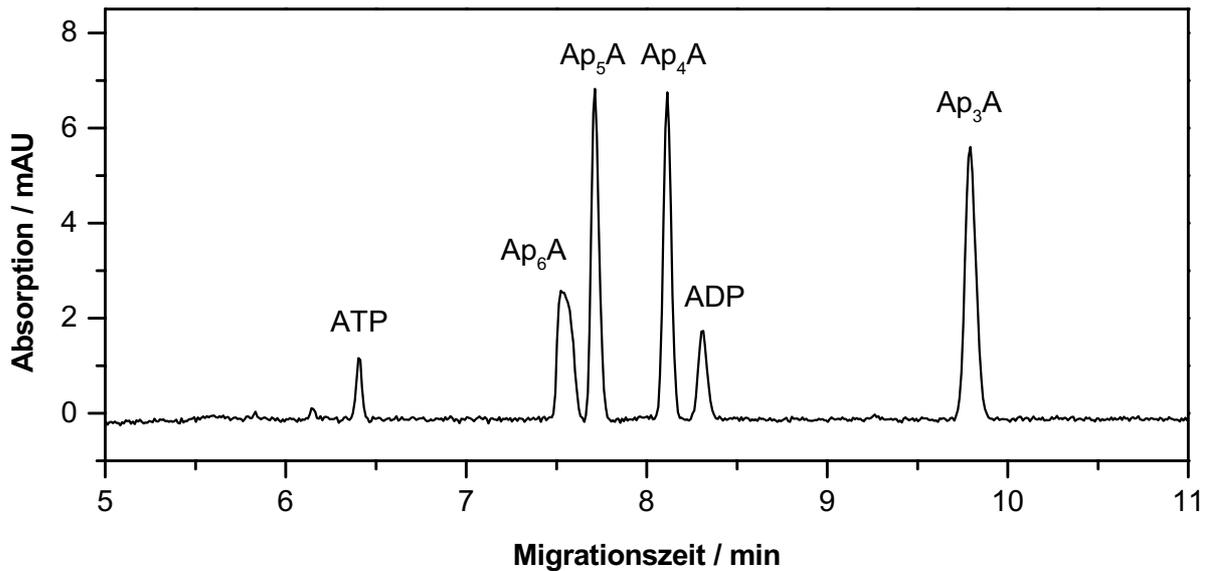


Abb. 3.16 Trennung von Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie ADP / ATP (Ap<sub>2</sub>A bzw. AMP aufgrund langer Migrationszeiten von über 20 Minuten nicht sichtbar)  
(Puffer Phosphorsäure 100 mmol/L pH 6,5 eingestellt mit 5 M-NaOH, Kapillare 30/37 cm, E = -540 V/cm)

Der bereits für den Citratpuffer beschriebene Einfluss des Pufferkations auf die Trennung der Diadenosinpolyphosphate konnte auch im Phosphatpuffer beobachtet werden, wenngleich deutlich schwächer ausgeprägt. Hier wurde vor allem die Trennung von Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A verbessert, die Auflösung von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A blieb weitgehend unverändert. Auf die Trennleistung und damit die Peakform von Ap<sub>6</sub>A hatte die Veränderung des Pufferkations keinen Einfluss.

### 3.2.2.2 Guanodin-Derivate

Da die bis hierhin erzielten Ergebnisse ein Phosphatpuffer-System für eine spätere Untersuchung biologischer Proben als nicht besonders geeignet erscheinen ließen, wurde das Verhalten der Guanodin-Derivate nur exemplarisch an einer aus Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und Ap<sub>2</sub>G / Gp<sub>2</sub>G / Ap<sub>5</sub>G sowie den Adenosinmononukleotiden bestehenden Testmischung untersucht. Das beste Ergebnis wurde dabei bei einem pH-Wert von 6,7 erhalten und ist in Abb. 3.17 oben dargestellt. Die Migrationszeit der drei Diphosphate war hier allerdings bereits so lang, dass sie innerhalb von 40 Minuten nicht detektiert werden konnten. Als weiteres Problem beim Arbeiten in diesem pH-Bereich stellte sich die starke pH-Abhängigkeit der Mobilität von ADP heraus. Während Adenosindiphosphat bei pH 6,7 wie gezeigt zwischen Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A migrierte, kam es bei pH 6,6 zu einer Komigration mit Ap<sub>4</sub>A und bei pH 6,8 zu einer Komigration mit Ap<sub>6</sub>A.

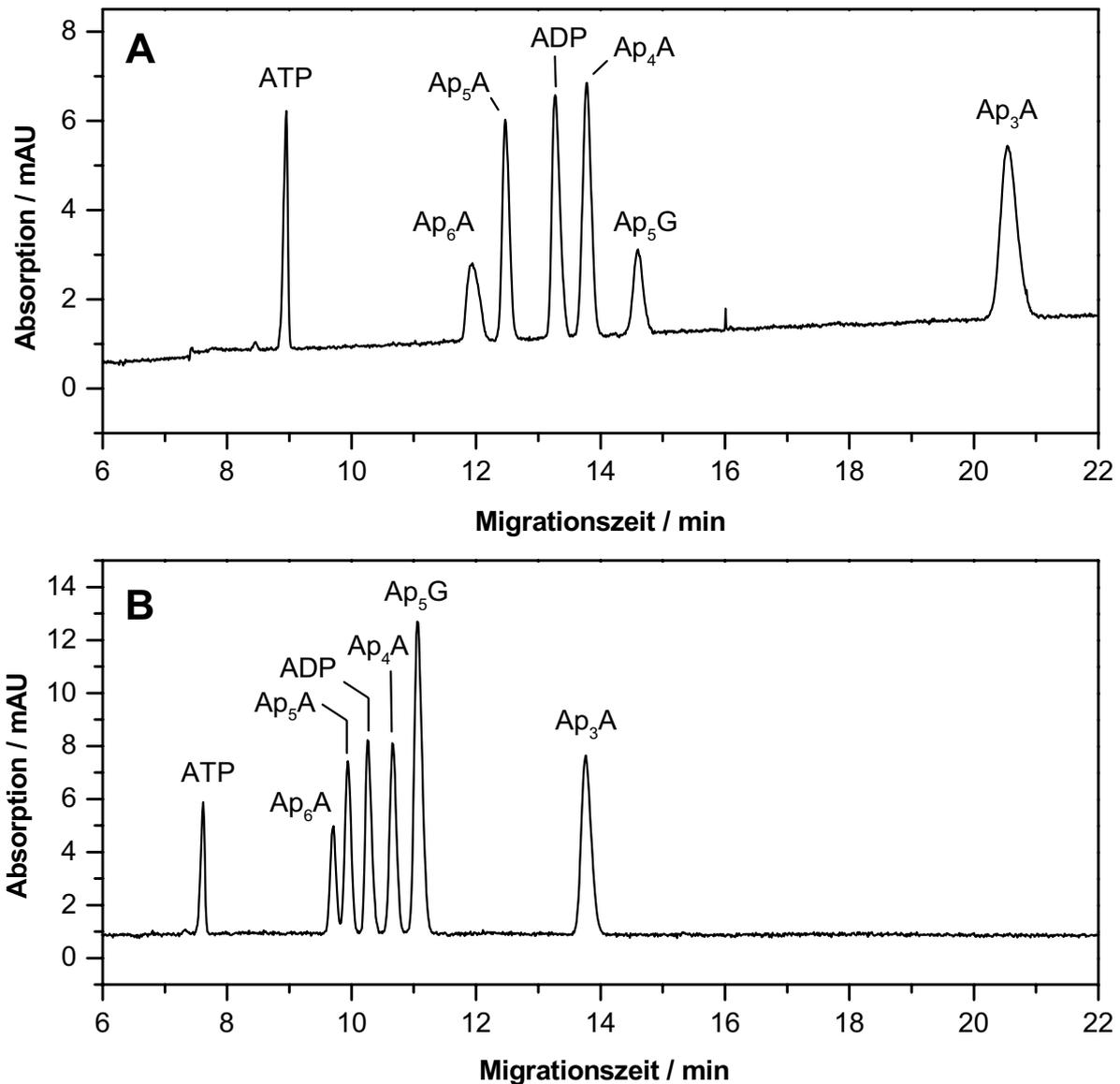


Abb. 3.17 Trennung der Adenosinmono- und -dinukleotide sowie Ap<sub>5</sub>G bei pH 6,7  
 A: Puffer Phosphorsäure 100 mmol/L, pH-Einstellung mit 5 M-NaOH  
 B: Puffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mmol/L, pH-Einstellung mit 50 mM-Citronensäure  
 (Kapillare 30/37 cm,  $E = -540$  V/cm)

In Abb. 3.17 unten ist die Trennung der gleichen Analytenmischung ebenfalls bei pH 6,7, nun allerdings unter Verwendung eines Citrat-Phosphat-Mischpuffers, dargestellt. Im Vergleich zum reinen Phosphat-System fallen zum einen die deutlich verkürzten Migrationszeiten auf, die vermutlich auf den unter diesen Bedingungen verringerten EOF zurückzuführen sind. Außerdem ist die Peakform von Ap<sub>6</sub>A in Anwesenheit von Citrationen deutlich verbessert; dafür ist allerdings die Auflösung des Peakpaares Ap<sub>5</sub>A / Ap<sub>6</sub>A geringer. Einen Vorteil gegenüber einem reinen Citratpuffer lässt somit

auch dieses Puffersystem nicht erkennen, so dass phosphathaltige Puffersysteme nicht mehr weiterverfolgt wurden.

### 3.2.3 Acetat- bzw. Formiat-Puffer

Da für die spätere Untersuchung biologischer Proben die Möglichkeit einer CE/MS-Kopplung wünschenswert erschien, wurde im folgenden versucht, ein dazu kompatibles Trennsystem zu entwickeln. Um eine Verschmutzung der Ionenquelle des Massenspektrometers zu vermeiden, ist es dabei erforderlich, ausschließlich im Vakuum flüchtige Pufferbestandteile für die CE-Trennung einzusetzen. Im sauren pH-Bereich werden dafür in der Regel Ammoniumacetat/Essigsäure bzw. Ammoniumformiat/Ameisensäure verwendet.

Ameisensäure und Essigsäure als schwache Säuren mit  $pK_S$ -Werten von 3,75 bzw. 4,75<sup>26</sup> können in pH-Bereichen von 3–5 (Ameisensäure) bzw. 4–6 (Essigsäure) eingesetzt werden. Im Gegensatz zu Citronen- oder Phosphorsäure sind sie aber im schwach sauren Bereich nicht mehr vollständig dissoziiert und besitzen daher eine deutlich geringere Ladungsdichte bzw. elektrophoretische Mobilität. Wie auch bei Phosphorsäure sind dadurch niedrigere Trennleistungen insbesondere für  $Ap_6A$  im Vergleich zu Citronensäure zu erwarten.

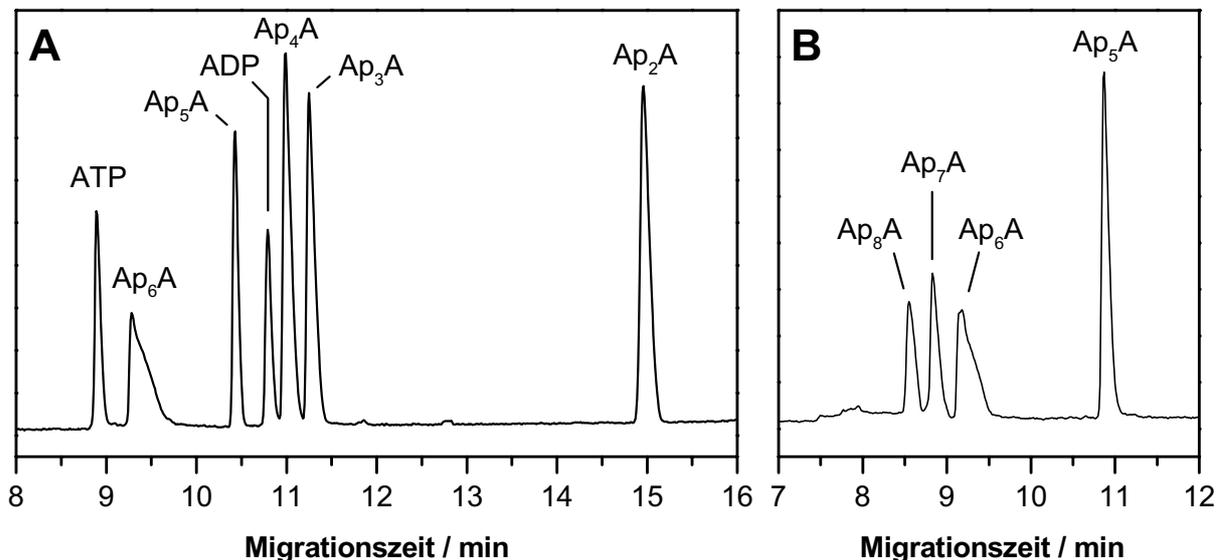


Abb. 3.18 Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  und ADP / ATP (A) bzw.  $Ap_5A$  bis  $Ap_8A$  (B) (Ammoniumacetat 100 mmol/L pH 5,0, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV)

Die besten Ergebnisse für den Acetat-Puffer wurden bei pH 5,0 und einer Pufferkonzentration von 100 mmol/L erzielt (s. Abb. 3.18 A). Im Vergleich zum Citratpuffer (s. Abb. 3.5) fällt die drastisch erhöhte Selektivität zwischen Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A sowie die im Vergleich zu den Dinukleotiden erhöhte Mobilität der Mononukleotide auf. Aber die Peakform war für Ap<sub>6</sub>A wie erwartet nur unzureichend: Während der Trennleistungsparameter für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>5</sub>A akzeptable Werte im Bereich von 65.000–100.000 annahm, wurde für Ap<sub>6</sub>A nur ein Wert von ca. 10.000 erreicht. Dafür gelang in diesem Puffersystem die Basislinientrennung von Ap<sub>5</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A, allerdings bei schlechter Peakform (s. Abb. 3.18 B).

Da eine Pufferkonzentration von 100 mmol/L für die Kopplung mit einem Massenspektrometer noch zu hoch wäre, wurde das Verhalten der Analyten in verdünnteren Puffern untersucht. Mit abnehmender Salzkonzentration kam es zu einem Verlust an Auflösung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>5</sub>A, bei einer Konzentration von 25 mmol/L trat Komigration von Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A ein. Die ohnehin nicht allzu hohen Trennleistungen verringerten sich weiter, so dass der Einsatz zur CE/MS-Kopplung nicht sinnvoll erscheint.

Die Ergebnisse mit Formiat-Puffern entsprechen im großen und ganzen denen mit Acetat-Puffern. Auch hier war Ap<sub>6</sub>A deutlich von Ap<sub>5</sub>A abgetrennt, die Trennleistung lag aber noch unter den bereits schlechten Werten des Acetatpuffers. Bei für die Kopplung mit einem Massenspektrometer geeigneten niedrigen Pufferkonzentrationen konnten keine verwertbaren Pherogramme erhalten werden.

### 3.2.4 Einsatz von mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren

#### 3.2.4.1 Zielsetzung

Wie bereits in Kap. 3.2.1 diskutiert, waren sowohl die *interday*- als auch die *intraday*-Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in unbehandelten Kapillaren problematisch. Darüber hinaus lag die scheinbare Mobilität vor allem der Dinukleosid-Diphosphate bei pH-Werten über 5,5 durch den dann recht starken EOF nahe bei Null, so dass sehr lange Laufzeiten erforderlich waren, um alle Analyten detektieren zu können; für langsam migrierende Verbindungen lagen die erreichten Trennleistungen durch die langen Migrationszeiten deutlich niedriger. Deswegen sollte in einer Versuchsreihe untersucht werden, ob der Einsatz von modifizierten Kapillaren mit unterdrücktem EOF von Vorteil für die Migrationszeitstabilität und/oder die Trennleistung ist. Für diese Untersuchungen wurden mit linearem Polyacrylamid belegte Kapillaren eingesetzt, da diese einerseits leicht selbst herzustellen sind und andererseits der verbleibende EOF nur

noch sehr gering ist. Eine kovalente wie auch dynamische Belegung mit Cellulosederivaten konnte den EOF nicht wirkungsvoll genug unterdrücken; ebenso misslang die Beeinflussung des EOF durch Zusatz von Spermin zum Laufpuffer, da die Polykation Spermin eine starke Adsorption der polyanionischen Nukleotide an die Kapillarwand bewirkte.

Die belegten Kapillaren wurden dabei nur in Citratpuffer-Systemen untersucht, da sich alle anderen Puffer im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich als weniger geeignet erwiesen hatten. Die in Kap. 3.3 beschriebenen alkalischen Puffersysteme konnten aufgrund der hydrolytischen Instabilität der Belegung bei pH-Werten größer sieben nicht verwendet werden.

### 3.2.4.2 Herstellung der Kapillaren

Die Belegung der Kapillarwand mit linearem Polyacrylamid (PAA) wurde bereits 1985 von HJERTÉN beschrieben.<sup>40</sup> Bei diesem Verfahren wird auf die Kapillarinnenwand eine monomolekulare Polyacrylamid-Schicht kovalent aufgebracht, die den EOF nahezu vollständig zu unterdrücken vermag und gleichzeitig die Kapillaroberfläche vor den Analyten abschirmt.

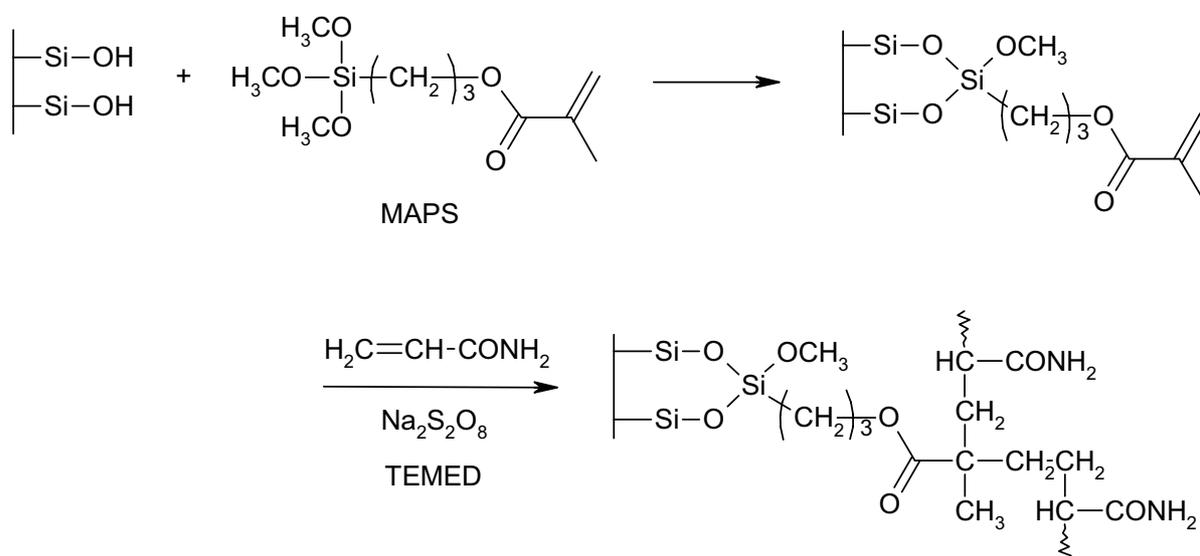


Abb. 3.19 Darstellung der mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren

Die Darstellung dieser PAA-Schicht erfolgte modifiziert nach HJERTEN<sup>40</sup> und SCHULTE<sup>41</sup>. Um die Reproduzierbarkeit der Belegung zu erhöhen, wurde die Kapillare mit 1 mol/L-NaOH vorbehandelt; Wasserreste im Kapillarlumen wurden durch Erhitzen entfernt. Durch dieses Anätzen der nativen Oberfläche und die Entfernung von Wasserspuren wird die Anzahl freier Silanolgruppen, die für eine Silanisierung mit dem bifunktionellen Agens  $\gamma$ -Methacryloyloxypropyltrimethoxysilan (MAPS) zur Verfügung stehen, erhöht.<sup>42,43</sup> Die so fixierten Vinylgruppen des Silans werden dann mit Acrylamid unter Zusatz des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und des Radikalstarters Natriumperoxodisulfat copolymerisiert; dadurch wird bei Raumtemperatur in einer wässrigen Polymerisation ein lineares Polymer aufgebaut (s. Abb. 3.19). Bei dieser Art der Belegung wird das Polymer über eine Siloxan-Bindung der Art Si-O-Si-C an das *fused-silica*-Material gebunden. Diese Bindung ist prinzipiell hydrolyseempfindlich; allerdings wurde Stabilität bei pH-Werten von 2,3 bis 7,0 für 30 Tage bei 30 °C nachgewiesen.<sup>42</sup> Höhere Temperaturen und/oder sehr hohe Pufferkonzentrationen führen jedoch zur hydrolytischen Ablösung des Polymers.

### 3.2.4.3 Ergebnisse

Da nach der Belegung mit Polyacrylamid der EOF nahezu vollständig unterdrückt war, konnten unter der Annahme  $\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{eff}}$  nun die effektiven Mobilitäten der Diadenosinpolyphosphate in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt werden (s. Abb. 3.20). Im Gegensatz zum Arbeiten in einer unbehandelten Kapillare (vgl. Abb. 3.1) erreichen die Mobilitäten der Dinukleotide ab ca. pH 5,25 ein Plateau: Auch bei höheren pH-Werten bleiben die Mobilität und damit auch die Migrationszeit im Rahmen der Messgenauigkeit konstant, d. h. es kommt in diesem pH-Bereich zu keiner weiteren Deprotonierung des Phosphat-Rückgrates. Ein etwas anderes Verhalten zeigen die Mononukleotide: Über den ganzen untersuchten pH-Bereich werden die Mobilitäten zunehmend negativer; vor allem AMP und ADP zeigen ab pH 5,75 eine deutliche Zunahme der Mobilität in Richtung negativer Werte. Diese Zunahme der Mobilität mit höheren pH-Werten kann nur auf eine weitere Deprotonierung der Phosphatgruppe(n) der Mononukleotide zurückgeführt werden. Warum keines der hier betrachteten Dinukleotide ein ähnliches Verhalten zeigt, erscheint unklar, da sich die Mononukleotide von den Dinukleotiden prinzipiell nur durch die zusätzliche primäre Phosphatgruppe unterscheiden, diese aber mit  $pK_s$ -Werten um 1,5 bereits längst vollständig dissoziiert ist.

Wie bereits für unbelegte Kapillaren beschrieben, wurden akzeptable Peakformen und Trennleistungen insbesondere für die Hexa- und Pentaphosphate erst bei pH-Werten von 4,75 und höher erreicht. Die beste Auftrennung wurde für die höheren Homologen (Ap<sub>4</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>5</sub>G) bei einem pH-Wert von 5,1 beobachtet (s. Abb. 3.21); es kam dabei allerdings zur Komigration der drei Diphosphate Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>2</sub>G und Gp<sub>2</sub>G. Durch weitere Erhöhung des pH-Wertes konnte die Auftrennung der Diphosphate wieder verbessert werden, eine vollständige Trennung aller drei Analyten wurde jedoch nicht erreicht. Darüber hinaus war die Abtrennung von Ap<sub>5</sub>G von Ap<sub>4</sub>A bzw. Ap<sub>5</sub>A bei höheren pH-Werten als ca. 5,25 problematisch.

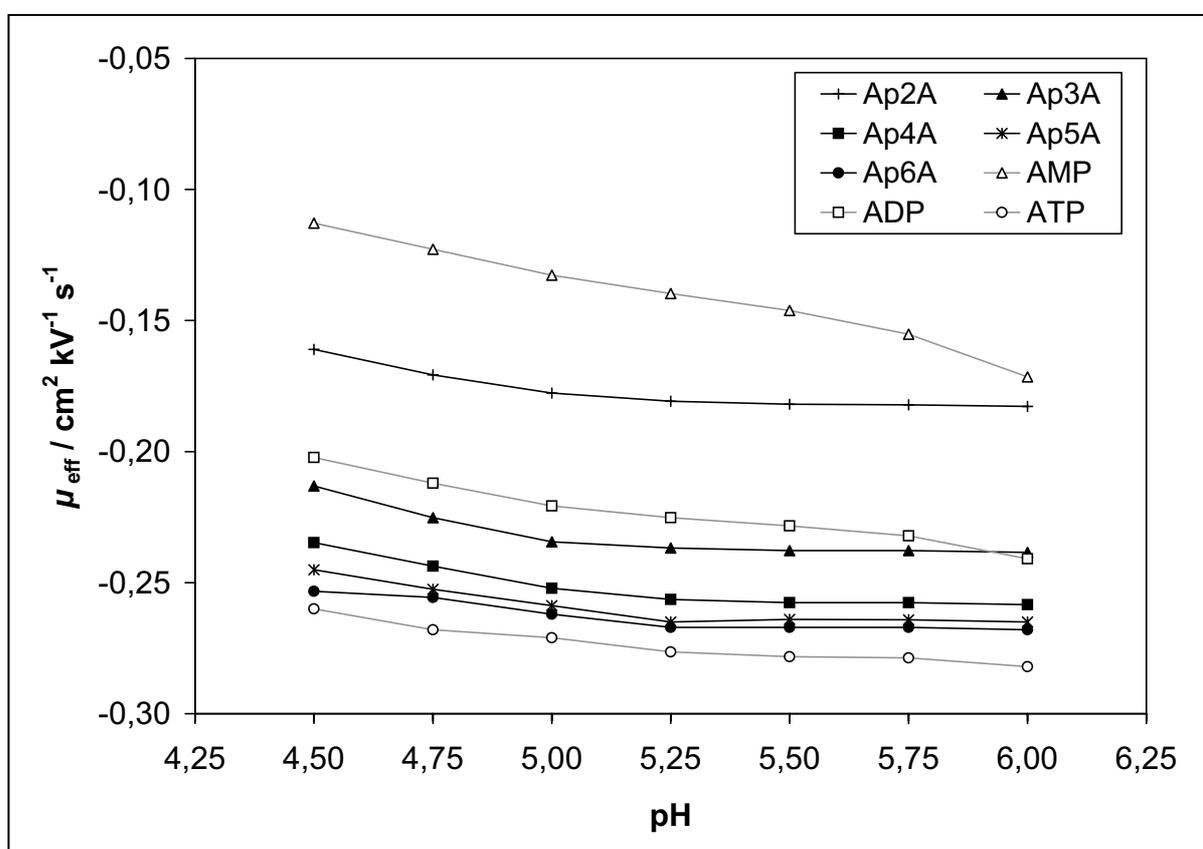


Abb. 3.20 Effektive Mobilitäten von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes unter Verwendung einer PAA-belegten Kapillare (Citratpuffer 50 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, Spannung -18,8 kV)

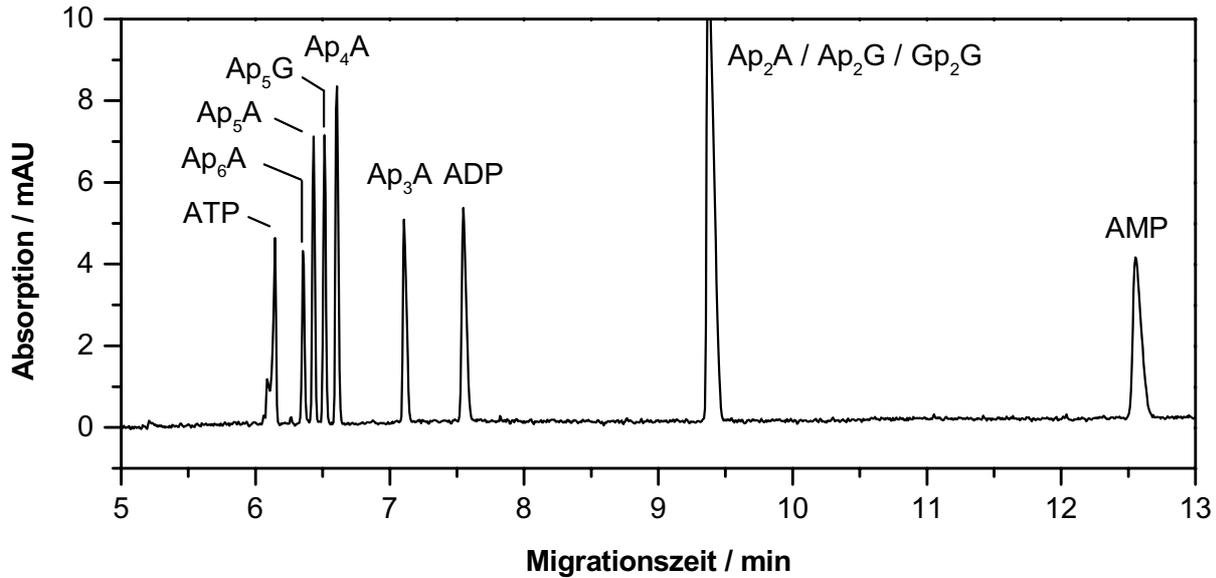


Abb. 3.21 Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  und einigen Guanosinderivaten in einer mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren bei pH 5,1 (Bedingungen s. Abb. 3.20)

Die hier in belegten Kapillaren erzielten Trennleistungen sind außerordentlich hoch. So liegen die aus Abb. 3.21 berechneten Werte für den Trennleistungsparameter  $N$  zwischen 550.000 für  $Ap_6A$  und 300.000 für  $Ap_2A$  und damit etwa um den Faktor zwei bis drei höher als in den Experimenten mit unbelegten Kapillaren. Diese Beobachtung lässt sich mit der Gleichung (3-1)

$$(3-1) \quad N = \frac{|\mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}}| \cdot U}{2 \cdot D}$$

$\mu_{\text{eff}}$	effektive Mobilität des Teilchens
$\mu_{\text{EOF}}$	Mobilität des EOF
$U$	angelegte Spannung
$D$	Diffusionskoeffizient

erklären.<sup>26</sup> Wird  $\mu_{\text{EOF}}$  durch die Belegung der Kapillare auf nahezu Null reduziert, nimmt der Ausdruck  $|\mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}}|$  aufgrund des negativen Vorzeichens von  $\mu_{\text{eff}}$  (die negativ geladenen Analyten wandern entgegen den EOF) größere Werte an. Damit steigt bei ansonsten gleichen experimentellen Parametern auch die Trennleistung  $N$  an.

Während sich das Fehlen des EOF in Bezug auf die Trennleistung als günstig erweist, ist es auf der anderen Seite problematisch für die Auflösung insbesondere der höhergeladenen Verbindungen. Ohne den gegenläufigen elektroosmotischen Fluss sind die *relativen* Mobilitätsdifferenzen der Analyten verringert und insbesondere für das

Peakpaar  $Ap_5A / Ap_6A$  trotz der außerordentlich hohen Trennleistung nur gerade eben für eine Trennung ausreichend. Aus diesem Grunde war auch eine Trennung von  $Ap_6A$ ,  $Ap_7A$  und  $Ap_8A$  in belegten Kapillaren nicht möglich.

Durch den fehlenden EOF bot sich in belegten Kapillaren die Möglichkeit, den Einfluss von Ionenstärke und elektrischer Feldstärke unbeeinflusst von einer gleichzeitigen Änderung des elektroosmotischen Flusses zu untersuchen.

Eine Erniedrigung der Ionenstärke von 50 auf 25 mmol/L bewirkte trotz leichter Verkürzung der Migrationszeiten eine Verbesserung der Auflösung vor allem der länger-kettigen Verbindungen. Gleichzeitig verringerte sich jedoch die Trennleistung um etwa 30 %. Umgekehrt führte eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf 100 mmol/L zu einer Verlängerung der Migrationszeiten unter gleichzeitigem Verlust an Auflösung; die Trennleistung verbesserte sich allerdings um etwa 25 %. Insgesamt gesehen stellte die ursprünglich verwendete Pufferkonzentration von 50 mmol/L – wie auch bereits in unbelegten Kapillaren – den besten Kompromiss dar.

Eine Verringerung der angelegten Spannung und damit der elektrischen Feldstärke führte durch die Verringerung der auf die Analyten wirkenden Kraft unmittelbar zu einer Verlängerung der Migrationszeiten. Allerdings wirkte sich die damit verbundene Zunahme der Migrationszeitdifferenzen nicht in einer verbesserten Auflösung der Analyten aus, denn gemäß Gleichung (3-1) ist die Trennleistung direkt proportional zur angelegten Spannung bzw. bei konstanter Kapillarlänge zur elektrischen Feldstärke. Bei Verringerung der Feldstärke sinkt also gleichzeitig die Trennleistung ab. In der Summe beider Effekte waren die Peaks zwar weiter voneinander entfernt, aber gleichzeitig breiter und schlechter getrennt.

Eine Verbesserung der Trennung konnte somit nur noch durch Verwendung einer längeren Kapillare erfolgen. Durch die längere Wegstrecke erhöhen sich die Migrationszeitdifferenzen, nach Gleichung (3-1) ist aber die Trennleistung im Gegensatz zur Chromatographie unabhängig von der Kapillarlänge und der Migrationszeit. Um die Migrationszeiten nicht übermäßig steigen zu lassen, wurde die Spannung gegenüber den kürzeren Kapillaren so erhöht, dass die elektrische Feldstärke näherungsweise konstant blieb. Für diese Untersuchung wurde außerdem ein pH-Wert von 6,0 gewählt, der den besten Kompromiss zwischen Trennung der Diphosphate einerseits und der länger-kettigen Verbindungen andererseits darstellte. Eine nahezu vollständige Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  und einigen Guanosinderivaten gelang bei einer effektiven Kapillarlänge von 70 cm bei einer Spannung von 30 kV in einem Puffer der Konzentration 100 mmol/L (s. Abb. 3.22). Die Werte für den Trennleistungsparameter  $N$

liegen im Bereich von 778.000 ( $\text{Ap}_6\text{A}$ ) bis 391.000 ( $\text{Ap}_2\text{A}$ ) und damit – aufgrund der erhöhten Spannung – sogar noch über den Werten für die kürzere Kapillare.

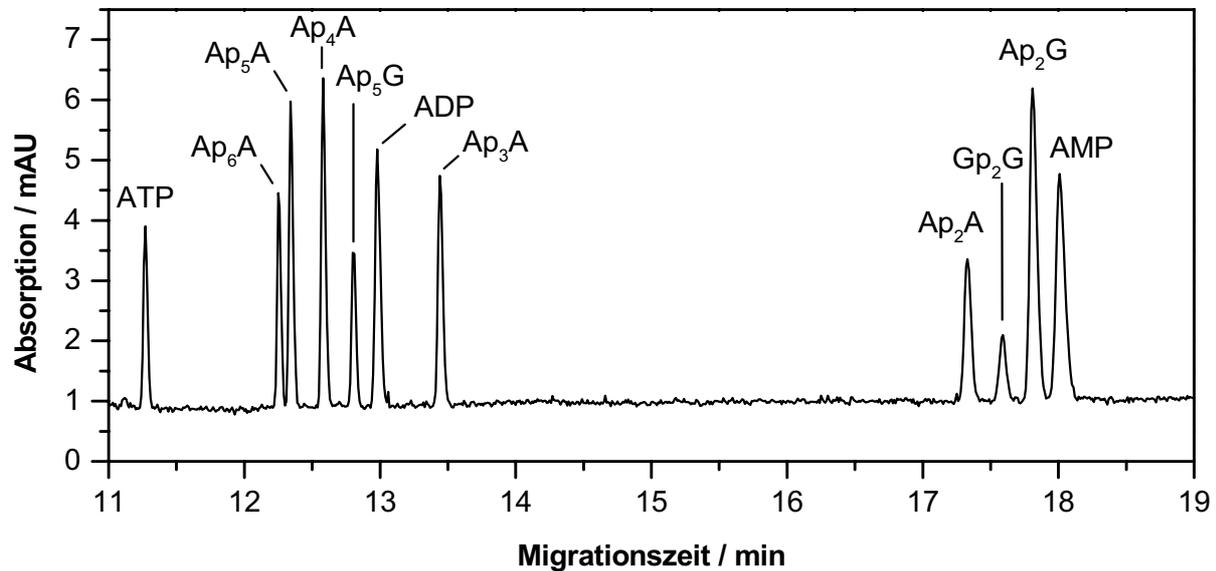


Abb. 3.22 Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  und einigen Guanosinderivaten in verlängerter Kapillare bei pH 6,0  
(Citratpuffer 100 mmol/L, Kapillare 70/77 cm PAA-belegt, Spannung -30 kV)

### 3.2.4.4 Zusammenfassung

Gegenüber dem Arbeiten in unbehandelten Kapillaren ergab sich durch die Belegung mit linearem Polyacrylamid eine starke Verbesserung sowohl der *intraday*- als auch der *interday*-Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten. Als ebenfalls völlig unproblematisch erwies sich die Reproduzierbarkeit der Belegung; die Unterschiede in den Migrationszeiten verschiedener Kapillaren lagen in der Regel deutlich unter 1 %.

Als weiterer Vorteil der belegten Kapillaren erwies sich die hervorragende Trennleistung mit Werten für den Trennleistungsparameter von ca. 300.000–500.000. Außerdem konnten auch bei pH-Werten > 5,5 die verschiedenen Dinukleosid-Diphosphate innerhalb von 15–20 Minuten detektiert werden, während in unbelegten Kapillaren die Migrationszeiten aufgrund des gegenläufigen EOF teilweise über 45 Minuten lagen oder die Verbindungen überhaupt nicht mehr detektiert werden konnten.

Allerdings wurden die genannten Vorteile erkauft mit einem Verlust an Auflösung insbesondere für die Penta- und Hexaphosphate. Trotz der extrem scharfen und schlanken Peaks waren die Migrationszeitdifferenzen mit vier bis fünf Sekunden zu gering, um eine vollständige Trennung der Analyten zu ermöglichen. Die Auflösung der Analyten

konnte nur durch Verwendung einer deutlich längeren Kapillare verbessert werden; allerdings lag das Trennergebnis immer noch unter dem einer unbelegten Kapillare. Zusammenfassend muss daher festgestellt werden, dass mit linearem Polyacrylamid belegte Kapillaren trotz der damit verbundenen Vorteile nicht für die Trennung aller Dinukleosidpolyphosphate geeignet sind.

### 3.2.5 Zusammenfassung der sauren und neutralen Puffersysteme

In schwach sauren Citratpuffern konnte eine sehr gute Trennung der Diadenosinphosphate  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$ , unter Verwendung des Ammoniumsalzes sogar bis  $Ap_8A$ , erzielt werden. Die Migrationszeiten bewegten sich unter 10 Minuten, der Trennleistungsparameter  $N$  lag zwischen 250.000 und 300.000 und erreichte damit sehr hohe Werte. Ebenfalls war es möglich, die Adenosindinukleotide von den entsprechenden Mononukleotiden AMP, ADP und ATP abzutrennen. Eine Trennung dieser Analyten in einem Phosphatpuffer war gelang ebenfalls, allerdings war die Trennleistung vor allem für die hochgeladenen Verbindungen  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  deutlich verschlechtert. Die zur Kopplung mit einem Massenspektrometer kompatiblen Trennsysteme mit flüchtigen Puffersalzen wiesen keine ausreichenden Trennleistungen auf.

Als problematisch beim Arbeiten im schwach sauren pH-Bereich erwies sich die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten. Bedingt durch den in diesem Bereich stark pH-abhängigen EOF waren aufwändige Spülprozeduren sowohl zwischen den Läufen als auch am Beginn eines jeden Tages notwendig, um die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten zumindest weitgehend in den Griff zu bekommen.

Größtes Problem des schwach sauren pH-Bereiches stellt jedoch die mangelnde Selektivität zwischen den Diadenosinverbindungen und ihren Guanosinderivaten dar. Es ist möglich, jedes beliebige Analytenpaar der Diadenosin-, Adenosin-Guanosin- und Diguanosinpolyphosphate durch die Wahl eines geeigneten pH-Wertes zu trennen. Die Mobilitätsunterschiede zwischen den Verbindungen mit gleicher Phosphatgruppenzahl sind allerdings zumeist nur minimal, da die Nukleobasen Adenin und Guanin in diesem pH-Bereich beide nahezu ungeladen vorliegen und die Mobilitätsunterschiede vermutlich nur auf leicht veränderter Raumstruktur beruhen. Eine gezielte Protonierung bzw. Deprotonierung einer der beiden Basen ist in diesem pH-Bereich nicht möglich, der Einfluss des pH-Wertes auf die Selektivität ist gering. Die selektive Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate ist somit in Gegenwart der Guanosinderivate nicht möglich, auch wenn die Proben – wie später für den alkalischen Bereich beschrieben – bei zwei

verschiedenen pH-Werten vermessen werden. Trennungen im schwach sauren pH-Bereich sind daher für die Analyse biologischer Proben, in denen viele verschiedene Dinukleotide vorkommen (können), nicht geeignet. Für die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der Ap<sub>n</sub>A aus Thrombozyten wurde daher dieser Bereich nicht mehr weiterverfolgt.

### 3.3 Alkalische Puffersysteme

Alkalische Puffersysteme sind für die kapillarelektrophoretische Trennung von Nukleotiden weit verbreitet.<sup>17</sup> Sie liefern einen stabilen elektroosmotischen Fluss; daher ist die Verwendung belegter Kapillaren oder umfangreicher Spülprozeduren zur Stabilisierung des EOF nicht nötig. Obwohl Nukleotide im allgemeinen bei hohen pH-Werten hydrolyseempfindlich sind, fanden sich weder hier noch in anderen Arbeiten Anzeichen von Abbauprodukten in den Elektropherogrammen.

Bei den hier untersuchten pH-Werten von über 8 ist davon auszugehen, dass die Phosphatgruppen der Mono- und Dinukleotide bereits vollständig deprotoniert sind. Die Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus dem Zuckerteil der Moleküle erfolgt erst bei pH-Werten von über 12, dürfte also im hier untersuchten Bereich bis etwa pH 10,5 nur einen sehr geringen Beitrag zur Gesamtladung der Moleküle leisten. Ein sehr wichtiges Selektivitätskriterium zur Trennung der Adenosin-Dinukleotide von ihren guanosin-haltigen Derivaten ist die bei etwa pH 8,5 einsetzende Deprotonierung der Guanin-partialstruktur ( $pK_s$  9,24<sup>17</sup>), die bei gleicher Länge der Phosphatkette bei den Guanosinderivaten zu einer größeren negativen Ladung als bei den Adenosin-Dinukleotiden führt.

Anders als beim Arbeiten im schwach sauren pH-Bereich ist der EOF bereits bei pH 8 so stark ausgeprägt, dass die Kapillarelektrophorese in Normalpolung ausgeführt werden kann, d. h. mit Probenaufgabe an der Anoden- bzw. Detektion an der Kathodenseite der Kapillare. Die Wanderung der Analyten zur Anode wird dabei durch den EOF überkompensiert. Außerdem ist die pH-Abhängigkeit des EOF im alkalischen Bereich nur noch sehr gering, so dass nach Konditionieren oder Spülen der Kapillare mit Lauge deutlich weniger Zeit zur Reäquilibrierung als mit sauren oder neutralen Puffern erforderlich ist.

Für den alkalischen Bereich konnte die effektive Mobilität der Analyten  $\mu_{\text{eff}}$  zur Charakterisierung des Migrationsverhaltens herangezogen werden. Dadurch war es möglich, den Einfluss des pH-Wertes oder der Ionenstärke unmittelbar und nicht nur kombiniert mit einer gleichzeitigen Beeinflussung des EOF zu untersuchen.

### 3.3.1 Borat-Puffer

Natriumborat ist der am häufigsten verwendete alkalische Puffer für die Trennung von Nukleotiden in der Kapillarelektrophorese.<sup>17</sup> Borsäure ist eine einbasige Lewis-Säure mit einem  $pK_S$ -Wert von 9,2,<sup>22</sup> besitzt also im hier untersuchten pH-Bereich von 8 bis 10,25 eine ausreichende Pufferkapazität. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurden sowohl Borsäure als auch Natriumtetraborat (Borax) für die Herstellung der Puffer verwendet. Beide Formen stehen in wässriger Lösung in einem von der Ausgangssubstanz unabhängigen Gleichgewicht. Dabei ist ein Molekül Borax vier Molekülen Borsäure äquivalent.

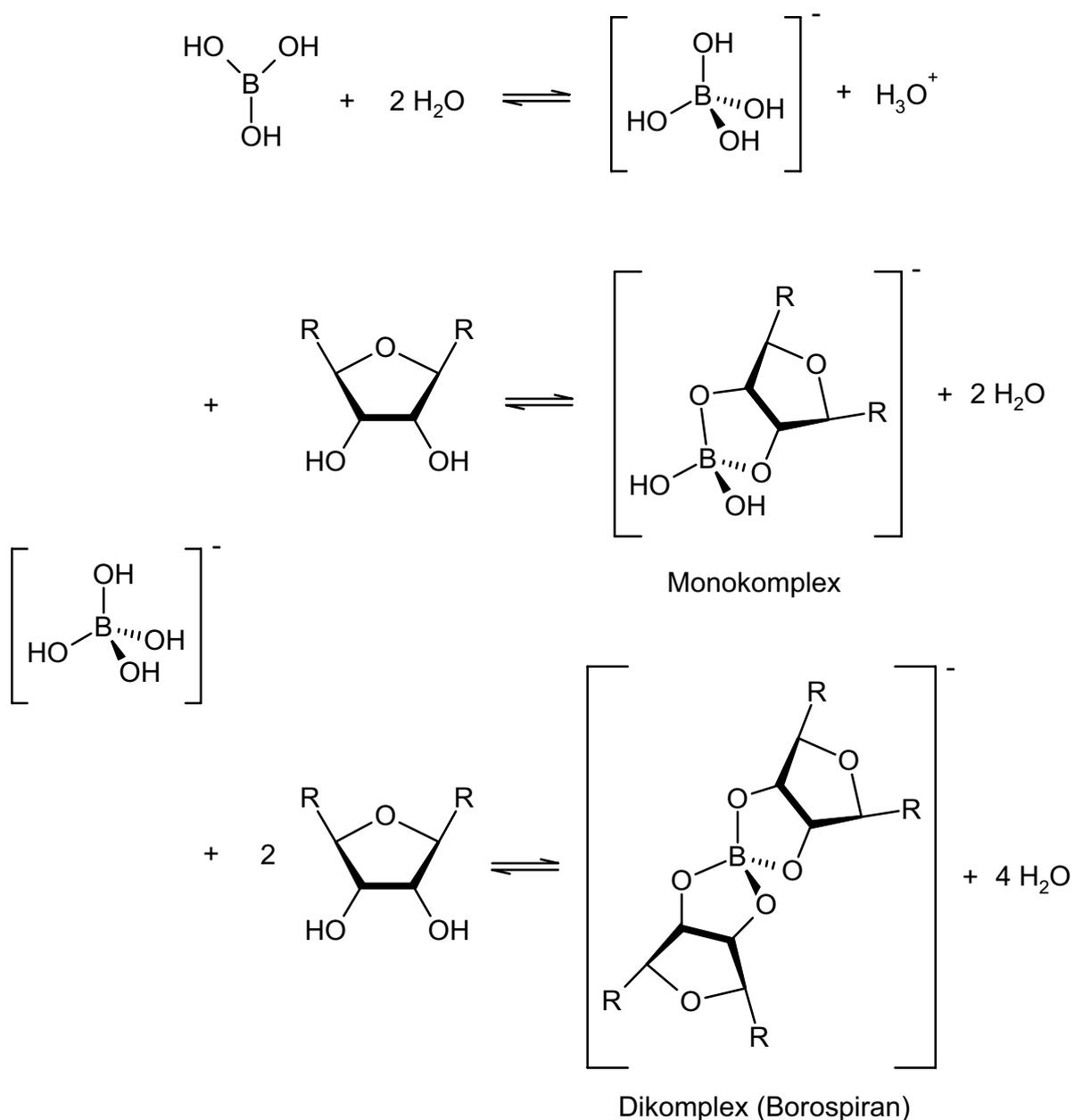


Abb. 3.23 Bildung einer Borylesterbindung mit *cis*-Diolen

Eine wichtige Eigenschaft der Borsäure besteht darin, mit Molekülen, die vicinale *cis*-Dirole enthalten, kovalente Addukte, sog. Borylester, zu bilden.<sup>28</sup> Eine solche *cis*-Diol-Struktur ist in Form der Ribose sowohl in den untersuchten Mono- als auch in den Dinukleotiden enthalten. Der Ablauf einer solchen Borylesterbildung ist in Abb. 3.23 dargestellt. Dabei besteht in der Literatur noch keine Einigkeit darüber, ob es bei den Dinukleotiden zur Ausbildung eines separaten Borylesters an jeder Ribose kommt (Monokomplex) oder ob die beiden Ribosestrukturen über ein einziges Boratom unter Bildung eines Borospirans miteinander verknüpft werden (Dikomplex). Obwohl Bor in einem solchen unimolekularen Borospiran eine wesentlich höhere Bindungskonstante als in zwei einzelnen Monokomplexen haben dürfte, gibt es Hinweise dafür, dass zumindest bei höheren Borkonzentrationen zwei Boratome je Dinukleotid gebunden werden.<sup>22</sup>

In einer solchen Borylesterbindung ist der  $pK_S$ -Wert der Borsäure auf ca. 6 erniedrigt,<sup>22</sup> so dass in alkalischen Puffern das Bor nahezu ausschliesslich in der tetraedrischen, negativ geladenen Boratform  $[B(OR)_4]^-$  vorliegt und somit die negative Ladung der Dinukleotide weiter erhöht ist. Die Auswirkungen der Esterbildung auf das Migrationsverhalten der Analyten lässt sich allerdings nicht einfach aus einer bloßen Betrachtung der Ladungsänderung ableiten, da anzunehmen ist, dass die Bildung des Borylesters auch eine Änderung der dreidimensionalen Struktur der Analyten und damit des Stokes-Radius hervorruft.

In der Literatur ist die Bildung der Borsäureester mit den Diadenosinpolyphosphaten bereits ausführlich untersucht worden.<sup>22</sup> Dabei wurde eine Sättigung mit Bor für  $Ap_2A$ ,  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$ ,  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  bei Borsäurekonzentrationen von 20,6, 13,0, 8,3, 6,5 bzw. 5,4 mmol/L gefunden. Bei den hier verwendeten Pufferkonzentrationen von 150 bis 250 mmol/L dürften also alle Analyten nahezu vollständig als Borylester vorliegen.

In Abb. 3.24 ist das Migrationsverhalten für  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  sowie die Adenosin-Mononukleotide in einem pH-Bereich von 8,25 bis 10,25 dargestellt. Im Vergleich zur entsprechenden Abbildung in sauren oder carbonat-alkalischen Puffern (s. Abb. 3.5 bzw. Abb. 3.27) fallen sofort die irreguläre Migrationsreihenfolge sowie die unterschiedliche pH-Abhängigkeit der effektiven Mobilität für die einzelnen Dinukleotide auf; insbesondere  $Ap_6A$  zeigt ein ganz anderes Migrationsmuster als die anderen Vertreter. Während bei pH 8,25 die Migrationsreihenfolge noch  $Ap_4A - Ap_5A - Ap_2A - Ap_3A - Ap_6A$  ist, hat sich bereits bei pH 9,1 die Abfolge zu  $Ap_5A - Ap_4A - Ap_6A - Ap_2A - Ap_3A$  geändert. Da die effektive Mobilität in einem nicht-komplexierenden alkalischen Puffer wie Carbonat nahezu unabhängig vom pH-Wert ist und außerdem

eine reguläre Migrationsreihenfolge beobachtet wird (s. Abb. 3.27), muss das hier festgestellte Verhalten der Analyten mit der Bildung der Borylester zusammenhängen. Da bei der hohen Boratkonzentration im Puffer – wie oben beschrieben – bereits alle Nukleotide als Borylester vorliegen sollten, können die Wechsel in der Migrationsreihenfolge mit zunehmendem pH-Wert nicht mit der unterschiedlichen Boraffinität der Moleküle erklärt werden und müssen daher als bisher nicht exakt zu erklärendes Phänomen zur Kenntnis genommen werden. Die beobachtete irreguläre Migrationsreihenfolge könnte vielleicht auf dem komplexen Wechselspiel zwischen Zuwachs der Ladung und des Stokes-Radius beruhen, die beide entgegengesetzte Wirkungen auf die Mobilität ausüben. Ähnliche Beobachtungen wurden für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>5</sub>A bereits von MEDDA et al. gemacht.<sup>28</sup>

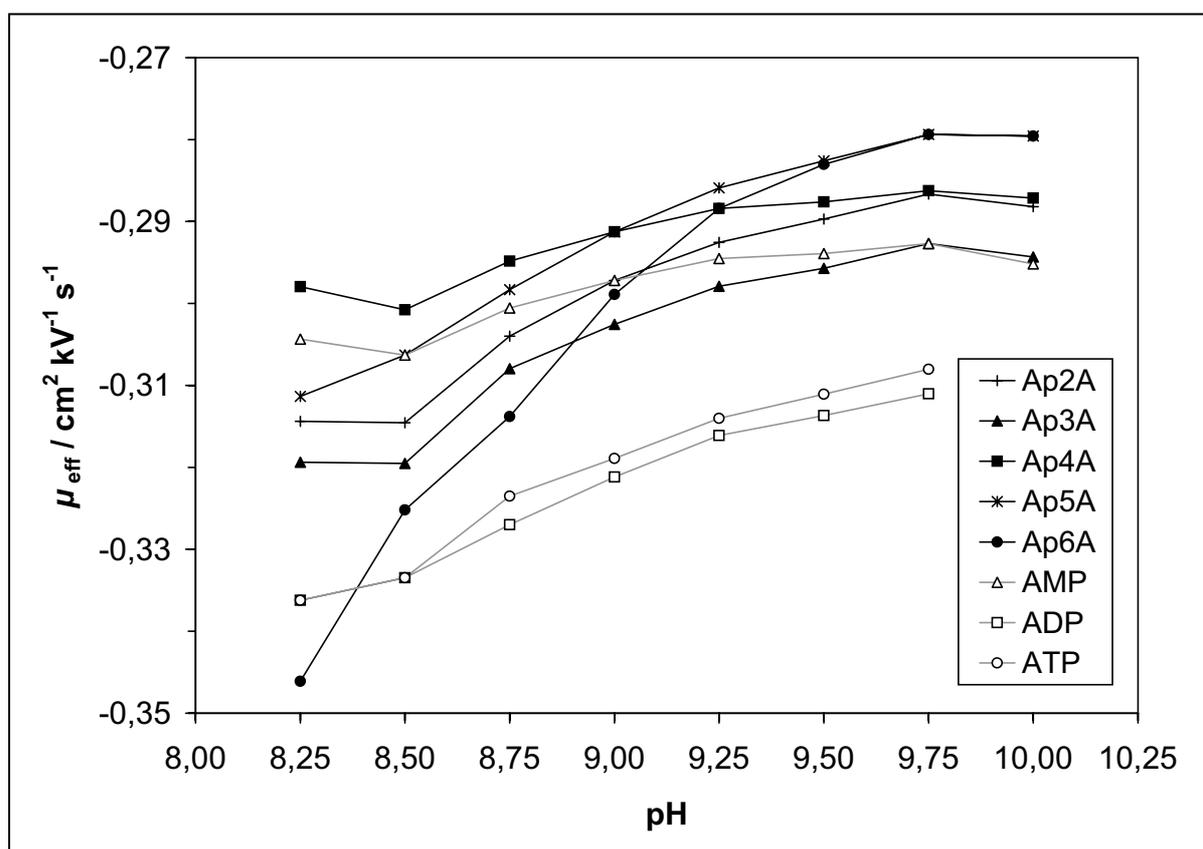


Abb. 3.24 Effektive Mobilitäten von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes  
(Puffer Borsäure 200 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, Spannung +20 kV)

Eine nahezu vollständige Trennung aller in Abb. 3.24 abgebildeten Analyten gelang nur bei einem pH-Wert von 9,4 und ist in Abb. 3.25 dargestellt. Bei allen anderen untersuchten pH-Werten kam es zumindest zur teilweisen Überlappung von zwei oder mehr Substanzen. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Puffersystemen bereitete die Trennung von  $\text{Ap}_5\text{A}$  bis  $\text{Ap}_8\text{A}$  im Boratpuffer keine Schwierigkeiten, allerdings kam es zur Komigration mit  $\text{Ap}_2\text{A}$  ( $\text{Ap}_7\text{A}$ ) bzw.  $\text{Ap}_3\text{A}$  ( $\text{Ap}_8\text{A}$ ), so dass eine gleichzeitige Auftrennung der vollständigen homologen Reihe der Diadenosinpolyphosphate auch in diesem Puffersystem nicht möglich war. Als problematisch erwiesen sich wieder die Peakformen der beiden längsten Homologen  $\text{Ap}_7\text{A}$  und  $\text{Ap}_8\text{A}$ . Für  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  lagen die Werte für den Trennleistungsparameter zwischen 140.000 bis 200.000 und damit in einem akzeptablen Bereich (s. Abb. 3.26), wenn auch leicht unter den Werten für den Citratpuffer.

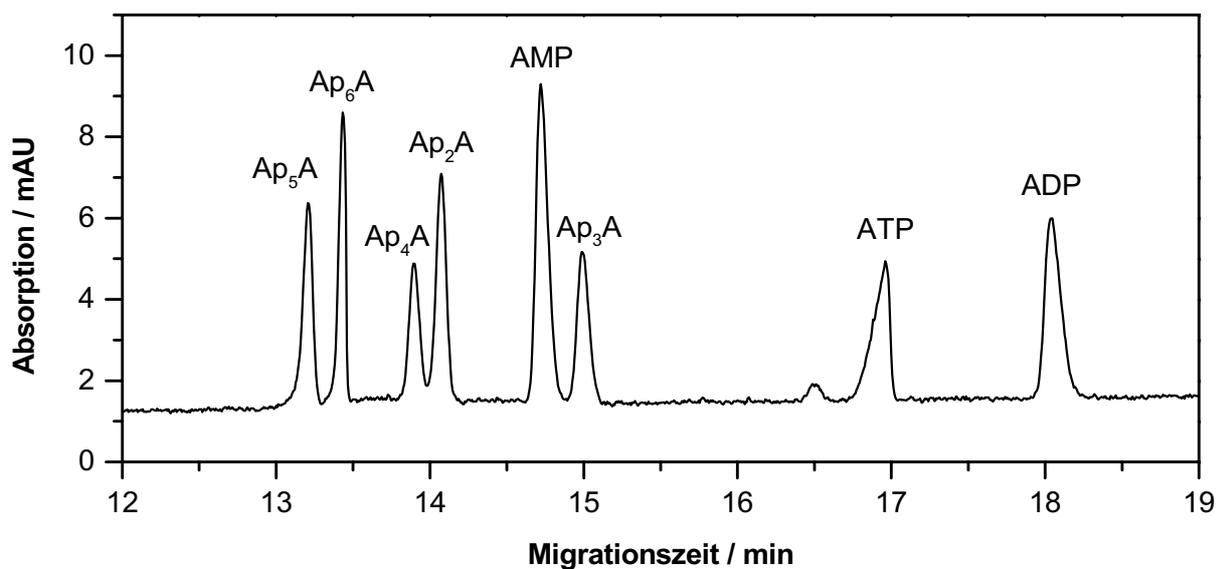


Abb. 3.25 Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  sowie AMP / ADP / ATP bei pH 9,4  
(Bedingungen s. Abb. 3.24)

Der Einfluss der Ionenstärke auf die Trennung wurde in einem Bereich von 50 bis 300 mmol/L bei einem pH von 9,4 untersucht. Gegenüber der Ausgangsbasis von 200 mmol/L bewirkte eine Erniedrigung der Ionenstärke zum einen eine Verstärkung des EOF und damit eine Verkürzung der Migrationszeiten. Zusätzlich kam es bei 100 mmol/L zu einer Änderung der Migrationsreihenfolge bei  $\text{Ap}_4\text{A}$  und  $\text{Ap}_6\text{A}$ , bis bei einer Pufferkonzentration von 50 mmol/L Komigration von  $\text{Ap}_5\text{A}$  mit  $\text{Ap}_4\text{A}$  bzw.  $\text{Ap}_6\text{A}$  mit  $\text{Ap}_2\text{A}$  eintrat. Eine Erhöhung der Ionenstärke auf 300 mmol/L verbesserte bei aufgrund des schwächeren EOF leicht erhöhten Migrationszeiten die Auflösung

vor allem der nur knapp getrennten Peakpaare  $Ap_2A / Ap_4A$  bzw.  $AMP / Ap_3A$ . Leider war aber der Peak von  $Ap_6A$  unter diesen Bedingungen völlig deformiert und nicht mehr integrierbar. Als bester Kompromiss muss also die bereits in den ersten Untersuchungen verwendete Pufferkonzentration von 200 mmol/L angesehen werden.

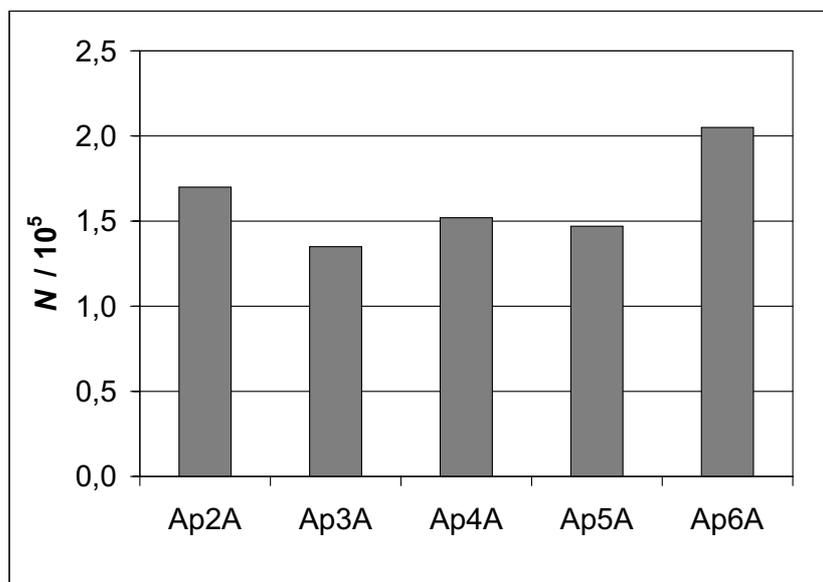


Abb. 3.26 Trennleistungsparameter  $N$  für die Trennung in Abb. 3.25

Bei dem zur Trennung der Adenosin-Verbindungen geeigneten pH von 9,4 wurde keine Selektivität zwischen adenin- und guaninhaltigen Verbindungen beobachtet. Es kam beispielsweise zur Komigration von  $Ap_5A$  mit  $Ap_5G$  bzw. von  $Ap_2A$  mit  $Ap_2G$  und  $Gp_2G$ . Eine Trennung dieser Verbindungen ließ sich aufgrund des dann stärker deprotonierten Guaninrestes im pH-Bereich von 10,0–10,5 erreichen, allerdings war dann keine vollständige Trennung der Diadenosinphosphate mehr möglich.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass sich in Boratpuffern zwar die Diadenosinpolyphosphate mit zwei bis sechs Phosphatgruppen trennen ließen, aber keine Möglichkeit gefunden werden konnte, auch die länger-kettigen Verbindungen bzw. die Guanosinderivate abzutrennen. Aus diesem Grunde wurden die Boratpuffer in der Methodenentwicklung nicht mehr weiterverfolgt

### 3.3.2 Carbonat-Puffer

Obwohl noch nicht so weit verbreitet wie die Natriumborat-Puffer, werden Natrium- oder Ammoniumcarbonat-Puffer für die kapillarelektrophoretische Trennung von Nukleotiden immer beliebter, da sie eine stabile Basislinie und ausreichende Auflösung für viele Fragestellungen bieten.<sup>17,44</sup> Durch die Flüchtigkeit von Ammoniumcarbonat ist es auch möglich, für die Kopplung mit der Massenspektrometrie geeignete Trennsysteme zu entwickeln.

Kohlensäure ist eine zweibasige Säure mit den  $pK_S$ -Werten 6,4 und 10,3.<sup>45</sup> In saurer Lösung liegt das Gleichgewicht jedoch weitgehend auf der Seite von physikalisch gelöstem und damit flüchtigem  $CO_2$ , so dass Carbonatpuffer nur im Bereich etwa von pH 9–11 sinnvoll als Puffer eingesetzt werden können.

#### 3.3.2.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat

Wie für die anderen untersuchten Puffersysteme wurde auch hier zunächst das Migrationsverhalten der Analyten in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (s. Abb. 3.27). Dabei wurde Natriumcarbonat eingesetzt. Die Wahl der anderen Versuchsparameter (Kapillarlänge, Ionenstärke, Feldstärke) orientierte sich dabei an vergleichbaren Arbeiten aus der Mononukleotid-Analytik.<sup>44</sup>

Im Gegensatz zum Boratpuffer ist die Migrationsreihenfolge im nicht komplexierenden Carbonatpuffer über den gesamten untersuchten pH-Bereich regulär, d. h. die Analyten wandern in der Reihenfolge zunehmender Phosphatgruppenzahl. Dabei besitzt das Homologe mit der kürzesten Phosphatkette ( $Ap_2A$ ), also mit dem kleinsten  $q/m$ -Verhältnis, die größte scheinbare Mobilität und damit die kürzeste Migrationszeit aller  $Ap_nA$ , da seine Wanderungsgeschwindigkeit gegen den EOF am kleinsten ist.

Wie Abb. 3.27 zeigt, gelingt eine Trennung von  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  bei pH-Werten von 10,0 oder höher. Im gesamten pH-Bereich von 9–11 werden dabei nur geringfügige Veränderungen der effektiven Mobilitäten beobachtet. Dies weist darauf hin, dass bei den hier untersuchten pH-Werten keine weitere Abspaltung eines Protons vom Phosphatrückgrat erfolgt, also bereits bei pH 9 alle Phosphatgruppen der Moleküle dissoziiert sind. Die negative Ladung der Moleküle dürfte also der jeweiligen Zahl an Phosphatgruppen entsprechen.

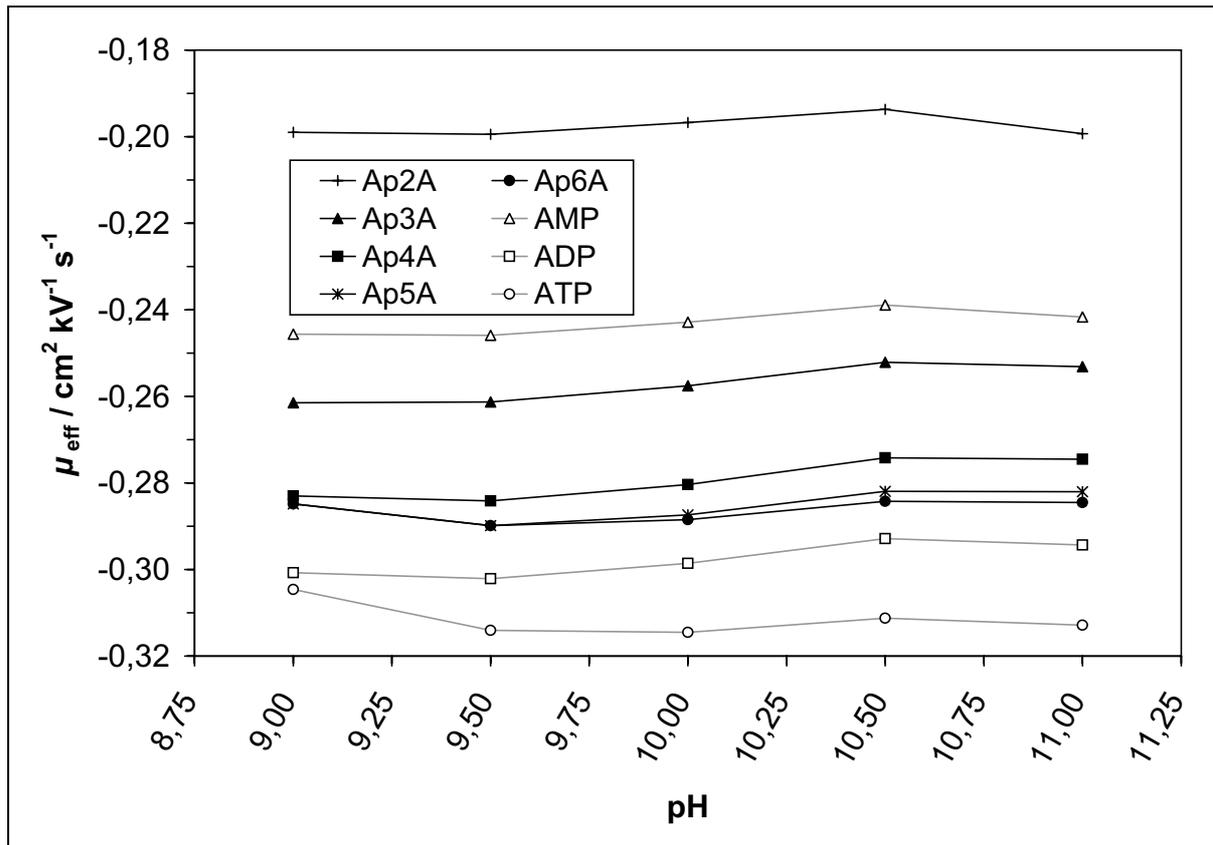


Abb. 3.27 Effektive Mobilitäten von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes  
(Natriumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV)

Wie bereits für saure Puffersysteme in Kap. 3.2.1.1 diskutiert, werden die Mobilitätsdifferenzen zwischen den homologen Dinukleotiden immer kleiner, da die Differenzen der  $q/m$ -Verhältnisse mit zunehmender Phosphatgruppenzahl immer geringer werden. Aufgrund der bekannten Ladung der Moleküle ist es nun möglich, für jedes Diadenosinpolyphosphat aus der effektiven Mobilität den entsprechenden Stokes-Radius  $r_S$  zu berechnen. Diese Berechnung erfolgte unter Anwendung der aus grundlegenden Beziehungen der Kapillarelektrophorese abgeleiteten Gleichung (3-2).

$$(3-2) \quad r_S = \frac{z \cdot q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \mu_{\text{eff}}}$$

$z$	Ladung des Teilchens
$q$	Elementarladung ( $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ )
$\eta$	Viskosität des Wassers ( $8,95 \cdot 10^{-4} \text{ N s m}^{-2}$ )
$\mu_{\text{eff}}$	effektive Mobilität des Teilchens

Das Ergebnis ist in Tab. 3.3 dargestellt.

	<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>
Ladung	-2	-3	-4	-5	-6
Stokes-Radius (Å)	9,80	11,30	13,85	16,85	20,10
$\Delta$ Stokes-Radius (Å)	1,50	2,55	3,00	3,25	

Tab. 3.3 Biophysikalische Parameter der Diadenosinpolyphosphate

Die Veränderung der Stokes-Radien folgt keiner einfachen Regel – die Zunahme des Stokes-Radius ist nämlich umso größer, je länger das Phosphat-Rückgrat der Dinukleotide ist. Diese Beobachtung dürfte auf den abstoßenden Wechselwirkungen zwischen den negativen Ladungen der Polyphosphatkette beruhen, die umso größer sind, je mehr Phosphatgruppen im Molekül vorhanden sind. In Gegenwart von zwei Phosphaten können die negativ geladenen Gruppen eine *trans*- und damit kompakte Konformation einnehmen, während für länger-kettige Verbindungen die abstoßenden Kräfte die Polyphosphatkette in einer zunehmend raumerfüllenderen Konformation anordnen sollten.<sup>28</sup> Dieses Verhalten spiegelt sich praktisch in einer schwierigeren Trennung der höheren Homologen wieder, da Veränderungen des Stokes-Radius die Mobilität mehr als Ladungsveränderungen beeinflussen.

In Abb. 3.28 sind Auflösung und Trennleistungsparameter für die am schwierigsten zu trennenden Analyten Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Eine vollständige Trennung dieser beiden Substanzen ist etwa ab pH 10,3 möglich; als am besten geeignet stellte sich pH 10,5 heraus. Während die Trennleistung für Ap<sub>5</sub>A nahezu unabhängig vom pH-Wert ist, ergibt sich für Ap<sub>6</sub>A ein Maximum etwa bei pH 10,0; bei höherem oder niedrigerem pH-Wert verringert sich die Trennleistung, ist jedoch stets gleich gut oder sogar besser als für Ap<sub>5</sub>A.

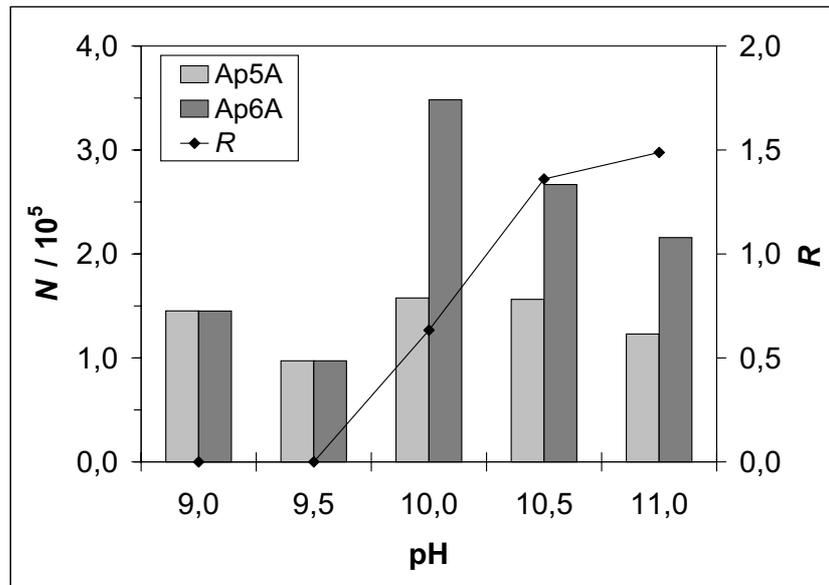


Abb. 3.28 Auflösung und Trennleistungsparameter von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes

(Natriumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV)

Die Trennungsspannung wurde im Bereich 18–28 kV variiert. Während sich mit zunehmender Feldstärke die Migrationszeit verkürzte, wurde die Trennleistung von der Spannungsänderung nur geringfügig beeinflusst und blieb nahezu konstant. Die Auflösung verringerte sich trotz der deutlichen Migrationszeitverkürzung nur leicht, war aber bei höheren Spannungen aufgrund der nur knappen Trennung von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  nicht mehr für eine vollständige Trennung ausreichend. Eine Spannung von +18 kV war somit für das Natriumcarbonat-System optimal.

Der Einfluss der Temperatur wurde im Bereich von 20–30 °C untersucht. Mit zunehmender Temperatur kam es aufgrund der Viskositätsabnahme und der darauf beruhenden Zunahme des EOF zu einer Verkürzung der Migrationszeiten. Da sich gleichzeitig die Trennleistung verschlechterte (möglicherweise durch eine Erhöhung der Diffusion bedingt), nahm die Auflösung vor allem für das Peakpaar  $Ap_5A / Ap_6A$  deutlich ab und war schließlich nicht mehr für eine vollständige Trennung ausreichend. Daher wurde die bisher verwendete Temperatur von 20 °C beibehalten.

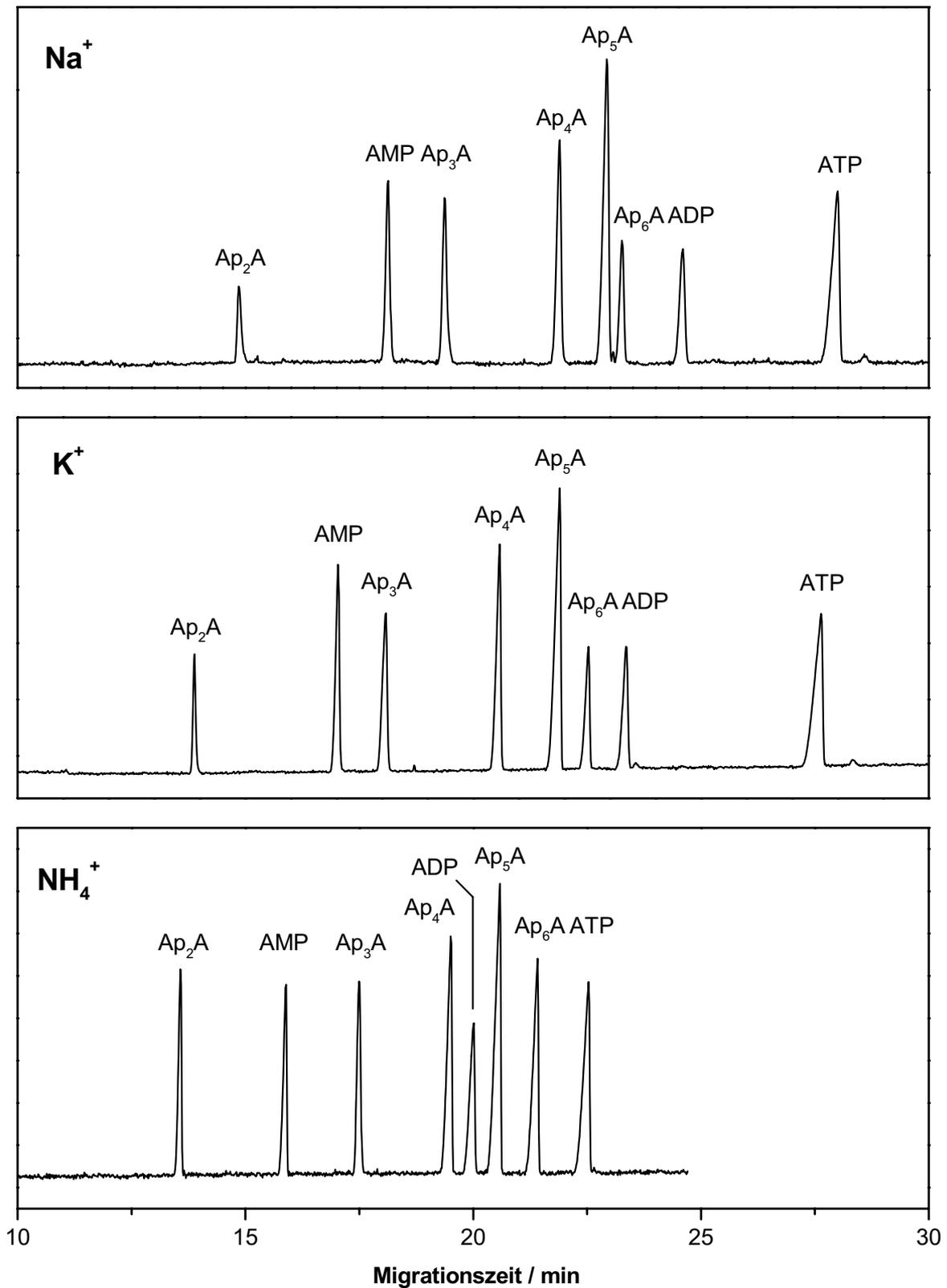


Abb. 3.29 Einfluss des Puffer-Gegenions auf die Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie AMP / ADP / ATP

(Carbonatpuffer 50 mmol/L pH 10,5 eingestellt mit NaOH, KOH bzw. NH<sub>4</sub>OH, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV)

Wie bereits in Kap. 3.2.1.2 für den Citratpuffer beschrieben, wurde auch für den Carbonatpuffer der Einfluss des Pufferkations auf die Trennung untersucht. Neben dem Natriumsalz kamen dabei auch Kalium- sowie Ammoniumcarbonat zum Einsatz. Die sich mit den verschiedenen Puffersystemen ergebenden Trennungen sind in Abb. 3.29 einander gegenübergestellt. Der pH-Wert wurde für alle Systeme auf den für Natriumcarbonat optimalen Wert von 10,5 eingestellt.

Für *Kaliumcarbonat* fallen im Vergleich zu Natriumcarbonat die leicht verkürzten Migrationszeiten vor allem im vorderen Bereich des Elektropherogramms sowie die deutlich gesteigerte Selektivität zwischen  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  auf. Die Migrationsreihenfolge ist gegenüber Natriumcarbonat unverändert.

Beim Einsatz von *Ammoniumcarbonat* ist die Selektivität zwischen  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  nochmals deutlich erhöht. Das hier erzielte Ergebnis stellt die beste bisher für  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  erzielte Trennung dar. Interessanterweise hat sich auch die Migrationsreihenfolge verändert: ADP migriert nun zwischen  $Ap_4A$  und  $Ap_5A$  anstatt hinter  $Ap_6A$  wie bisher. Außerdem ist ATP deutlich näher an  $Ap_6A$  herangerückt. Die Migrationszeiten sind gegenüber dem kaliumhaltigen System nochmals verkürzt.

Der Grund für diese Beobachtungen dürfte – wie bereits in Kap. 3.2.1.2 diskutiert – in den unterschiedlichen taxigenen Eigenschaften von Natrium-, Kalium- und Ammoniumionen und den dadurch bedingten Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur der Mono- und Dinukleotide zu suchen sein.

Da das Ammoniumcarbonat-System das für die Trennung der Diadenosinpolyphosphate am besten geeignete System darstellt und sich die Migrationseigenschaften der Analyten zum Teil deutlich von denen in Natrium- oder Kaliumcarbonatpuffern unterscheiden, wurde erneut die effektive Mobilität in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes untersucht (s. Abb. 3.30). Wie auch für die anderen Puffer ist die Migrationsreihenfolge über den gesamten Bereich regulär und es treten keine Änderungen der Migrationsreihenfolge auf. Die effektiven Mobilitäten sind nahezu konstant, die Kurven in Abb. 3.30 verlaufen parallel.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Trennleistung ist abhängig von der Länge der Phosphatkette im Molekül (vgl. Abb. 3.31): Für das Di- und Triphosphat werden die höchsten Werte bei pH 9,0, für das Penta- und Hexaphosphat bei pH 10,5 erreicht. Die Trennleistung für  $Ap_4A$  ist nahezu unabhängig vom pH-Wert. Im gesamten Bereich von pH 9,5–10,5 liegen jedoch alle  $N$ -Werte oberhalb von ca. 120.000 und damit in einem für erfolgreiche Trennungen ausreichenden Bereich.

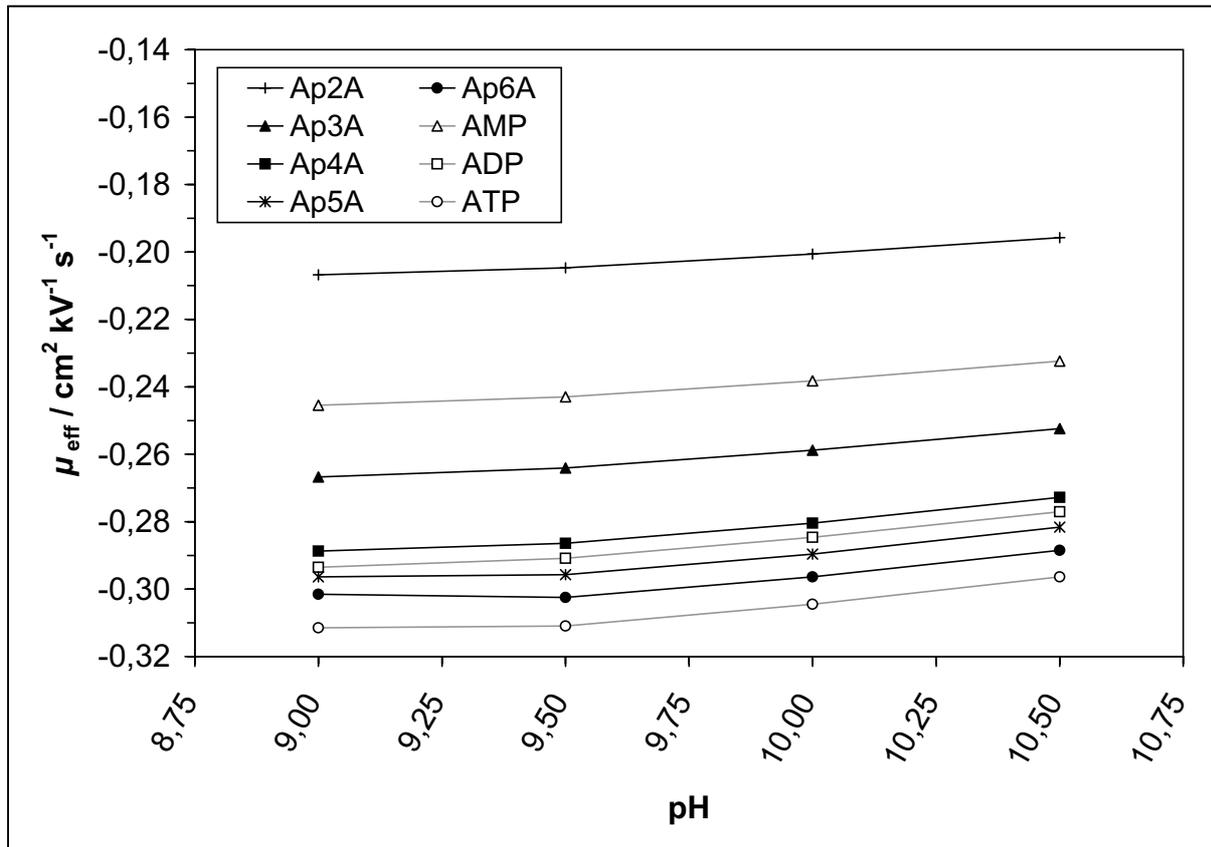


Abb. 3.30 Effektive Mobilitäten von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes  
(Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

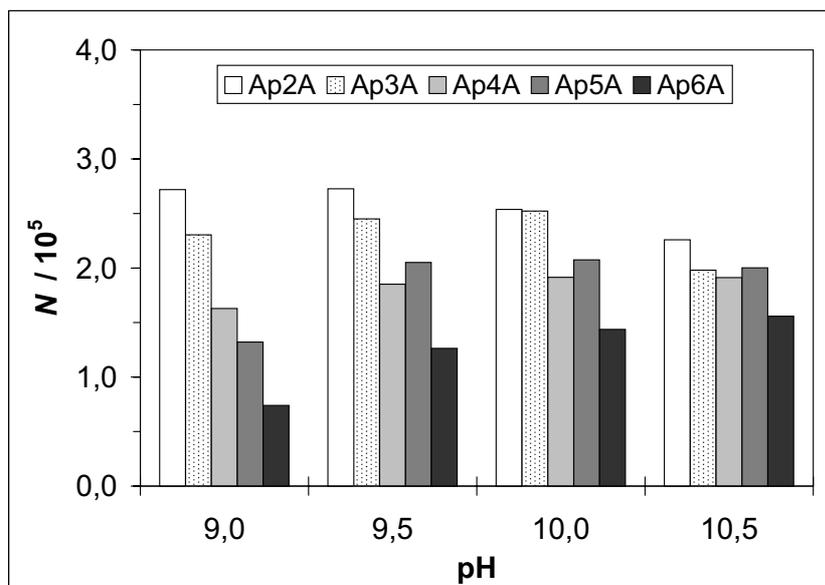


Abb. 3.31 Trennleistungsparameter für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes  
(Bedingungen s. Abb. 3.30)

Die Ionenstärke des Ammoniumcarbonat-Puffers wurde bei pH 9,5 im Bereich von 25–75 mmol/L variiert. Bei einer Verringerung der Pufferkonzentration verkürzten sich die Migrationszeiten durch den zunehmenden EOF; Selektivität und Auflösung sanken deutlich ab. Ap<sub>4</sub>A, ADP, Ap<sub>5</sub>A sowie Ap<sub>6</sub>A konnten nicht mehr vollständig getrennt werden. Durch eine Erhöhung der Ionenstärke konnten Selektivität und Auflösung gesteigert werden, allerdings verlängerten sich auch die Migrationszeiten. Die Trennleistung wurde durch die Salzkonzentration im Puffer nur geringfügig beeinflusst. Für weitere Untersuchungen wurde die ursprüngliche Pufferkonzentration von 50 mmol/L beibehalten, da die kürzeren Migrationszeiten eine niedrigere Nachweisgrenze in biologischen Proben erwarten lassen und die Auflösung für eine vollständige Trennung bereits mehr als ausreichend ist.

Gegenüber den Versuchen mit Natriumcarbonat wurde die Trennungsspannung auf 20 kV erhöht, um die Analysenzeiten kurz zu halten. Bei noch höheren Spannungen wurde teilweise eine unruhige Basislinie beobachtet, die möglicherweise auf ein Ausgasen des Puffers durch die Joule'sche Wärme in der Kapillare zurückzuführen ist.

Bei pH-Werten von über 9 ist die pH-Abhängigkeit des EOF nur noch sehr gering ausgeprägt.<sup>26</sup> Dadurch konnten reproduzierbare Migrationszeiten mit verhältnismäßig einfachen Spülprozeduren erzielt werden. So wurden die Kapillaren nach dem Einbau bzw. zu Beginn jedes Tages 10 Minuten mit 1 M-Natronlauge aktiviert, gefolgt von ein oder zwei Läufen unter Trennbedingungen; zwischen den einzelnen Läufen erfolgte ein Spülschritt bestehend aus 3 Minuten 0,1 M-Natronlauge und 5 Minuten Trennpuffer. Sollte die dadurch erzielte Migrationszeitkonstanz für ein späteres Arbeiten mit biologischen Proben nicht ausreichend sein, kann die Reproduzierbarkeit durch die Verwendung *relativer* Migrationszeiten bzw. der effektiven Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  weiter gesteigert werden.<sup>46-48</sup>

In Carbonatpuffern zeigte sich ein mit steigender Phosphatgruppenzahl der Analyten zunehmendes Fronting der Peaks. Dies dürfte auf die im Vergleich zu den (Di-)Nukleotiden geringere Eigenmobilität des Carbonations zurückzuführen sein.<sup>26</sup> Durch die höhere Mobilität der Analyten im Vergleich zum Puffer ist die elektrische Feldstärke in der Probenzone niedriger als in der Pufferzone. Wenn ein Probenteilchen in die vordere Pufferzone diffundiert, wird seine Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund der dort herrschenden höheren Feldstärke gesteigert. Umgekehrt wird ein in die hintere Pufferzone eintretendes Teilchen solange beschleunigt, bis es wieder die Probenzone erreicht. Daher kommt es zur Ausbildung eines diffusen Peakansangs sowie eines scharfen Peakendes, der Peak zeigt ein Fronting.

### 3.3.2.2 Guanosin-Derivate

Die Acidität der Guanin-Partialstruktur ( $pK_s$  9,24) im Vergleich zu Adenin lässt für den pH-Bereich von 9–10,5 Selektivität zwischen den Diadenosinpolyphosphaten und ihren Guanosinderivaten erwarten.

Das Verhalten der Adenosin-Guanosin- bzw. der Diguanosin-Dinukleotide wurde nur im Ammoniumcarbonat-Puffer untersucht, da dieses System die besten Ergebnisse bezüglich der Diadenosinverbindungen zeigte. Das entsprechende  $\mu(\text{pH})$ -Diagramm ist in Abb. 3.32 dargestellt. Im Gegensatz zu den Diadenosin-Verbindungen (vgl. Abb. 3.30) wird die effektive Mobilität der guanosinhaltigen Verbindungen durch die Deprotonierung des Guanins mit steigendem pH-Wert zunehmend negativer. Der Einfluss des pH-Wertes ist dabei auf die Diguanosinverbindungen stärker als auf die Adenosin-Guanosin-Dinukleotide. Die Migrationsreihenfolge ist wie auch für die  $\text{Ap}_n\text{A}$  regulär – Wechsel der Migrationsreihenfolge innerhalb einer Substanzklasse werden nicht beobachtet.

Durch dieses Verhalten ist es nun möglich, jedes beliebige Peakpaar aus den drei Gruppen  $\text{Ap}_n\text{A}$ ,  $\text{Ap}_n\text{G}$  und  $\text{Gp}_n\text{G}$  nur durch die Wahl eines geeigneten pH-Wertes zu trennen. Die Abtrennung eines  $\text{Ap}_n\text{A}$  von seinen Guanosinderivaten gleicher Phosphatkettlänge gelingt dabei zuverlässig oberhalb eines pH-Wertes von etwa 9,5. Allerdings ist es möglich, dass bei einem bestimmten pH-Wert beispielsweise  $\text{Ap}_4\text{G}$  mit  $\text{Ap}_5\text{A}$  komigriert. Aus diesem Grunde gelingt es nicht, *alle* Analyten – also  $\text{Ap}_n\text{A}$ ,  $\text{Ap}_n\text{G}$  und  $\text{Gp}_n\text{G}$  mit  $n = 2\text{--}6$  sowie AMP / ADP / ATP – simultan in einem Lauf vollständig zu trennen, es kommt immer zur Komigration von mindestens zwei Verbindungen. Leider ist auch nicht möglich, in einem derart komplexen Gemisch zumindest die Diadenosinderivate vollständig zu bestimmen.

Durch die konstanten Mobilitäten der  $\text{Ap}_n\text{A}$  und die starke pH-Abhängigkeit der Mobilitäten der  $\text{Ap}_n\text{G}$  und  $\text{Gp}_n\text{G}$  gelingt es aber, mindestens die Diadenosinpolyphosphate durch die Vermessung ein- und derselben Probe bei verschiedenen pH-Werten zu analysieren. Diese pH-Werte müssen in Abhängigkeit der jeweiligen Probenzusammensetzung individuell bestimmt werden. Ziel dabei ist es, jeden interessierenden Analyten bei wenigstens einem pH-Wert selektiv, also ohne störende Komigration, erfassen zu können. Beispiele für die Anwendung dieser Technik sowie entsprechende Pherogramme sind in Kap. 4 dargestellt. Die Vermessung einer Probe bei verschiedenen pH-Werten kann hier im alkalischen Bereich sehr einfach durchgeführt werden, da die pH-Abhängigkeit des EOF nur noch sehr gering ist und damit auf auf-

wändige Spül- bzw. Reäquilibrierungsprozeduren zwischen Puffern verschiedener pH-Werte verzichtet werden kann.

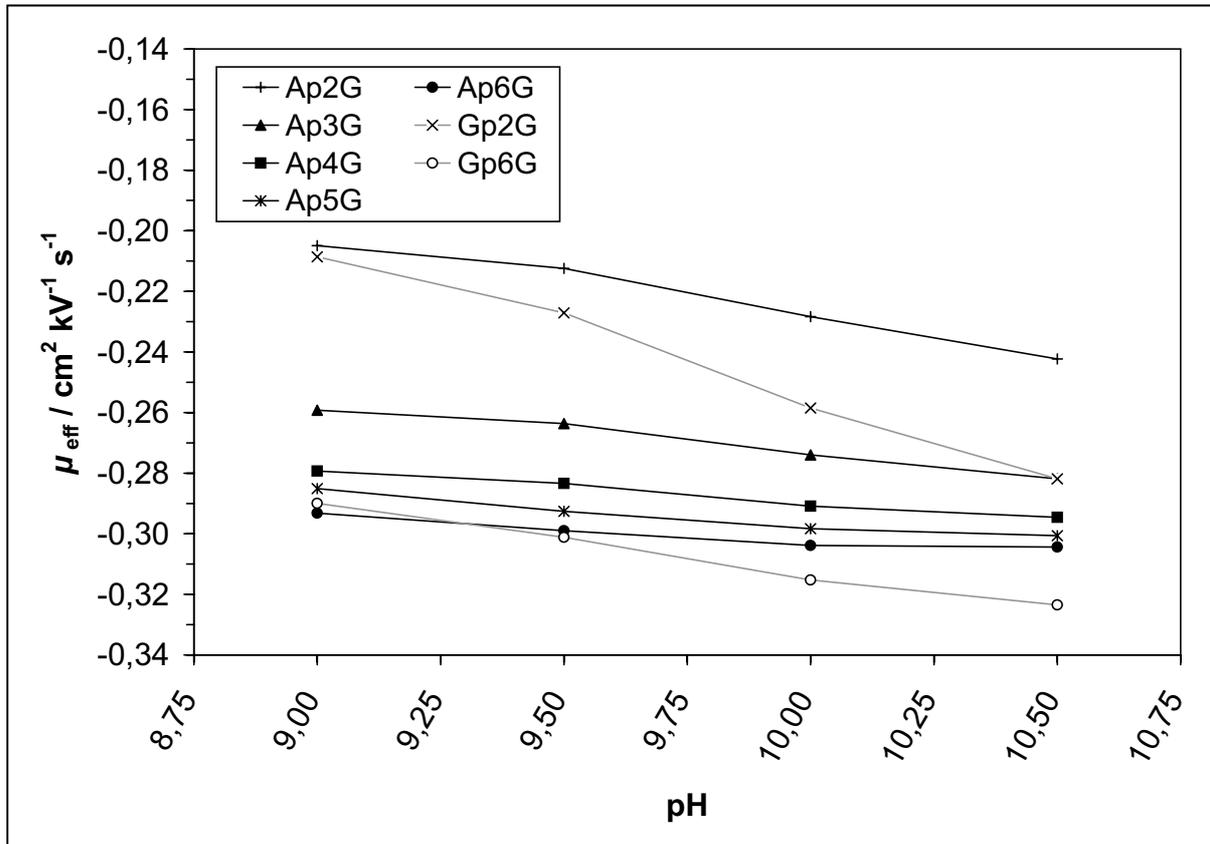


Abb. 3.32 Effektive Mobilitäten der Adenosin-Guanosin- bzw. Diguanosinpolyphosphate (Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

Die unterschiedliche, sehr charakteristische pH-Abhängigkeit der Mobilitäten für die einzelnen Substanzklassen stellt außerdem eine sehr gute Möglichkeit dar, die Analyten in realen Proben durch Migrationszeitvergleiche bzw. Coinjektion zu identifizieren. Davon wurde bei der Untersuchung realer Proben häufig Gebrauch gemacht (vgl. Kap. 4).

### 3.3.2.3 Diadenosinhepta- und -octaphosphat

Eine Trennung von  $Ap_6A$  bis  $Ap_8A$  war unabhängig vom pH-Wert weder in einem Natrium- noch in einem Kaliumcarbonatpuffer möglich; es wurde nicht einmal eine Antrennung beobachtet.

In einem Ammoniumcarbonat-Puffer der Konzentration 50 mmol/L konnte  $Ap_8A$  gut von den anderen Homologen abgetrennt werden; leider kam es zur Komigration von

Ap<sub>6</sub>A und Ap<sub>7</sub>A. Durch Erhöhung der Ionenstärke auf 75 mmol/L konnte zumindest eine Antrennung dieser beiden Verbindungen erreicht werden (vgl. Abb. 3.33), eine Basislinientrennung von Ap<sub>5</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A wurde jedoch in keinem Fall erreicht.

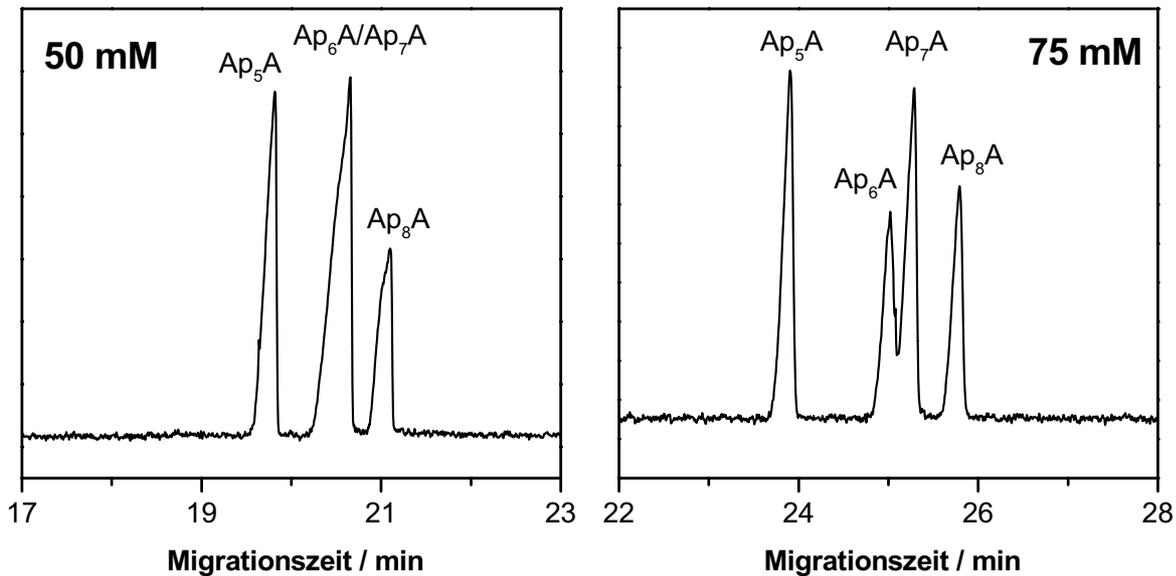


Abb. 3.33 Trennung von Ap<sub>5</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A in Ammoniumcarbonat-Puffern pH 9,5 verschiedener Ionenstärke  
(Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

### 3.3.3 Validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in wässrigen Lösungen

Im Hinblick auf eine spätere Quantifizierung der Dinukleosidpolyphosphate aus biologischem Material war es notwendig, zunächst eine validierte Bestimmung für Standardsubstanzen aus wässrigen Probenlösungen zu entwickeln, um den Gehalt der vorhandenen Stocklösungen korrekt bestimmen zu können.

Basis der Quantifizierung bildete eine Ap<sub>3</sub>A-Lösung definierter Konzentration, die durch Einwaage von kommerziell erhältlichem Diadenosintriphosphat gewonnen wurde. Andere Ap<sub>n</sub>A konnten zu diesem Zeitpunkt nicht in für eine exakte Wägung ausreichender Menge käuflich erworben werden. Mangels anderer Alternativen wurde daher vorausgesetzt, dass der Absorptionskoeffizient für alle Diadenosinpolyphosphate (und mangels Referenzstandard auch für die Guanosinderivate) näherungsweise gleich ist. Dieses Vorgehen wird durch Angaben in der Literatur gestützt, wonach sich die Absorptionskoeffizienten der einzelnen Ap<sub>n</sub>A und Gp<sub>n</sub>G nur um maximal 10 Prozent unterscheiden.<sup>19</sup>

Für die Bestimmung aus wässrigen Lösungen kam ein Ammoniumcarbonat-Puffer pH 9,9 der Konzentration 50 mmol/L zum Einsatz. Die übrigen Bedingungen sind im entsprechenden Kapitel des experimentellen Teils beschrieben.

Als interner Standard (IS) wurde Nicotinamid-adenin-dinukleotid in seiner oxidierten Form ( $\text{NAD}^+$ ) verwendet. Dieses Molekül besitzt große strukturelle Ähnlichkeit mit den Analyten, wird aber durch die zusätzliche positive Ladung des Nicotinamid-Rings gut von den anderen Dinukleotiden abgetrennt. Außerdem kann  $\text{NAD}^+$  in hochreiner, kristalliner Form erworben werden. Während der gesamten Validierung wurden auch für  $\text{NAD}^+$  unter den alkalischen Bedingungen keine Zersetzungsprodukte beobachtet.

Die Kalibration erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 2,0 bis 200  $\mu\text{g/mL}$  (entsprechend 2,6–264,4  $\mu\text{mol/L}$ )  $\text{Ap}_3\text{A}$ . Im einzelnen wurden folgende Konzentrationsstufen verwendet:

2,0	4,0	8,0	20,0	40,0	80,0	120,0	200,0	$\mu\text{g/mL}$
2,6	5,3	10,6	26,4	52,9	105,8	158,6	264,4	$\mu\text{mol/L}$

Jede Konzentrationsstufe wurde dabei dreimal vermessen. Die Auswertung erfolgte durch ungewichtete lineare Regression des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen von Analyt und internem Standard, multipliziert mit der Konzentration des IS in  $\mu\text{g/mL}$ , ( $y$ ) über der  $\text{Ap}_3\text{A}$ -Konzentration in  $\mu\text{mol/L}$  ( $x$ ). Dabei ergab sich folgende Regressionsgerade:

$$y = 0,9348 x - 0,2432 ; \quad r = 0,99974$$

Aus dieser Kalibrierfunktion errechnet sich dann die Konzentration der Analyten gemäß der Gleichung:

$$c [\mu\text{mol/L}] = 1,0697 \left( \frac{A_{\text{corr}}(\text{Analyt}) \cdot c(\text{IS}) [\mu\text{g/mL}]}{A_{\text{corr}}(\text{IS})} + 0,2432 \right)$$

Die sich aus dieser Regression ergebenden Residuen sind zusammen mit dem sog. *Responseplot* (d. h. Auftragung des Signal/Konzentrations-Verhältnisses über der Konzentration) in Abb. 3.34 dargestellt.

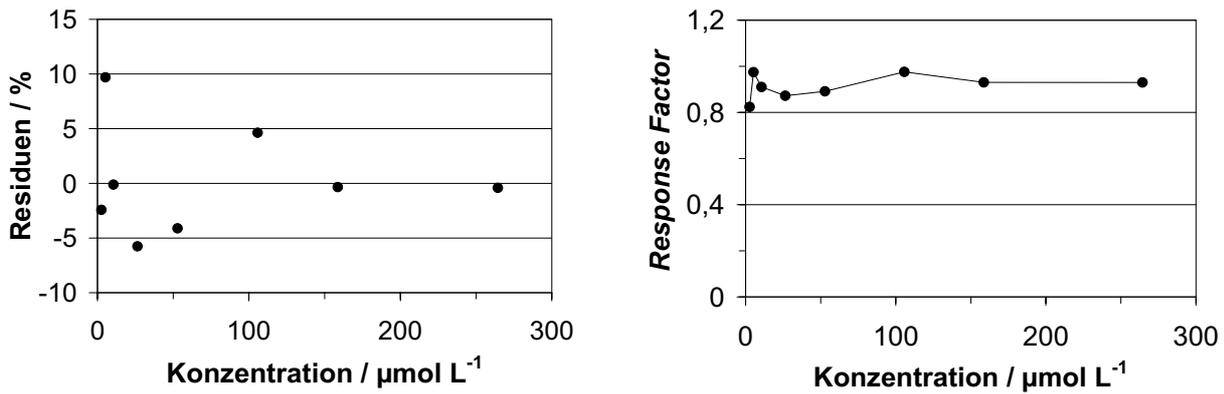


Abb. 3.34 Residuen und *Responseplot* für die Kalibration

Für die 18 Läufe der Kalibrierung wurde die Konstanz der Migrationszeiten untersucht. Für Ap<sub>3</sub>A schwankten die Migrationszeiten mit einer relativen Standardabweichung von 1,02 % um den Mittelwert 16,0 Minuten. Wurde anstelle der absoluten Migrationszeit die effektive Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  zur Charakterisierung des Migrationsverhaltens herangezogen, konnte die relative Standardabweichung auf 0,49 % reduziert werden. Durch die Verwendung von  $\mu_{\text{eff}}$  gehen die (geringen) Schwankungen des EOF nicht mehr in die Betrachtung ein.

Für die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit wurden insgesamt fünf Konzentrationsstufen (2, 4, 20, 100 und 160 µg/mL) an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils sechsmal analysiert. Die Probenlösungen wurden dabei an jedem Tag neu aus einer gemeinsamen Stocklösung hergestellt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Die sich aus den Läufen zu Präzision / Richtigkeit ergebenden Schwankungen der Migrationszeiten zeigt Tab. 3.5. Wie bereits bei der Kalibrierung gezeigt, können die Schwankungen durch Betrachtung von  $\mu_{\text{eff}}$  anstelle der absoluten Migrationszeit deutlich, d. h. um den Faktor 2–4, reduziert werden.

<b>Konzentration Ap<sub>3</sub>A in µg/mL</b>					
	2,0	4,0	20,0	100,0	160,0
<b>Richtigkeit (Abweichung vom Sollwert in %, arithmetisches Mittel)</b>					
Tag 1 (n = 6)	+2,8	-2,4	-2,5	+1,6	+3,1
Tag 2 (n = 6)	-2,5	-2,5	-1,2	-6,1	-3,5
Tag 3 (n = 6)	-2,7	-1,8	-1,4	-5,7	-2,3
Tage 1–3 (n = 18)	+1,1	-2,4	-2,0	+3,1	+0,9
<b>Präzision (relative Standardabweichung in %)</b>					
Tag 1 (n = 6)	9,2	5,9	4,8	6,6	6,3
Tag 2 (n = 6)	9,7	4,9	4,2	7,7	1,2
Tag 3 (n = 6)	5,6	9,1	5,5	3,1	1,1
Tage 1–3 (n = 18)	9,3	5,3	4,4	6,9	5,9

Tab. 3.4 Bestimmung von Präzision und Richtigkeit

	relSDV $t_m$	relSDV $\mu_{\text{eff}}$
Tag 1 (n = 30)	1,7 %	0,4 %
Tag 2 (n = 30)	4,1 %	0,9 %
Tag 3 (n = 30)	4,4 %	0,5 %
Tage 1–3 (n = 90)	3,5 %	0,7 %

Tab. 3.5 Relative Standardabweichungen von Migrationszeit und effektiver Mobilität für Ap<sub>3</sub>A bei der Bestimmung von Präzision und Richtigkeit

Die Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) dieser Methode wurde auf 2 µg/mL Ap<sub>3</sub>A (entsprechend 2,6 µmol/L Dinukleotid) festgelegt. Diese Konzentrationsstufe konnte nach Tab. 3.4 noch mit akzeptablen Werten für Präzision und Richtigkeit bestimmt werden. Ein beispielhaftes Pherogramm für den LOQ ist in Abb. 3.35 gezeigt. Weiterhin wurde die Nachweisgrenze, (*limit of detection*, LOD) auf 30 % des LOQ, also 0,78 µmol/L Dinukleotid festgelegt.

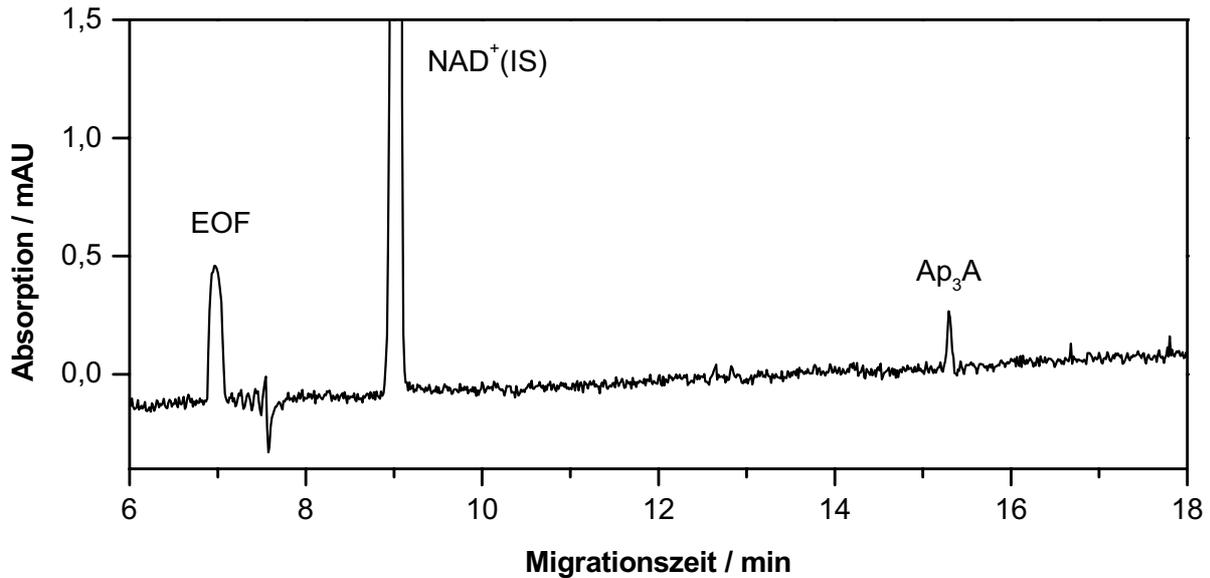


Abb. 3.35 Elektropherogramm einer Kalibrationslösung am LOQ (Ap<sub>3</sub>A-Konzentration 2,6  $\mu\text{mol/L}$ )

### 3.3.4 Zusammenfassung alkalische Puffersysteme

Wie bereits in schwach sauren Citratpuffern konnte auch in alkalischen Carbonatpuffern eine sehr gute Trennung der Diadenosinphosphate Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowohl untereinander als auch von den entsprechenden Mononukleotiden AMP, ADP, ATP erzielt werden. Die besten Ergebnisse ergaben sich dabei wieder bei Verwendung des Ammoniumsalzes. Eine vollständige Trennung bis hin zu Ap<sub>8</sub>A war jedoch im Gegensatz zu den sauren Puffern nicht möglich. Die Migrationszeiten der Analyten bewegten sich im Bereich von 10 bis 30 Minuten, der Trennleistungsparameter  $N$  erreichte Werte von 100.000 bis 240.000. Damit ist die Trennleistung im Vergleich zu schwach sauren Citratpuffern zwar geringer, aber für eine erfolgreiche Trennung der Analyten ausreichend. Durch die Flüchtigkeit von Ammoniumcarbonat sollte das entwickelte Trennsystem auch zur Kopplung mit der Massenspektrometrie geeignet sein. Der sinnvolle Einsatz eines Boratpuffers war aufgrund der Bildung von Borylestern mit den Analyten und des sich daraus ergebenden komplexen, irregulären Migrationsverhaltens nicht möglich.

Durch die bei pH-Werten  $> 9$  nur noch sehr gering ausgeprägte pH-Abhängigkeit des EOF wurden reproduzierbare Migrationszeiten auch ohne die Anwendung aufwändiger Spülprozeduren erreicht. Die Reproduzierbarkeit kann bei Bedarf durch die Verwendung relativer Migrationszeiten oder der effektiven Mobilitäten anstelle der normalen Migrationszeiten weiter gesteigert werden.

Im Gegensatz zu den sauren Puffersystemen bereitet die Trennung von adenin- und guaninhaltigen Verbindungen bei alkalischen pH-Werten keine Schwierigkeiten, sondern gelingt zuverlässig bei pH-Werten oberhalb 9,5. Leider ist es jedoch auch hier nicht möglich, alle  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  (mit  $n = 2-6$ ) in einem Lauf simultan zu bestimmen. In Abhängigkeit der jeweiligen Probenzusammensetzung kann man jedoch zumindest die Diadenosinphosphate durch Vermessen der Proben bei zwei (oder mehr) verschiedenen pH-Werten quantifizieren. Dabei wird jeder Analyt bei mindestens einem pH-Wert selektiv, also ohne störende Komigration, bestimmt. Ein Wechsel des pH-Wertes ist hier im alkalischen Bereich wegen des konstanten EOF sehr einfach durchführbar.

In einem Ammoniumcarbonat-Puffer gelang die validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate aus wässriger Lösung mit dem internen Standard  $NAD^+$ .

Basierend auf den mit Ammoniumcarbonat-Puffern entwickelten Methoden wurden nachfolgend Diadenosinpolyphosphate und ihre Guanosinderivate in humanen Thrombozytenproben bestimmt.

### 3.4 Einsatz von Magnesium-Ionen als Komplexbildner

Wie bereits in Kap. 3.2.1.1 diskutiert wurde, beruht eine Trennung in der Kapillaronenelektrophorese auf unterschiedlichen  $q/m$ - (genauer  $q/r_S$ -) Verhältnissen der Analyten. Sind die Unterschiede im  $q/m$ -Verhältnis wie bei  $Ap_6A$ ,  $Ap_7A$  und  $Ap_8A$  für eine Auftrennung zu gering, kann die Selektivität durch Änderung von pH-Wert bzw. Ionenstärke des Puffers oder der elektrischen Feldstärke nicht mehr weiter gesteigert werden. Eine Möglichkeit, in solchen Fällen eine Trennung der Analyten zu erreichen, besteht in der Einführung zusätzlicher Selektivitätskriterien wie zum Beispiel komplexierenden Pufferzusätzen, mit denen die einzelnen Analyten in unterschiedlichem Ausmaß in Wechselwirkung treten. Da die Mobilität eines Komplexes von der Lage des Komplexbildungs-Gleichgewichtes abhängt, können die vorher komigrierenden Analyten so getrennt werden. Dieses Prinzip bildet beispielsweise auch die Grundlage für den Einsatz von Cyclodextrinen als Pufferzusatz in der Kapillarelektrophorese. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Magnesium-Ionen auf die Trennung der Diadenosinpolyphosphate untersucht.

Die Wechselwirkung von Nukleotiden und Nukleinsäuren mit Metallkationen wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben.<sup>49,50</sup> Für die Adenosin-Mononukleotide

nimmt dabei die Komplexstabilität in der Reihe Ba<Sr<Ca<Mg<Mn<Co<Zn<Ni<Cu zu. Die Wechselwirkung der Nukleotide mit den Metallionen findet dabei zumindest im Falle des Magnesiums nur an der Phosphatkette und nicht an der Nukleobase selbst statt. Durch die zunehmende Zahl der Donorgruppen nimmt daher auch die Stabilität der Magnesium-Komplexe in der Reihe AMP<ADP<ATP zu. Durch kapillarelektrophoretische Untersuchungen konnten CAHOURS und Mitarbeiter zeigen, dass mit Magnesium- und Calciumionen im Falle von Adenosindiphosphat bei pH 4–8 1:1-Komplexe entstehen; Adenosintriphosphat bildet mit diesen Ionen bei pH 4 ebenfalls 1:1-, bei pH 8 dagegen 1:2-Komplexe aus.<sup>51</sup>

In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für den Einsatz von Metallionen zur kapillarelektrophoretischen Trennung von Nukleotiden: KAWAMURA gelang die Trennung von stellungsisomeren Adenin-Dinukleotiden durch Einsatz eines SDS-, Mg<sup>2+</sup>- sowie cyclodextrinhaltigen Puffers.<sup>52</sup> CAHOURS und Mitarbeiter beschrieben sowohl die Trennung von Nukleosidtriphosphaten alleine als auch die simultane Trennung von Nukleosidmono-, -di- und -triphosphaten in einem Ammoniumcitrat-Puffer pH 5.<sup>24,53</sup> Als Selektor kamen dabei 20 mmol/L Mg<sup>2+</sup> bzw. 2 mmol/L Cd<sup>2+</sup> zum Einsatz. Zur Erzielung kurzer Analysenzeiten sowie zur Vermeidung der Metalladsorption an der Kapillare wurde die Kapillarwand dynamisch mit dem Polykation Hexadimethrinbromid belegt und dadurch ein anodischer EOF erzeugt. In den Versuchen von CAHOURS waren dabei die Magnesium-Ionen in der Lage, die Basenselektivität zu beeinflussen, ohne an die Base selbst zu binden.

Die Wechselwirkung von Adenosin- und Guanosindinukleotiden mit Metallionen ist ebenfalls bereits gut untersucht.<sup>19,20,54,55</sup> So konnte gezeigt werden, dass Dinukleosidphosphate mindestens zwei Bindungsstellen, davon eine mit hoher Affinität, für Magnesium- und Zink-Ionen aufweisen. Die Stabilität des gebildeten Komplexes hängt dabei sowohl von den Nukleobasen als auch von der Zahl der Phosphatgruppen im Dinukleotid ab: Mit zunehmender Länge der Phosphatkette nimmt die Stabilität der gebildeten Komplexe zu ( $pK_{\text{Stab}}(\text{Ap}_2\text{A}) = 2,0$ ;  $pK_{\text{Stab}}(\text{Ap}_6\text{A}) = 6,1$  in 10 mmol/L-TRIS-Puffer pH 8); guanosinhaltige Verbindungen bilden etwas stabilere Komplexe als die Adenosinderivate. Im Falle des Magnesiums erfolgt dabei die Wechselwirkung mit den Dinukleotiden wiederum nur an der Phosphatkette und nicht an der Nukleobase. Für Ap<sub>4</sub>A wurde durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchungen die Bildung eines 1:1-Komplexes mit Magnesium unter Beteiligung der β-Phosphate nachgewiesen. Die Bindung des Metallions beeinflusst die elektrostatischen Wechselwirkungen und damit die Sekundärstruktur der Moleküle. Die Auswirkungen auf die Konformation sind

dabei noch nicht abschließend geklärt. Von verschiedenen Autoren wurde einerseits eine Versteifung der Phosphatkette, andererseits eine Steigerung des Basenstackings durch eine verminderte elektrostatische Abstoßung der Phosphatgruppen beschrieben. (Das  $\alpha/\alpha$ -Stacking der Diadenosinpolyphosphate erfordert eine ungewöhnliche, kompakte Faltung der Phosphatkette).

Neben der Wechselwirkung mit Metallionen wurde für Diadenosinpolyphosphate auch die Bildung von Komplexen mit biogenen Aminen wie Spermin, L-Arginin, Proteinen und poly(dT) beschrieben.<sup>54</sup>

### 3.4.1 Carbonatpuffer

Der Einfluss von Metallionen sollte zunächst im Carbonatpuffer untersucht werden, da dieses System im Verlauf der Methodenentwicklung die besten Ergebnisse gezeigt hatte. Dabei durfte es unter den alkalischen Bedingungen nicht zur Ausfällung des zugesetzten Metalls als Hydroxid kommen. Von der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Elemente konnte daher nur Magnesium eingesetzt werden, da es ein verhältnismäßig gut lösliches Hydroxid bildet.

Der Einfluss von  $Mg^{2+}$ -Ionen auf die Trennung wurde zunächst nur für  $Ap_2A$  bis  $Ap_8A$  untersucht; Mononukleotide sowie Guanosinderivate blieben unbetrachtet.

Im Unterschied zu den für Mononukleotide in schwach sauren Puffern benötigten millimolaren Konzentrationen<sup>24,53</sup> erwies sich hier eine  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 1 - 25  $\mu\text{mol/L}$  als ausreichend. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der bei pH 9,5 nahezu vollständigen Deprotonierung der Phosphatgruppen zu suchen; damit steht eine im Vergleich zu sauren Puffern höhere Zahl an Komplexliganden zur Verfügung. Höhere Magnesium-Konzentrationen hatten ebenfalls Einfluss auf die Trennung, allerdings kam es dabei zu einer Belegung der durch die dissoziierten Silanolgruppen stark negativ aufgeladenen Kapillarwand mit Magnesium-Ionen. Das adsorbierte Magnesium konnte auch durch extensive Spülvorgänge nicht mehr aus der Kapillare entfernt werden, so dass nachfolgend auch mit einem magnesiumfreien Puffer Trennungen wie mit magnesiumhaltigen Puffern möglich waren. Die erhaltenen Ergebnisse waren daher in dieser Form nicht reproduzierbar. Im Konzentrationsbereich bis 25  $\mu\text{mol/L}$  wurde kein derartiger „Memory-Effekt“ in nachfolgenden Läufen mit magnesiumfreien Puffern beobachtet. Außerdem nahmen bei hohen Magnesium-Konzentrationen die Migrationszeiten bei wiederholten Läufen unter identischen Bedingungen von Lauf

zu Lauf stark zu – wahrscheinlich aufgrund des durch die adsorbierten Ionen zunehmend verringerten EOF.

Von äußerster Wichtigkeit war die Vermeidung einer Probenkontamination mit  $\text{Mg}^{2+}$ . Daher wurde die Kapillare vor jeder Injektion in ein mit Wasser gefülltes Vial getaucht, um eventuell anhaftenden magnesiumhaltigen Laufpuffer abzuspielen. War die Probe auch nur mit Spuren von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen verunreinigt, wurden auch in magnesiumfreien Puffern ähnliche Ergebnisse wie in magnesiumhaltigen Laufpuffern beobachtet.

Abb. 3.36 zeigt den Einfluss der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration im Bereich von 1–25  $\mu\text{mol/L}$  auf die effektive Mobilität der Analyten. Da die absoluten Änderungen nur sehr gering sind, wurde hier die effektive Mobilität bei den verschiedenen Metall-Konzentrationen auf den Wert im  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Puffer (= 100 %) bezogen. (Ein Anstieg von  $\mu_{\text{eff}}$  auf Werte von über 100 % bei niedrigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen ist vermutlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen.) Wie die Abbildung zeigt, werden  $\text{Ap}_2\text{A}$ ,  $\text{Ap}_3\text{A}$ ,  $\text{Ap}_4\text{A}$  sowie  $\text{Ap}_7\text{A}$  und  $\text{Ap}_8\text{A}$  dabei durch die Magnesium-Ionen nicht oder nur geringfügig beeinflusst; am empfindlichsten reagieren  $\text{Ap}_5\text{A}$  und  $\text{Ap}_6\text{A}$  auf das Metallsalz. Der EOF ist in diesem Konzentrationsbereich ebenfalls nahezu unbeeinflusst (+/- 1 %).

Die Trennleistung lässt ebenfalls keine Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration erkennen. Eine Adsorption der Analyten über  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen an der negativ geladenen Kapillarwand sollte daher ausgeschlossen werden können, da sich ein solcher Vorgang durch Peakverbreiterung und verringerte Trennleistung äußert.

Der Einfluss der Magnesium-Konzentration auf die Auflösung ist in Abb. 3.37 dargestellt. Dabei werden hier nur  $\text{Ap}_4\text{A}$  bis  $\text{Ap}_8\text{A}$  betrachtet, da  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_4\text{A}$  unabhängig vom  $\text{Mg}^{2+}$ -Zusatz auf jeden Fall getrennt werden. Mit zunehmender Metallkonzentration verbessert sich die Auflösung zwischen  $\text{Ap}_7\text{A}$  und  $\text{Ap}_8\text{A}$  sowie zwischen  $\text{Ap}_6\text{A}$  und  $\text{Ap}_7\text{A}$ ; umgekehrt verschlechtert sich die Trennung von  $\text{Ap}_4\text{A}/\text{Ap}_5\text{A}$  bzw.  $\text{Ap}_5\text{A}/\text{Ap}_6\text{A}$ . Die beste Trennung wird bei einem Magnesium-Zusatz von 15  $\mu\text{mol/L}$  erreicht; bei höheren Konzentrationen kommt es zur Komigration vor allem von  $\text{Ap}_4\text{A}$  und  $\text{Ap}_5\text{A}$ . Das entsprechende Elektropherogramm ist in Abb. 3.38 abgebildet.

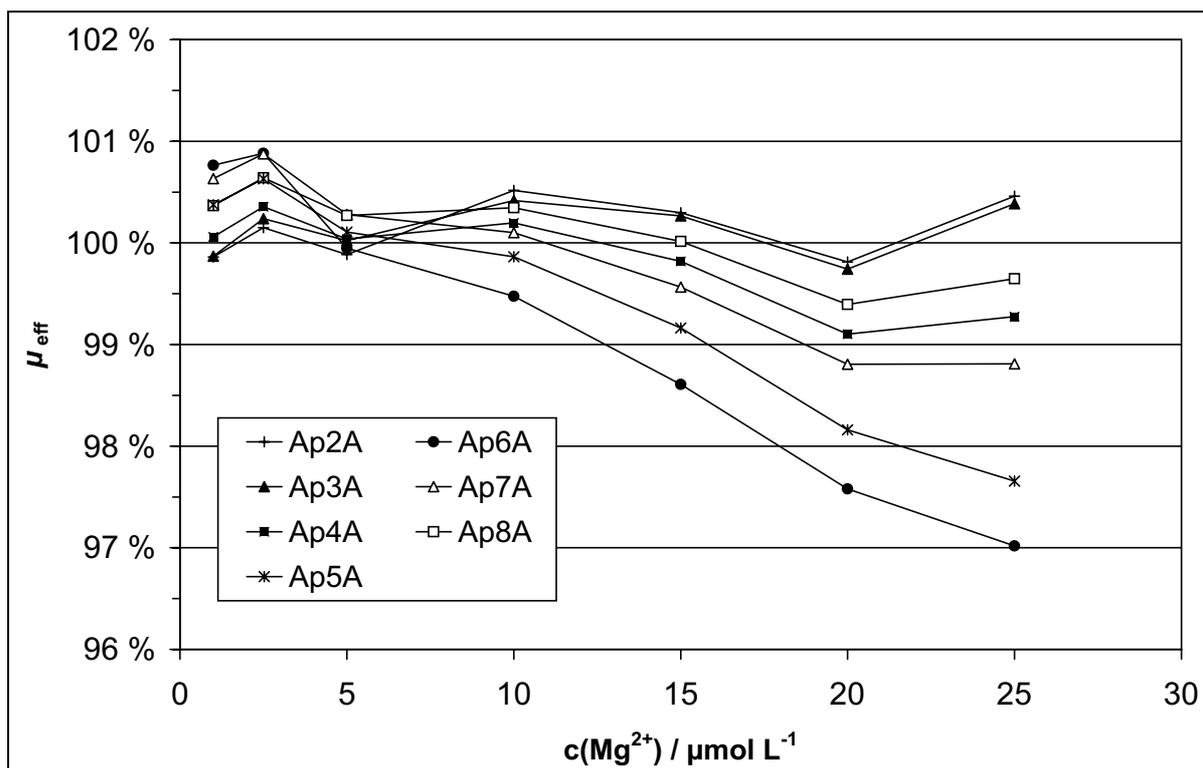


Abb. 3.36 Einfluss der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration auf die effektive Mobilität im Ammonium-carbonat-Puffer pH 9,5 ( $\mu_{\text{eff}}$  ohne Magnesium-Zusatz = 100 %) (Pufferkonzentration 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

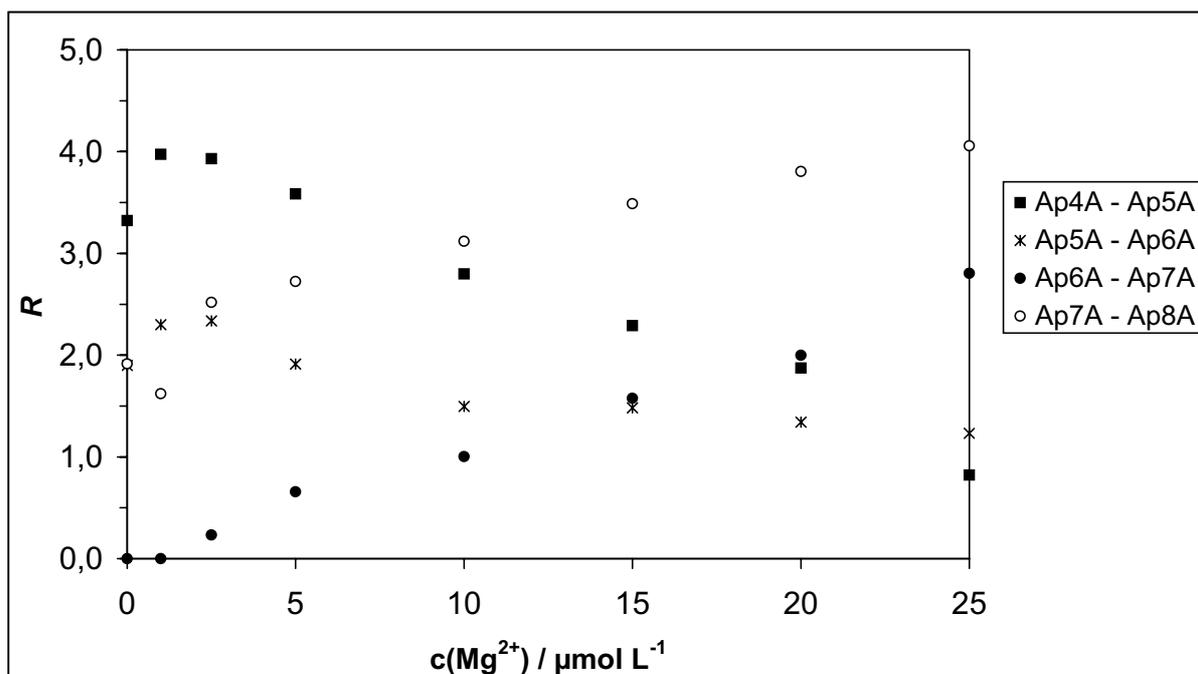


Abb. 3.37 Einfluss der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration auf die Auflösung von Ap<sub>4</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A (Bedingungen s. Abb. 3.36)

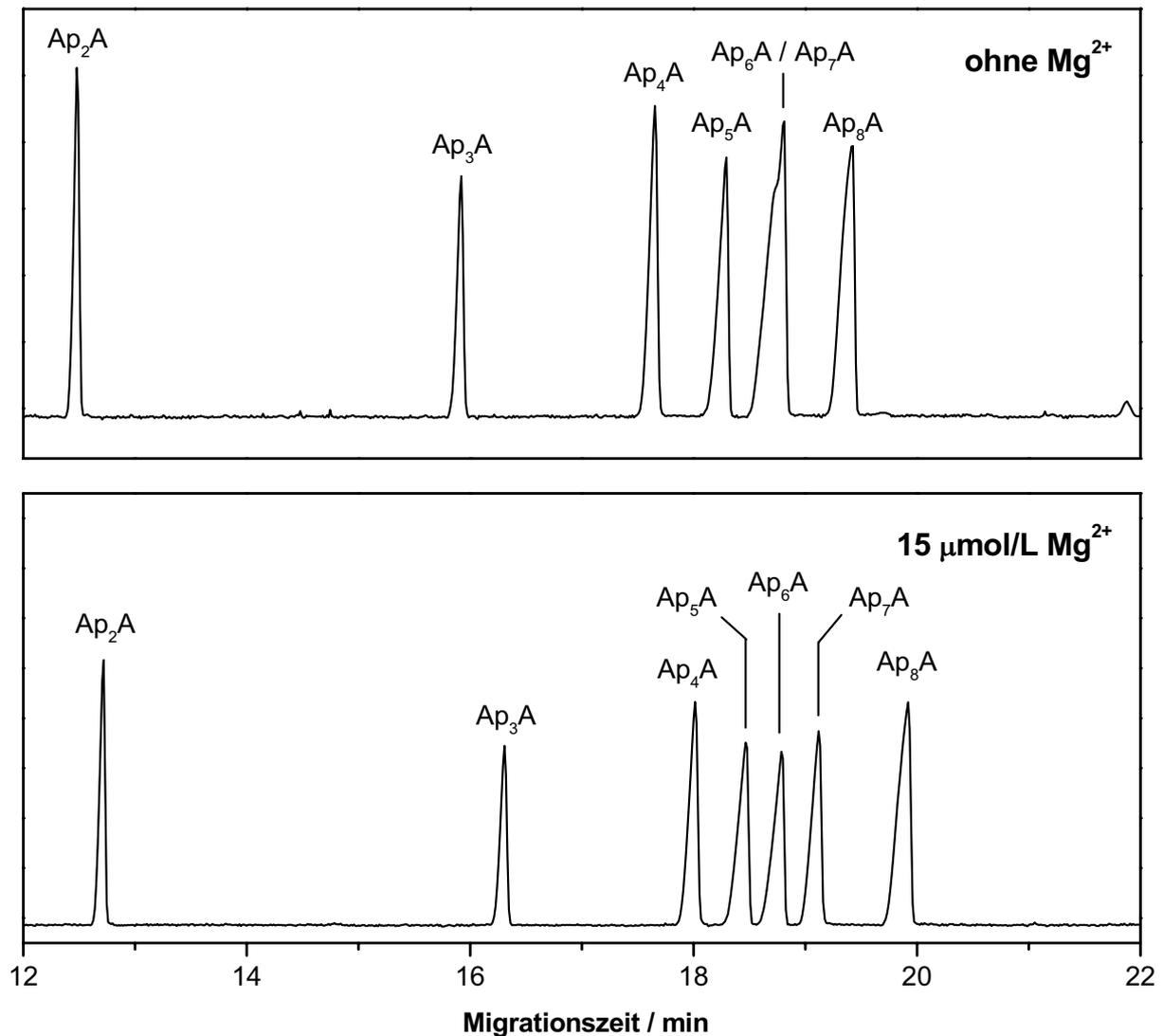


Abb. 3.38 Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A ohne bzw. mit Magnesiumzusatz  
(Bedingungen s. Abb. 3.36)

Leider kam es auch bei Verwendung von mikromolaren Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen zu einer Anreicherung von Mg<sup>2+</sup> an der Kapillarwand. Als Folge nahmen der EOF ab und damit die Migrationszeiten zu. Teilweise veränderte sich in mehreren aufeinanderfolgenden Läufen auch die Selektivität. Um einer solchen Anreicherung entgegenzuwirken, wurde versucht, die Kapillare nach jedem Lauf mit ammoniakalischer EDTA-Lösung zu spülen (50 mmol/L in 25 mmol/L-Ammoniumcarbonat pH 9,5), um die adsorbierten Mg<sup>2+</sup>-Ionen als Mg-EDTA-Komplex wieder in Lösung zu bringen. Die Magnesium-Anreicherung konnte dadurch zwar verringert, aber nicht völlig unterdrückt werden.

Die Robustheit der Methode konnte somit weder gegenüber Magnesium-Verschleppung noch gegenüber Anreicherung von  $Mg^{2+}$  an der Kapillarwand auf das erforderliche Maß erhöht werden – es kam immer wieder zu teilweise deutlichen Veränderungen auch der *relativen* Migrationszeit. Daher erschien trotz der viel versprechenden Ergebnisse eine Weiterentwicklung dieser Methode für Guanosinderivate im Hinblick auf die spätere Untersuchung von biologischen Proben nicht sinnvoll.

### 3.4.2 Citratpuffer

Mehrere der bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Trennung von Mononukleotiden in Gegenwart von Metallsalzen wurden in schwach sauren Citratpuffern (Ammoniumcitrat pH 5) durchgeführt. Da solche Puffer auch bei der Trennung der Adenosin-Dinukleotide gute Ergebnisse gezeigt hatten, sollte zumindest kurz der Einfluss von Metallionen auf die Trennung der  $A_p_nA$  im Citratpuffer untersucht werden. Im Gegensatz zur Literatur wurde jedoch Natriumcitrat verwendet und auf ein dynamisches Coating der Kapillaren mit Polyaminen verzichtet. Aus Zeitgründen beschränkten sich die Versuche auf den Zusatz von Magnesium-Ionen, obwohl im schwach sauren Bereich natürlich auch Metalle mit schwerer löslichen Hydroxiden wie  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  etc. eingesetzt werden können.

Im Gegensatz zu den alkalischen Carbonatpuffern war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch bei z. T. um den Faktor 1000 höheren Magnesium-Konzentrationen ausgezeichnet. Eine irreversible Anlagerung von Magnesium an die Kapillarwand, die die Migrationszeiten von Lauf zu Lauf verlängerte oder auch Effekte in magnesium-freien Puffern zeigte, wurde nicht beobachtet. Dies ist vermutlich zum einen auf die bei pH 5,0 deutlich geringere Dissoziation der Silanolgruppen an der Kapillarwand und zum anderen auf die Komplexbildung der Metallionen durch Citratmoleküle zurückzuführen.

Im Citratpuffer wurde ein Konzentrationsbereich von 0,01–10,5 mmol/L  $Mg^{2+}$  untersucht; deutliche Effekte wurden erst etwa ab 250  $\mu\text{mol/L}$   $Mg^{2+}$  beobachtet. Dies entspricht etwa dem 25fachen der minimalen im Carbonatpuffer wirksamen Menge. Auch dies dürfte auf das Vorhandensein eines zweiten Komplexgleichgewichtes zwischen Magnesium und Citrat zurückzuführen sein – ein Großteil der  $Mg^{2+}$ -Ionen liegt nicht frei, sondern als Citratkomplex gebunden vor.

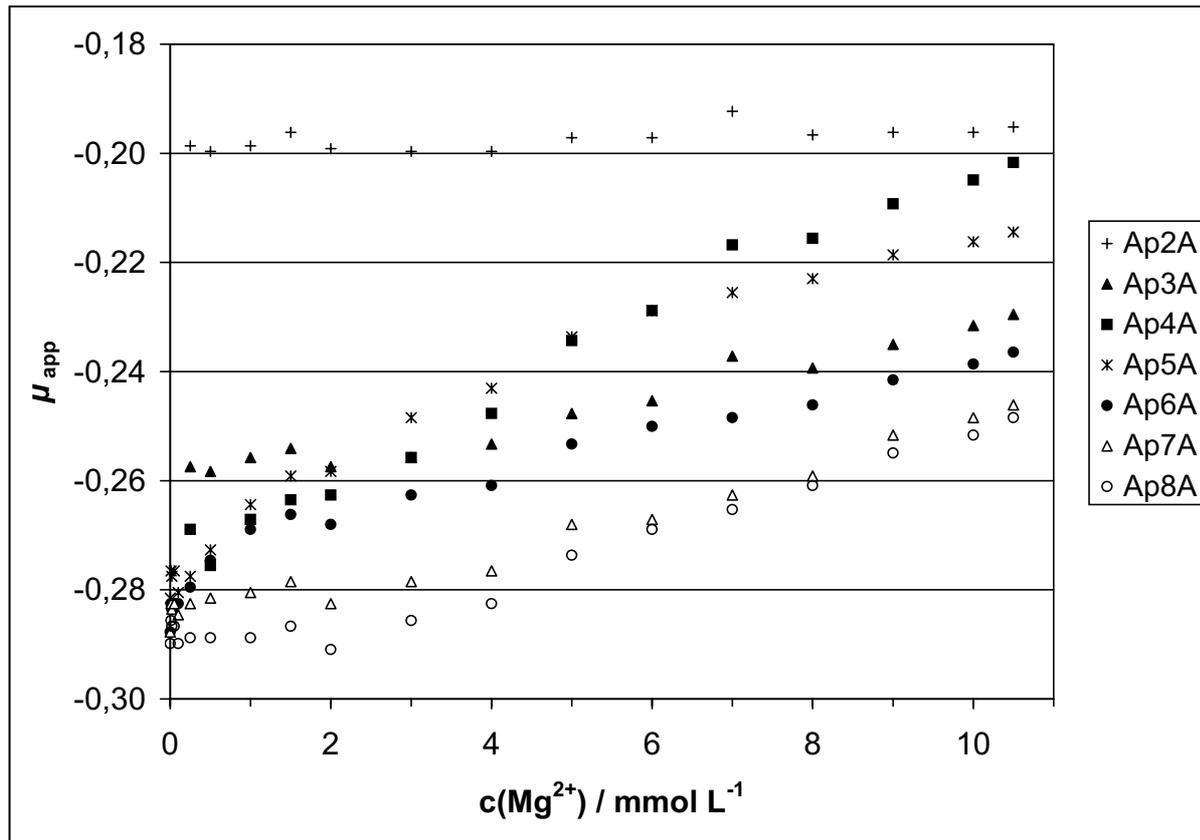


Abb. 3.39 Einfluss der Magnesium-Konzentration auf die scheinbare Mobilität (Citratpuffer 50 mmol/L pH 5,25, Kapillare 20/27 cm, Spannung -11,5 kV)

Der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die scheinbare Mobilität  $\mu_{\text{app}}$  ist in Abb. 3.39 dargestellt. Mit steigender Magnesiumkonzentration kommt es zu einer deutlichen Abnahme von  $\mu_{\text{app}}$ , da die negative Ladung der Dinukleotide durch die Komplexbildung mit den Metallkationen verringert wird. Lediglich Ap<sub>2</sub>A zeigt im Konzentrationsbereich bis 10 mmol/L Mg<sup>2+</sup> keine signifikante Veränderung der scheinbaren Mobilität. Die Abnahme der *effektiven* Mobilität der Analyten ist in Wirklichkeit wahrscheinlich sogar noch stärker als durch  $\mu_{\text{app}}$  wiedergegeben, da der mit zunehmender Metallionen-Konzentration abnehmende EOF die Abnahme von  $\mu_{\text{app}}$  teilweise kompensiert.

Die Empfindlichkeit der Analyten gegenüber Mg<sup>2+</sup>-Ionen und die dadurch bedingte Beeinflussung der scheinbaren Mobilität folgt nicht der homologen Reihe zunehmender Phosphatgruppenzahl – am stärksten reagieren Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A auf den Metallionenzusatz. Dadurch bedingt kommt es bei Erhöhung der Magnesium-Konzentration auch zu Veränderungen in der Migrationsreihenfolge. Ist die Abfolge der Analyten im magnesiumfreien Puffer noch regulär (Ap<sub>8</sub>A → Ap<sub>2</sub>A), wird bereits bei 1,5 mmol/L Mg<sup>2+</sup> die Abfolge 8-7-6-4-5-3-2 beobachtet (jedes Ap<sub>n</sub>A hier durch die

Zahl der Phosphatgruppen repräsentiert), die sich bei 4 mmol/L  $Mg^{2+}$  zu 8-7-6-3-4-5-2 und bei 10,5 mmol/L zu 8-7-6-3-5-4-2 verschiebt.

Die beste Trennung der Diadenosinpolyphosphate alleine wird bei 4 mmol/L  $Mg^{2+}$  erreicht (Abb. 3.40 A); eine Auftrennung zusammen mit den Adenosinmonophosphaten gelingt bei 10,5 mmol/L  $Mg^{2+}$  (Abb. 3.40 B).

Der Einsatz  $Mg^{2+}$ -haltiger Citratpuffer wurde nachfolgend nicht weiter auf die Untersuchung der Guanosinderivate ausgedehnt, da mit alkalischen Ammoniumcarbonatpuffern bereits ein ausreichend selektives System zur Verfügung stand.

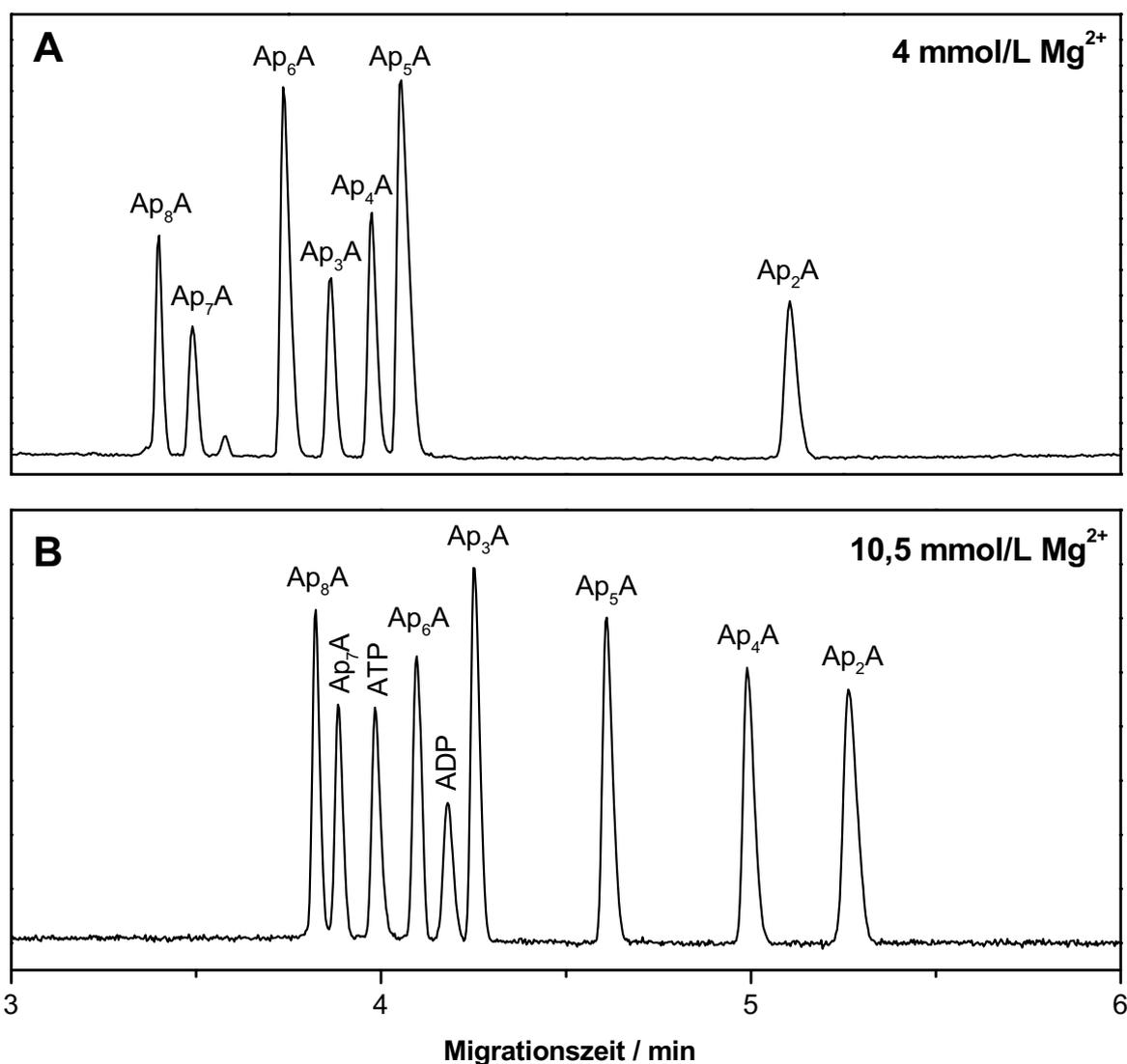


Abb. 3.40 A: Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A in Gegenwart von  $Mg^{2+}$

B: Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A und AMP / ADP / ATP in Gegenwart von  $Mg^{2+}$   
(Bedingungen s. Abb. 3.39)

## 3.5 Versuche zur Empfindlichkeitserhöhung

Der Vorteil der hohen Trennleistung in der Kapillarelektrophorese – insbesondere für ionische Verbindungen wie die Dinukleosidpolyphosphate – wird durch die geringe Konzentrationsempfindlichkeit der UV-Detektion im Vergleich zur HPLC zumindest teilweise aufgebraucht. Durch die geringen Abmessungen der in der CE verwendeten Kapillaren – sowohl in Bezug auf Länge als auch auf Innendurchmesser – können nur sehr kleine Injektionsvolumina im Bereich von Nanolitern in die Kapillare eingebracht werden. Die am weitesten verbreiteten optischen Detektionsmethoden leiden darüber hinaus unter der im Vergleich zur HPLC drastisch verkürzten optischen Weglänge, die nur dem Innendurchmesser der verwendeten Kapillaren entspricht. Da die Absorption direkt proportional zur optischen Weglänge und der Konzentration ist, muss die Probenkonzentration dramatisch erhöht werden, um das gleiche Signal-Rausch-Verhältnis wie in einem typischen LC-Experiment zu erreichen.

Die in Kap. 3.3.3 beschriebene validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate aus wässriger Lösung wies eine Bestimmungsgrenze von etwa 2,6  $\mu\text{mol/L}$  auf. Deswegen wurden Versuche zur Erhöhung der Empfindlichkeit vor allem im Hinblick auf die spätere Bestimmung aus biologischen Materialien unternommen. Dabei beschränkten sich die Untersuchungen auf den Carbonatpuffer, da damit auch die Bestimmungen aus der Biomatrix durchgeführt werden sollten.

Die Verbesserung der Empfindlichkeit in der Kapillarelektrophorese war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Dabei werden hauptsächlich zwei Strategien verfolgt: Erhöhung der in die Kapillare eingebrachten Probenmenge und Verbesserung der Empfindlichkeit auf der Detektorseite.<sup>56</sup> Beide Ansätze wurden im folgenden auf ihre Anwendbarkeit für die Dinukleosidpolyphosphate untersucht.

### 3.5.1 Verbesserung der Detektion

Die einfachste Möglichkeit, die Konzentrationsempfindlichkeit zu verbessern, besteht in der Verwendung von Kapillaren mit größerem Innendurchmesser. Nachteilig ist jedoch hierbei das gleichzeitige Ansteigen des Elektrophoresestroms und damit der Jouleschen Wärme, was Auflösung und Trennleistung verschlechtert. Aus diesem Grund war hier die Verwendung von Kapillaren mit einem größeren Innendurchmesser als 50  $\mu\text{m}$  nicht möglich.

Einen Ausweg bieten Kapillaren mit erweitertem Lichtweg (sog. *Bubble-Cells*), deren Innenlumen nur am Detektionsfenster aufgeweitet ist. Damit ist eine Verbesserung der Empfindlichkeit um den Faktor 2–3 ohne gravierenden Verlust an Auflösung bzw. Trennleistung möglich.<sup>56</sup> Solche Kapillaren sind kommerziell von der Fa. Agilent erhältlich, allerdings nur bis zu einer Gesamtlänge von 50 cm. Für eine erfolgreiche Trennung der Dinukleosidpolyphosphate im Carbonatpuffer ist jedoch eine Kapillarlänge von 67 cm erforderlich. Auf das von HEITMEIER<sup>32</sup> beschriebene Selbstätzen von *Bubble-Cells* mit gasförmigem Fluorwasserstoff wurde aufgrund des Gefahrenpotentials von HF und der nur geringen zu erwartenden Empfindlichkeitszunahme verzichtet. Auch die Anwendung der sog. Z-Zelle (d. h. einer gebogenen Kapillare mit einem mehreren Millimeter langen Lichtweg) war nicht möglich, da diese als kommerzielles System nur für Agilent-Kapillarelektrophorese-Systeme erhältlich ist. Außerdem muss beim Einsatz dieser Zelle der Abstand der Peaks mindestens der optischen Weglänge des Systems entsprechen, was insbesondere für die höheren Ap<sub>n</sub>A-Homologen nicht gegeben ist.

Die Analyten besitzen kein durch einen HeCd-Laser (325 nm) oder Ar<sup>+</sup>-Laser (488 nm) anregbares Fluorophor. Aus diesem Grunde war eine deutlich empfindlichere Bestimmung mittels Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF)-Detektion nicht möglich. Auf eine Fluoreszenzderivatisierung sollte aufgrund der Vielzahl der Analyten für einen Bioassay von vorne herein verzichtet werden. Versuche zur Fluoreszenz-Derivatisierung von Standardsubstanzen mit Chloracetaldehyd sind in Kap. 6 beschrieben.

Obwohl die massenspektrometrische Detektion bei weitem empfindlicher als die UV-Detektion ist, erfordern die gegenwärtigen CE/MS-Interfaces den Zusatz sog. *Sheath*-Flüssigkeiten nach der Kapillare, um den Fluss auf etwa 10 µL/min zu erhöhen.<sup>56</sup> Ein Fluss in dieser Größenordnung ist notwendig, um eine stabile Elektrospray-Ionisierung im Massenspektrometer zu erreichen. Dies resultiert in einer viel niedrigeren Konzentrationsempfindlichkeit verglichen mit LC-MS, GC-MS oder sogar CE-UV. Versuche zur CE/MS-Kopplung sind in Kapitel 5 beschrieben.

### 3.5.2 Erhöhung der Substanzmenge in der Kapillare

In der Kapillarelektrophorese ist die injizierbare Menge begrenzt, da mit längerer Injektionszeit die Breite der Probenbande zu- und Auflösung sowie Trennleistung abnehmen. Um diese Limitierung zu umgehen, sind verschiedene Techniken entwickelt worden.

Die einfachste Methode stellt die Injektion der Probe in einem Lösungsmittel (im Idealfalle Wasser) dar, das eine geringere Leitfähigkeit als der Elektrophoresepuffer besitzt. Nach Anlegen der Trennungsspannung entsteht in der Probenzone eine höhere elektrische Feldstärke als im Puffer. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen der Feldstärke proportional ist, bewegen sich die Analyten in der Probenzone so lange mit höherer Geschwindigkeit, bis sie die Grenze zur Pufferzone erreicht haben. Dort werden sie abgebremst und wandern entsprechend der niedrigeren Feldstärke mit geringerer Geschwindigkeit weiter. Dadurch kommt es zur Kompression (*Stacking*) der Probenzone mit der Folge einer höheren Analytenkonzentration als in der ursprünglichen Probenlösung. Die Effizienz des Stackings ist limitiert durch den ungleichen laminaren Fluss, der durch einen unterschiedlichen EOF in den verschiedenen Zonen des diskontinuierlichen Puffers hervorgerufen wird.<sup>57</sup> In der Folge entsteht ein parabolisches Strömungsprofil, das eine Verbreiterung der schmalen Probenzone und damit einen Verlust an Trennleistung verursacht.

Diese Art des *Sample Stackings* wurde in der bisherigen Methodenentwicklung bereits standardmäßig angewendet, da alle Probenlösungen rein wässrig waren. Dennoch war die Injektionsdauer auf maximal 15 s begrenzt, danach kam es zu deutlicher Peakverbreiterung und Auflösungsverlust. Der Stackingeffekt ist hier vermutlich auch durch die starke negative Eigenladung und die daraus resultierende starke elektrostatische Abstoßung limitiert.

Zur weiteren Erhöhung der Empfindlichkeit muss also die Menge der injizierten Analyten erhöht, gleichzeitig aber das Volumen des injizierten Lösungsmittels verringert werden. Eine Möglichkeit dazu ist die sog. elektrokinetische Injektion, d. h. Injektion der Probe durch Anlegen einer Spannung. Dabei werden selektiv geladene Komponenten aufgrund ihrer Mobilität im elektrischen Feld in die Kapillare eingebracht. Für die elektrokinetische Injektion sind bereits viele Anwendungen beschrieben, hier allerdings ist die Anwendung dieser Technik problematisch. Zum einen ist die Umpolung der Spannungsquelle während der Injektion nötig (das Inlet muss die Kathode sein), zum anderen handelt es sich bei den Dinukleosidpolyphosphaten um Analyten mit z. T. deutlich verschiedener Mobilität. Dadurch kommt es zu einem Diskriminie-

rungseffekt – Analyten mit hoher Mobilität werden verstärkt injiziert. Darüber hinaus transportiert der gegenläufige EOF insbesondere langsam migrierende Analyten wieder aus der Kapillare heraus. Entsprechende eigene Versuche (Daten nicht gezeigt) bestätigten die erwartete Diskriminierung. Daher wurde auf die weitere Entwicklung der elektrokinetischen Injektion verzichtet.

Erfolgversprechender erschien eine von CHIEN und BURGI entwickelte, als *Large Volume Sample Stacking* (LVSS) bezeichnete Technik: Dabei wird die Probe in Wasser gelöst und die Kapillare hydrodynamisch teilweise oder auch ganz mit der Probe befüllt.<sup>58</sup> Anschließend wird das Detektionsende der Kapillare in den Laufpuffer getaucht und Spannung in umgekehrter Polarität angelegt. Dabei schiebt der EOF die Probenzone zusammen mit Kationen und Neutralsubstanzen aus der Kapillare hinaus in ein Abfallgefäß, während anionische Analyten zum Detektionsende wandern und sich am Übergang Probenzone/Laufpuffer anreichern. Der Strom wird permanent beobachtet, bis er 95–99 % des normalen Wertes bei der Elektrophorese erreicht hat. An diesem Punkt wird auch die Injektionsseite der Kapillare in Laufpuffer getaucht und die Polarität wieder auf Normal geändert. Die Trennung läuft nun in gewohnter Weise ab. Wird der Stackingprozess nicht rechtzeitig beendet, besteht allerdings die Gefahr, dass anionische Analyten durch den EOF ebenfalls aus der Kapillare befördert werden. Diese Technik wurde von GELDART und BROWN bereits erfolgreich auf Nukleotide angewendet.<sup>59,60</sup> Dabei wurden Empfindlichkeitsverbesserungen um den Faktor 200 beobachtet.

Die eigenen Versuche zum LVSS wurden in einem 50 mM-Ammoniumcarbonat-Puffer pH 9,5 durchgeführt. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wurde dafür das Beckman MDQ anstelle des P/ACE verwendet, da das MDQ im Gegensatz zum P/ACE die softwaremäßige Umpolung der Trennungsspannung beherrscht. Die Kapillare wurde vollständig mit der Probenlösung befüllt; das anschließende Stacking wurde mit der normalen Trennungsspannung, allerdings in umgekehrter Polarität, durchgeführt. Der Wechsel zur normalen Elektrophorese erfolgte, wenn der Stacking-Strom ca. 97–99 % des Elektrophoresestromes erreicht hatte.

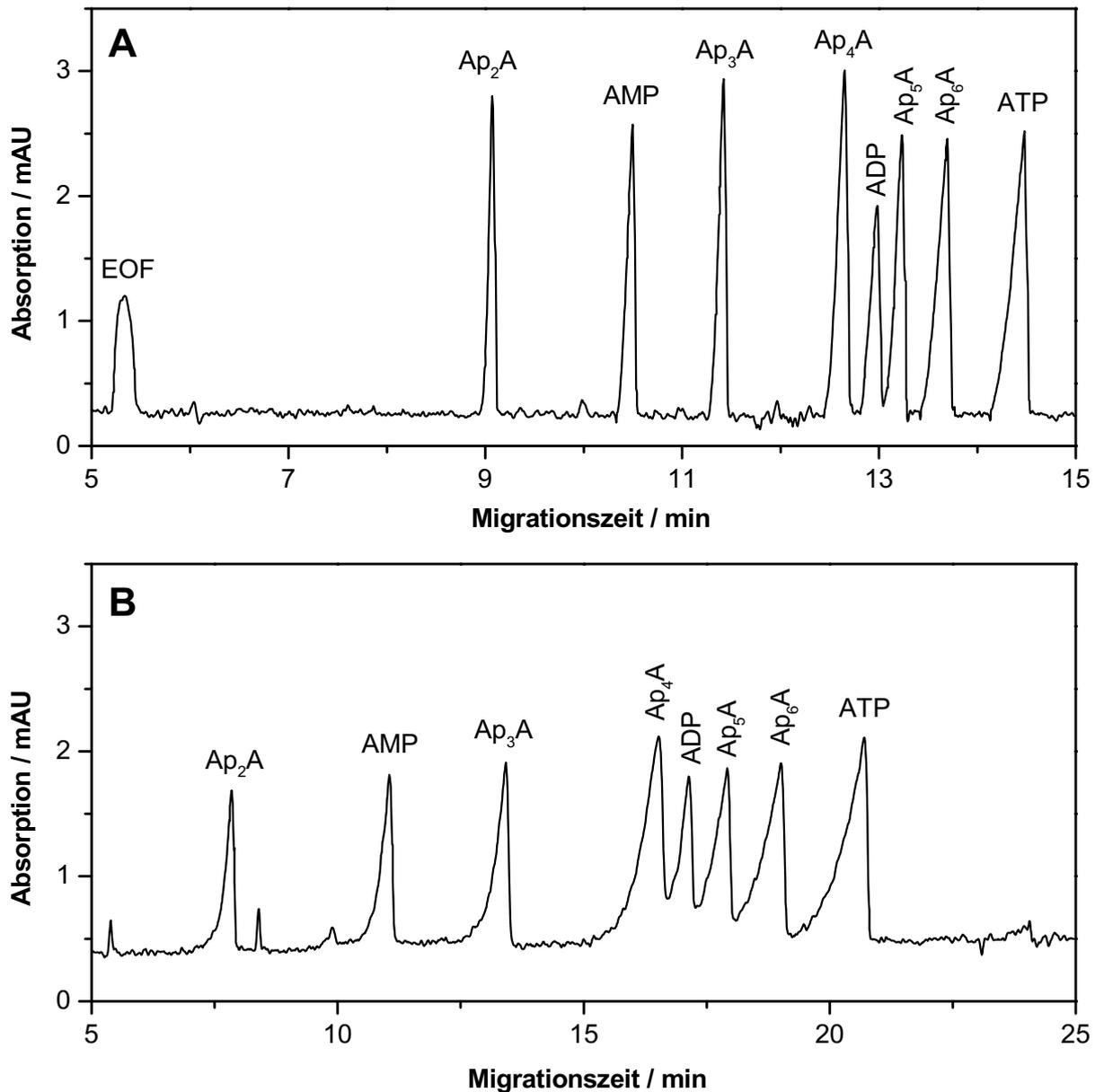


Abb. 3.41 *Large Volume Sample Stacking* für Diadenosinpolyphosphate

A: hydrodynamische Injektion 5 psi\*s

B: Kapillare komplett mit Probe gefüllt, Stacking 3,35 min mit -18 kV

Probe gegenüber Abb. A 1:45 mit Wasser verdünnt

(Ammoniumcarbonatpuffer 50 mmol/L pH 9,5, Kap. 50/60 cm, Spannung +18 kV)

Als größtes Problem erwies sich das Festlegen des Zeitpunktes zur Spannungsumkehr. Erfolgte diese zu früh, verblieb zu viel Matrix in der Kapillare und die Trennung war deutlich verschlechtert; wurde zu spät umgepolt, kam es teilweise zum völligen Verlust von Analyten, insbesondere des langsam migrierenden  $Ap_2A$ . Im Gegensatz zur reinen hydrodynamischen Injektion war beim LVSS die Auflösung deutlich verschlechtert. Die Peaks zeigten ein ausgeprägtes Fronting und waren relativ breit und flach – ver-

mutlich aufgrund der relativ stark ausgeprägten elektrostatischen Abstoßung und der starken Diffusion. Die Elektrophoresezeit ist durch den zusätzlichen Stackingschritt gegenüber der reinen hydrodynamischen Injektion deutlich verlängert. Repräsentative Elektropherogramme sind in Abb. 3.41 dargestellt. Die Empfindlichkeitsverbesserung durch das LVSS betrug etwa Faktor 15–20, wurde allerdings mit wesentlich schlechteren Trennleistungen erkauft. Eine Verbesserung der Trennung gegenüber Abb. 3.41 gelang trotz weiterer Anstrengungen nicht. Aufgrund dieses relativ unbefriedigenden Ergebnisses wurde das LVSS nicht weiter verfolgt.

Damit waren alle Möglichkeiten der Empfindlichkeitsverbesserung auf der Seite der Kapillarelektrophorese ausgeschöpft. Alle weiteren Schritte konnten damit nur noch auf der Ebene der Probenaufarbeitung erfolgen.

### 3.6 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden verschiedene Methoden zur Trennung der Dinukleosidpolyphosphate beschrieben. Die besten Ergebnisse wurden dabei in Citrat- bzw. Ammoniumcarbonatpuffern erzielt; die sehr gebräuchlichen Borat- bzw. Phosphatpuffer waren aufgrund Komplexbildung mit den Analyten bzw. unzureichender Trennleistung insbesondere für die höheren Homologen nicht geeignet.

Da für die Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate aus biologischem Material auch die Guanosinderivate in die Methodenentwicklung einbezogen werden müssen, erwies sich für diesen Zweck lediglich der alkalische Ammoniumcarbonatpuffer als geeignet. Nur beim Arbeiten im Bereich von pH 9–11 war es möglich, ausreichende Selektivität zwischen den  $A_{nA}$  und ihren Guanosin-Analoga  $A_{nG}$  bzw.  $G_{nG}$  zu erzielen. Die Festlegung des pH-Wertes für die Bestimmung aus biologischem Material muss dabei jedoch anhand der jeweiligen Probenzusammensetzung getroffen werden, da es keinen pH-Wert gibt, an dem alle  $A_{nA}$ ,  $A_{nG}$  und  $G_{nG}$  sowie Adenosinmononukleotide simultan in einem Lauf bestimmt werden können. Eventuell kann es erforderlich sein, die gleiche Probe bei zwei verschiedenen pH-Werten zu vermessen, um jeden interessierenden Analyten selektiv erfassen zu können. Die grundsätzliche Validierbarkeit einer auf dem Ammoniumcarbonatpuffer basierenden Methode wurde bereits für die Bestimmung aus wässriger Lösung gezeigt.

Es war nicht möglich, die Empfindlichkeit der Methode über die mit normaler hydrodynamischer Injektion erreichbaren Werte hinaus zu steigern. Insbesondere gelang die

Anwendung der verschiedenen literaturbekannten Stacking-Techniken bei den Dinukleosidpolyphosphaten nicht. Die Bestimmungsgrenze aus wässriger Lösung liegt bei etwa 2,6  $\mu\text{mol/L}$ .

Basierend auf der Trennung im Ammoniumcarbonat-Puffer sollte im folgenden eine validierte Bestimmungsmethode für Dinukleosidpolyphosphate in humanen Thrombozyten entwickelt werden.

---

## 4 Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in humanen Thrombozyten

### 4.1 Isolierung der Dinukleotide aus der Probenmatrix

Die Isolierung der Dinukleotide aus der Probenmatrix folgte im wesentlichen in der Literatur beschriebenen, auch zur Probenvorbereitung für die HPLC verwendeten Verfahren.<sup>12</sup> Im einzelnen waren dazu folgende Schritte erforderlich:

1. Gewinnung der Blutplättchen
2. Freisetzung der Zellbestandteile und Proteinfällung
3. Selektive Aufkonzentrierung der Dinukleotide durch Affinitätschromatographie
4. Entsalzung und Trocknung

Jeder Probenaufarbeitungsschritt ist nun im folgenden kurz dargestellt.

#### 4.1.1 Gewinnung der Blutplättchen

Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Thrombozyten waren humane Vollblutproben, für die Transfusion nicht mehr verwendbare Thrombozytenkonzentrate oder Zwischenprodukte aus der Herstellung von Blutkonserven, sog. *Buffy-Coats*.

Im einfachsten Fall der Thrombozytenkonzentrate enthielt das Ausgangsmaterial bereits nahezu ausschließlich Blutplättchen. Diese wurden abzentrifugiert und mehrfach mit isotonischer Kochsalzlösung zur Vermeidung einer vorzeitigen Degranulation oder Zellruptur gewaschen. Anschließend wurde erneut abzentrifugiert und das Thrombozytenpellet für die weitere Aufarbeitung verwendet.

Bei den sog. *Buffy-Coats* handelt es sich um eine Mischfraktion, die bei der Auftrennung einer Vollblutspende in ein Erythrozytenkonzentrat und das Blutplasma anfällt. Sie enthält neben den Blutplättchen auch noch eine große Zahl Erythrozyten sowie anderer Zelltypen wie z. B. Monozyten. Zur Gewinnung der Thrombozyten wurden aus dem *Buffy-Coat* zunächst die Erythrozyten mit niedriger *g*-Zahl abzentrifugiert. Aus dem Überstand, dem sogenannten plättchen-reichen Plasma, wurde anschließend durch weitere Zentrifugations- und Waschschrte wie bei den Thrombozytenkonzentraten ein Thrombozytenpellet isoliert.

Die Gewinnung von Blutplättchen aus Vollblutproben verlief ähnlich wie bei den *Buffy-Coats*: Das Blut wurde direkt nach der Abnahme durch den Zusatz von Heparin

oder EDTA ungerinnbar gemacht. Nach dem Abzentrifugieren der Erythrozyten mit niedriger *g*-Zahl konnte aus dem überstehenden plättchen-reichen Plasma ein Thrombozytenpellet gewonnen werden.

#### 4.1.2 Freisetzung der Zellbestandteile und Proteinfällung

Da es sich bei den Dinukleosidpolyphosphaten um intrazelluläre Substanzen handelt, müssen sie zunächst aus den sekretorischen Granula freigesetzt werden. Dies wurde durch Einfrieren des Thrombozytenpellets bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließendes Wiederauftauen bei Raumtemperatur erreicht. Durch die dabei eintretende Zellruptur wurden die Zellmembran sowie die Granula zerstört und der Inhalt in die umgebende Lösung freigesetzt.

Um einen enzymatischen Abbau der Dinukleotide zu vermeiden und in den Blutplättchen enthaltene Proteine zu entfernen, setzte man der Thrombozytensuspension Perchlorsäure zu (Endkonzentration 1 mol/L). Die Proteinfällung mit Perchlorsäure wird bei der Reinigung von Nukleotiden am häufigsten eingesetzt und bietet mit 80 bis 90 % hohe Wiederfindungsraten.<sup>12</sup> Nach dem Abzentrifugieren des Eiweiß-Niederschlags wurde der Überstand mit Kaliumhydroxid neutralisiert und so die Perchlorationen als  $\text{KClO}_4$ -Niederschlag entfernt. Den Überstand der anschließenden Zentrifugation setzte man für die weitere Probenaufarbeitung ein.

#### 4.1.3 Affinitätschromatographische Aufkonzentrierung der Dinukleotide

Ein großes Problem bei der Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in Humanthrombozyten liegt im enormen Überschuss der Mononukleotide gegenüber den Dinukleotiden. Obwohl die Abtrennung einer in etwa äquimolaren Menge Mononukleotide in der Kapillarelektrophorese kein Problem darstellt, ist es nicht möglich, die Dinukleotide neben der in den Plättchen vorliegenden, ca. 100fachen Mononukleotidmenge zu bestimmen. Daher war es das Ziel der Probenvorbereitung, die Dinukleosidpolyphosphate von den Mononukleotiden abzutrennen und selektiv zu konzentrieren.

Für diesen Schritt wurde ein nach dem Verfahren von BARNES<sup>61</sup> mit *m*-Aminophenylboronsäure derivatisierter Kationenaustauscher verwendet. Unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen bindet dieses Gel über die in Abb. 3.23 gezeigte Borylesterbildung selektiv Nukleotide mit zwei oder mehr *cis*-Diol-Gruppen. Da der Großteil der in den Plättchen vorkommenden Nukleotide zur Klasse der Mononukleotide gehört, die nur ein Ribose-Molekül und damit nur eine *cis*-Diol-Gruppe enthalten, eignet sich

dieses Verfahren ausgezeichnet zur selektiven Aufkonzentrierung der Dinukleotide. Eine Diskriminierung der Dinukleosidpolyphosphate in Abhängigkeit ihrer Nukleobasen findet dabei nicht statt.

Der derivatisierte Kationenaustauscher wurde mit 1 mol/L-Ammoniumacetat pH 9,5 äquilibriert; ebenso wurde der Überstand der Kaliumperchloratfällung mit Ammoniumacetat bis zu einer Konzentration von 1 mol/L versetzt und auf pH 9,5 eingestellt. Unter diesen Bedingungen binden die Mononukleotide aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen und den Carboxylatgruppen des Kationenaustauschers nicht an das Boronat-Gel. Für Dinukleotide, die zwei Ribosemoleküle und damit auch zwei *cis*-Diol-Gruppen enthalten, ist die Bildung des Borylestere stark genug, um die elektrostatische Abstoßung zu kompensieren. Diese Vorgänge sind in Abb. 4.1 graphisch dargestellt. Der Einstellung der Ammoniumacetat-Konzentration in Probe und Puffer kommt dabei essentielle Bedeutung zu: Ist die Konzentration höher als 1 mol/L, können auch Mononukleotide an das Gel binden, da die elektrostatische Abstoßung durch die hohe Ionenstärke nun ausreichend unterdrückt wird. Ist dagegen die Salzkonzentration zu niedrig, können auch die Dinukleotide durch die nun verstärkte Abstoßung der negativen Ladungen nicht mehr vollständig an das Gel binden.

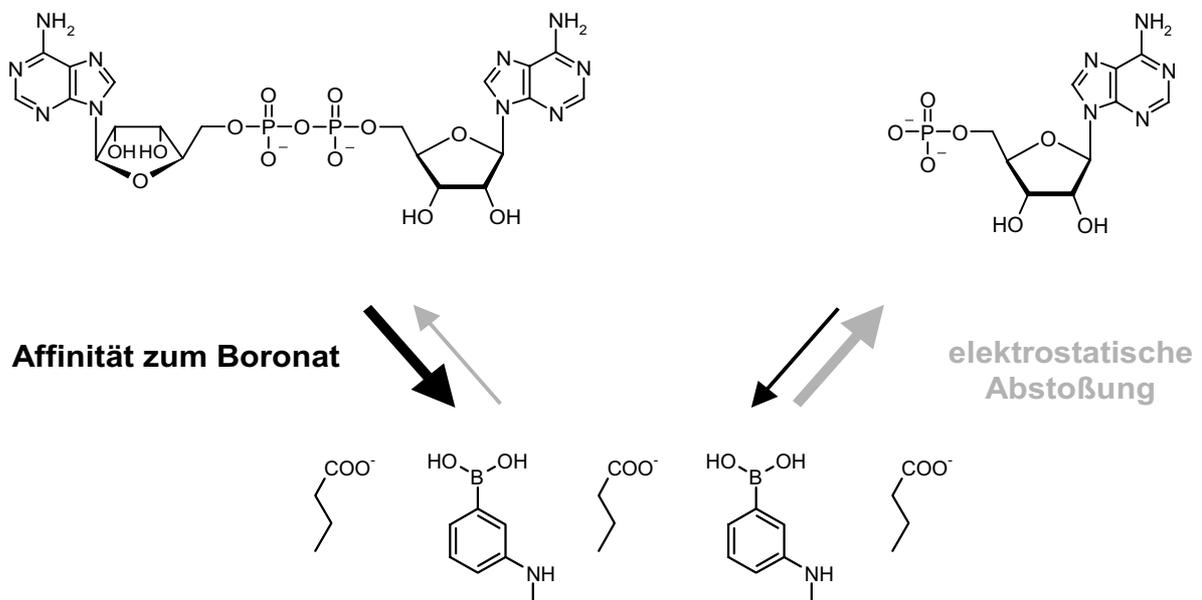


Abb. 4.1 Affinitätschromatographische Anreicherung der Dinukleotide an einem mit Phenylboronsäure derivatisierten Kationenaustauscher; Äquilibrierung des Austauschers mit 1 mol/L-Ammoniumacetat pH 9,5

Nach ausreichendem Spülen der Säule mit der Ammoniumacetat-Lösung können die gebundenen Analyten mit Wasser oder 1 mmol/L-HCl eluiert werden. Ein typisches Elutionsprofil einer authentischen Plättchenprobe ist in Abb. 4.2 dargestellt. Dabei eluieren die Dinukleosidpolyphosphate ungetrennt von der Säule, lediglich der interne Standard Dietheno-Ap<sub>2</sub>A wird etwas abgetrennt.

Bei sorgfältiger Einstellung der Salzkonzentration konnten die Mononukleotide in der Regel bis auf ein äquimolares Verhältnis zu den Dinukleosidpolyphosphaten oder sogar noch darunter abgereichert werden.

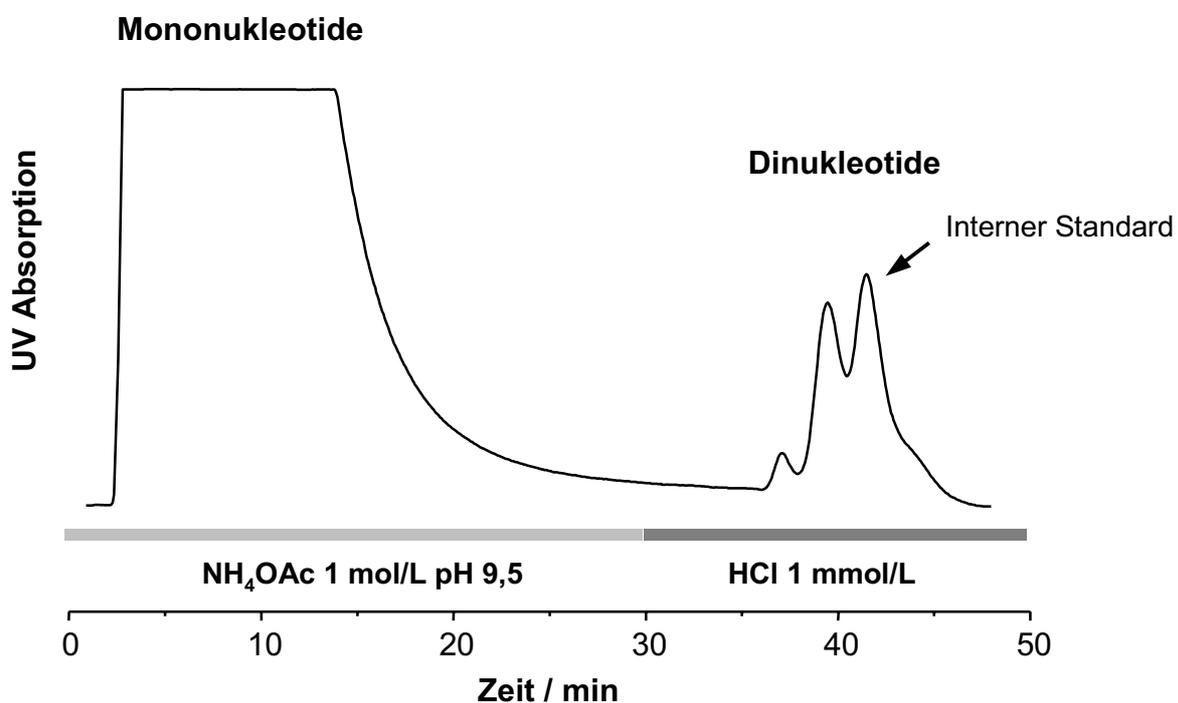


Abb. 4.2 Elutionsprofil der Boronat-Affinitätschromatographie  
(Säulendimension 5 mm \* 40 mm, Fluss 0,5 mL/min, UV-Detektion bei 254 nm)

#### 4.1.4 Entsalzung und Trocknung

Das Eluat der Affinitätschromatographie enthält eine sehr hohe Salzkonzentration, die eine direkte CE-Untersuchung nicht zulässt; außerdem ist die Analytenkonzentration im Eluat, bedingt durch das große Elutionsvolumen, nur sehr gering. Daher wurde das Eluat mittels Ionenpaar-*Reversed-Phase*-Chromatographie entsalzt und zugleich aufkonzentriert.

Dazu wurde eine RP-18-Säule mit 40 mmol/L-Triethylammoniumacetat (TEAA) pH 6,5 als Fließmittel äquilibriert; das Eluat der Boronat-Affinitätschromatographie wurde ebenfalls mit Triethylammoniumacetat bis zu einer finalen Konzentration von 40 mmol/L versetzt und auf pH 6,5 eingestellt. Die Dinukleotide bilden dabei mit dem Triethylammonium-Ion ein unter diesen Bedingungen auf der RP-Phase retinierbares Ionenpaar, während die anderen Salze (überwiegend Ammonium-, Acetat- und Chloridionen) auf der Säule nicht zurückgehalten werden. Die Elution der Dinukleotide erfolgte mit 30 % Acetonitril.

Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt. Dabei wurde auch der als Essigsäure und Triethylamin flüchtige Ionenpaarbildner aus der Probe entfernt, so dass nach dem Aufnehmen der Probe in wenigen  $\mu\text{L}$  Wasser eine praktisch salzfreie, konzentrierte Probenlösung zur Verfügung stand.

## **4.2 Untersuchung von Thrombozyten-Konzentraten und *Buffy-Coats***

Um einen Überblick über die in humanen Thrombozyten vorhandenen, nach der Probenaufarbeitung mit der Kapillarelektrophorese detektierbaren Substanzen zu bekommen, wurde zunächst ein Thrombozytenkonzentrat nach der in Kap. 4.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

In Abb. 4.3 ist das Elektropherogramm der Thrombozytenprobe vor und nach der Boronat-Affinitätschromatographie dargestellt. Man erkennt deutlich den großen Überschuss der Mononukleotide AMP, ADP und ATP sowie weiterer, hier nicht identifizierter Begleitsubstanzen. Eine Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate ist in Anwesenheit dieser Substanzen nicht gut möglich. Zum einen besteht die Gefahr, dass Analyten verdeckt werden, zum anderen ist die Substanzkonzentration in der Probe vor der Affinitätschromatographie so hoch, dass zur Vermeidung einer Überladung der Kapillare nur relativ kurze Injektionszeiten möglich sind. Dabei wird jedoch wertvolle Empfindlichkeit für die Dinukleotide verschenkt. Sind die Mononukleotide nach der Boronat-Chromatographie jedoch auf ein äquimolares Verhältnis oder sogar noch darunter abgereichert, ist es aufgrund der hohen Selektivität und Trennleistung der Kapillarelektrophorese problemlos möglich, die Dinukleosidpolyphosphate neben den verbliebenen Mononukleotiden zu bestimmen.

Als großes Problem bei der Untersuchung authentischer Proben erwies sich die Identifizierung der Analyten sowie die Sicherstellung der Peakreinheit. Während zum Beispiel bei Metabolismusuntersuchungen in der Regel nur verhältnismäßig wenige Analyten betrachtet werden, beträgt die Anzahl der möglichen Substanzen allein aus der Reihe der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  zusammen bereits 15 ( $n = 2-6$ ). Hinzu kommen die Mononukleotide AMP, ADP und ATP sowie möglicherweise noch weitere unbekannte Substanzen.

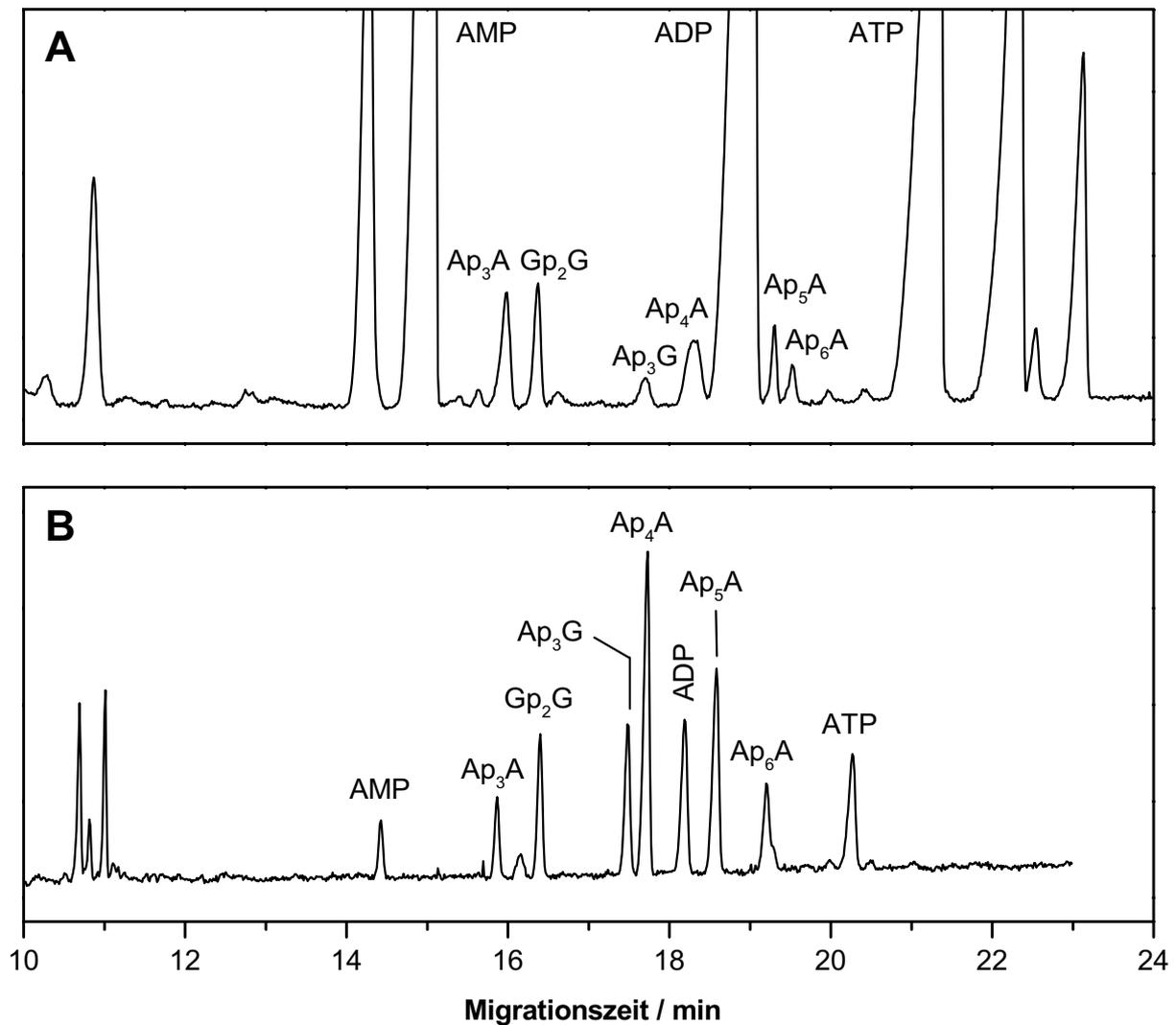


Abb. 4.3 Elektropherogramm einer Probe aus einem Thrombozytenkonzentrat (A) vor und (B) nach der Boronat-Affinitätschromatographie (Ammoniumcarbonatpuffer 50 mmol/L pH 10,0, Kap. 60/67 cm, Spannung 20 kV)

Da das Migrationsverhalten der Diadenosinpolyphosphate und ihrer Guanosinderivate im Rahmen der Methodenentwicklung bereits ausführlich untersucht worden war, wurde die Peakidentifizierung zunächst durch Koinjektion mit Referenzsubstanzen bei verschiedenen pH-Werten vorgenommen. Dabei wurde die charakteristische Abhängigkeit der Migrationszeit bzw. der Mobilität vom Puffer-pH-Wert genutzt: Während die (relative) Migrationszeit der Diadenosinpolyphosphate nahezu unabhängig vom pH-Wert des Puffers ist, werden die Guanosinderivate mit steigendem pH-Wert zu deutlich längeren Migrationszeiten verschoben (vgl. dazu Abb. 3.30 und Abb. 3.32). Um die Peakidentität zu gewährleisten, wurde die Probe nacheinander bei mindestens fünf verschiedenen pH-Werten im Bereich von 9,5–10,5 untersucht. Da der EOF in diesem pH-Bereich nahezu konstant und vom pH-Wert unabhängig ist, war der pH-Wechsel ohne längere Äquilibrierungsschritte zwischen den einzelnen Läufen möglich. Besonderes Augenmerk bei der Auswertung wurde auf eine mögliche Komigration von Analyten gelegt, die durch „zusätzliche“ oder „fehlende“ Peaks bei bestimmten pH-Werten entdeckt werden konnte.

Auf diese Weise gelang es, im Thrombozytenkonzentrat die Verbindungen  $Ap_3A$  bis  $Ap_6A$  sowie  $Gp_2G$  und  $Ap_3G$  zu identifizieren (s. Abb. 4.4). Weitere, nicht identifizierbare Peaks im Migrationszeitbereich der Dinukleosidpolyphosphate waren so gut wie nicht feststellbar. Die Identität der Peaks um 11 Minuten in Abb. 4.3 bzw. bei der relativen Migrationszeit 1,5 in Abb. 4.4 konnte nicht geklärt werden. Aufgrund der selektiven Probenaufarbeitung sollte es sich um Dinukleotide handeln, allerdings besitzen sie eine deutlich geringere Migrationszeit und damit auch negative Ladung als selbst der kleinste Vertreter der Diadenosinpolyphosphate,  $Ap_2A$ . Möglicherweise handelt es sich um  $NAD^+$  oder ähnliche Verbindungen mit einer positiven Ladung im Bereich der Nukleobase; dies wurde jedoch nicht weiter untersucht.

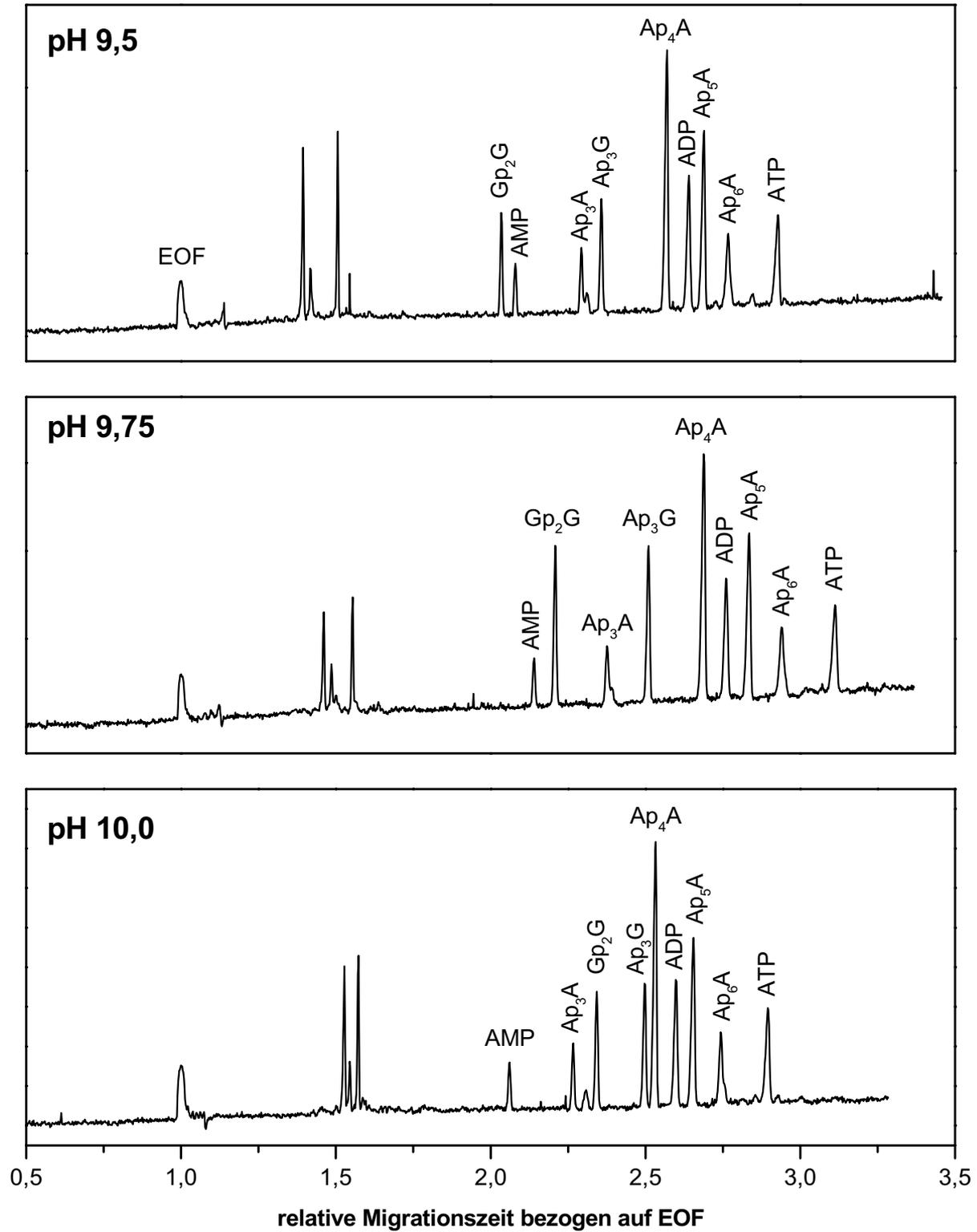


Abb. 4.4 Elektropherogramme einer Probe aus einem Thrombozytenkonzentrat bei verschiedenen pH-Werten  
(Bedingungen siehe Abb. 4.3)

Da die Identifizierung der Analyten über das Migrationsverhalten bei verschiedenen pH-Werten zum einen relativ zeitaufwändig, zum anderen auch nicht absolut sicher ist, wurde nach möglichen Alternativen gesucht.

Zunächst wurde versucht, ein Online-DAD-Spektrum jedes Peaks aufzunehmen. Aber die Empfindlichkeit des Dioden-Array-Detektors war nicht hoch genug, um auswertbare Spektren bei der Untersuchung authentischer Thrombozytenproben zu erhalten. Darüber hinaus sind die UV-Spektren der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  und  $Gp_nG$  sowohl bei pH 9,8 als auch bei pH 10,35 nur geringfügig verschieden: Während die Diadenosinpolyphosphate bei beiden pH-Werten ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, ist das Maximum für die Adenosin-Guanosinpolyphosphate hypsochrom auf 256 nm (pH 9,8 und 10,35) und für die Diguanosinpolyphosphate hypsochrom auf 254 nm (pH 9,8) bzw. 253 nm (pH 10,35) verschoben. Neben der nur geringen Diskriminierung zwischen den Purin-Basen bietet das UV-Spektrum auch keine Möglichkeit, zwischen den verschiedenen Homologen sowie zwischen den Mono- und Dinukleotiden mit gleicher Nukleobase zu unterscheiden, da das Chromophor bei diesen Verbindungen identisch ist. In Abb. 4.5 sind die Online-DAD-Spektren von höher konzentrierten Referenzsubstanzen am Beispiel von  $Ap_2A$ ,  $Ap_2G$  und  $Gp_2G$  exemplarisch dargestellt.

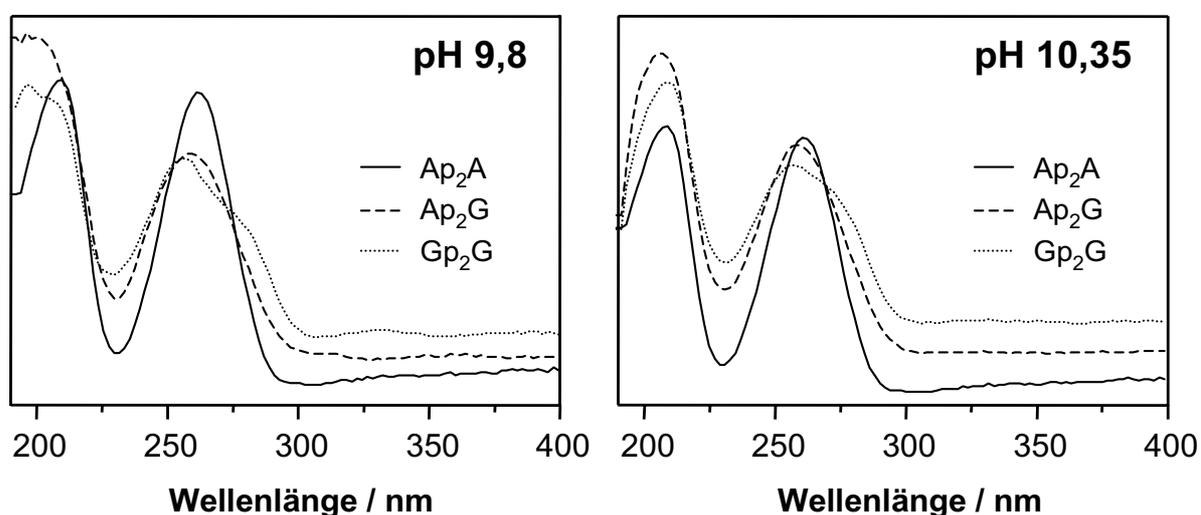


Abb. 4.5 Online-DAD-Spektren von  $Ap_2A$ ,  $Ap_2G$  bzw.  $Gp_2G$  bei pH 9,8 und 10,35 (Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

In der HPLC-Analytik der Dinukleosidpolyphosphate ist es gängige Praxis, die einzelnen Peaks nach der UV-Detektion zu fraktionieren und die Identität jeder einzelnen Fraktion über MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu bestimmen.<sup>12,14</sup> In der Kapillarelektrophorese ist die injizierte Probenmenge jedoch nur ca. ein Tausendstel im Vergleich zur HPLC, so dass für die massenspektrometrische Analyse die Fraktionierung zahlreicher CE-Läufe nötig wäre. Außerdem ist es aufgrund der dichten Peakfolge sehr schwierig, einen bestimmten Peak exakt zu fraktionieren, auch weil der Analyt nach der Detektion im Detektionsfenster noch die Strecke bis zum Kapillarausgang zurücklegen muss. Die Zeit dafür ist von seiner Eigenmobilität abhängig und kann so von Lauf zu Lauf variieren. Außerdem ist für die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-Ionisierung eine salzfreie Probe erforderlich, so dass die fraktionierte minimale Probenmenge zusätzlich noch mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie gereinigt werden müsste. Daher ist die Fraktionierung und *offline*-massenspektrometrische Analyse in der CE zur Bestimmung der Identität nicht sinnvoll.

Aus diesem Grunde wurde versucht, eine *online*-CE/MS-Kopplung durchzuführen. Da der Ammoniumcarbonat-Puffer im Vakuum flüchtig ist, ist das verwendete Trennsystem MS-kompatibel und kann für eine CE/MS-Kopplung verwendet werden. Die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion reicht aber aufgrund der erforderlichen Zugabe von *Sheath*-Flüssigkeit zwischen CE-Gerät und Massenspektrometer nicht aus, um die Analyten in Realproben, also Plättchenproben, detektieren zu können. Für Standardlösungen mit höheren Konzentrationen der Analyten war die CE/MS-Kopplung jedoch problemlos möglich (vgl. Kap. 5).

Um zumindest eine Identifizierung aller in der Probe enthaltenen Dinukleotide zu ermöglichen, wurde ein Aliquot der nach vollständiger Aufarbeitung erhaltenen Probe ohne weitere Auftrennung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Als Probenmatrix diente eine 5%ige Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure in Acetonitril/Wasser. Um eventuell vorhandene, die Messung störende Salze zu binden, wurden einige Körnchen eines Kationenaustauschers hinzugegeben. Die Messung wurde im Positiv-Ionen-Modus durchgeführt – die Dinukleotide werden dabei trotz ihrer aciden Phosphatgruppen als kationische Protonenaddukte detektiert. In Abb. 4.6 ist das MALDI-TOF-Massenspektrum einer  $A_p_nA$ -Standardlösung sowie der Thrombozytenprobe aus Abb. 4.4 abgebildet.

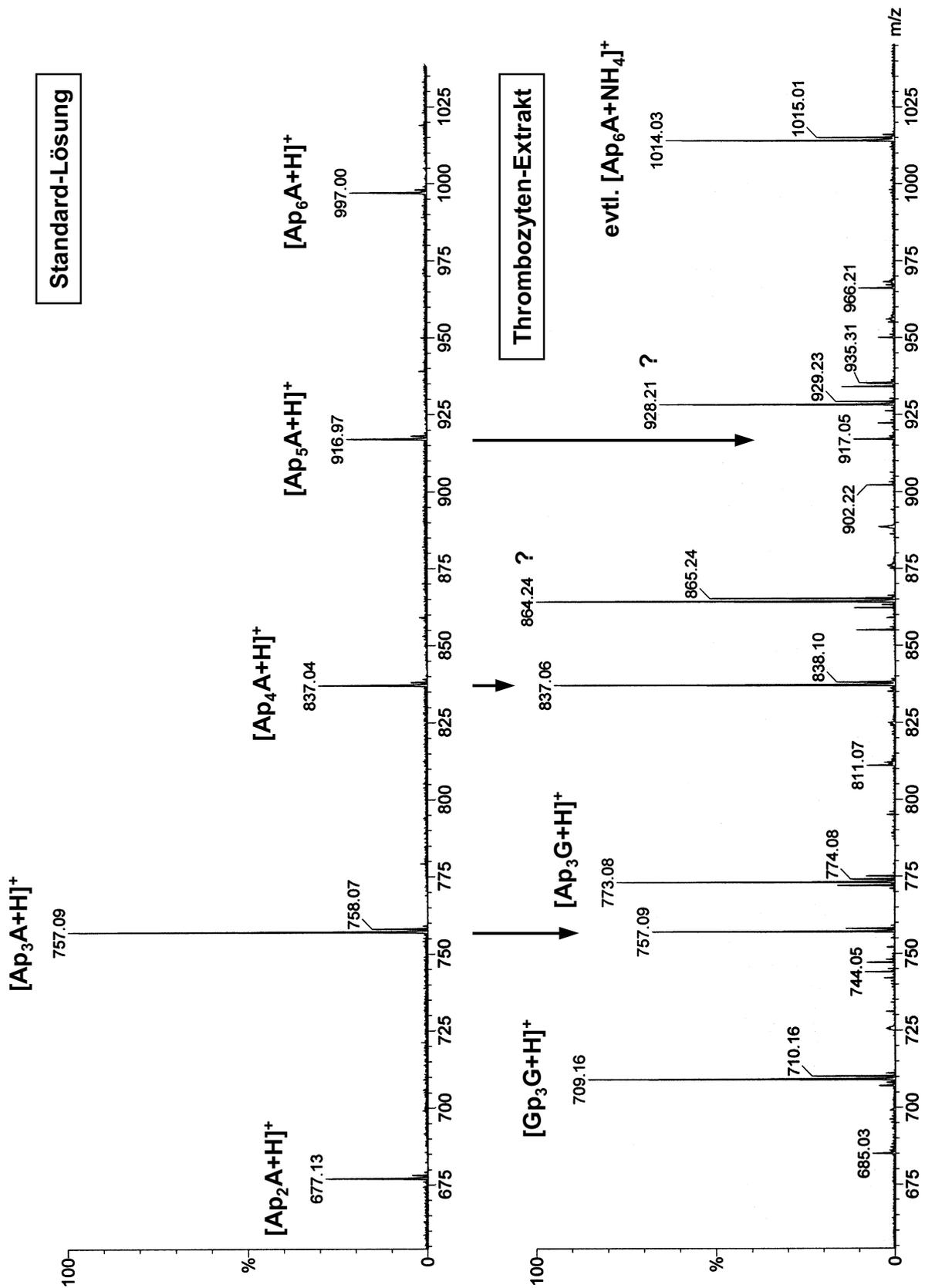


Abb. 4.6 MALDI-TOF-Massenspektrum einer Ap<sub>n</sub>A-Standardlösung sowie der Thrombozytenprobe aus Abb. 4.4 (Probenmatrix 5 % 3-Hydroxypicolinsäure in Acetonitril/Wasser 50+50)

Wie Abb. 4.6 zeigt, können in der Standardlösung  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  gut detektiert werden. Die Untersuchung der Thrombozytenprobe ergab ein dem Ergebnis der Migrationszeitvergleiche in der CE entsprechendes Resultat; im Falle von Diadenosinhexaphosphat konnte aber nur ein Ion mit dem  $m/z$ -Verhältnis von  $[Ap_6A+NH_4]^+$  identifiziert und damit  $Ap_6A$  nicht mit letzter Sicherheit nachgewiesen werden.

Bei der MALDI-Massenspektrometrie ist es nicht möglich, aus der Signalintensität Rückschlüsse auf die Konzentration der Analyten zu ziehen. Wie bei anderen Ionisierungsarten auch, z. B. Elektrospray- oder *Atmospheric-Pressure*-Ionisierung, ist die Signalintensität zwar proportional zur Zahl der im Massenspektrometer registrierten Ionen. Im Gegensatz zu den anderen Ionisierungstechniken wird aber bei MALDI nicht die ganze Probe ionisiert, sondern nur der winzige Bruchteil, der auf dem Probeneller mit dem Laserstrahl angeregt wird. Die Probe ist zwar anfangs homogen in der Matrix verteilt, aber durch die Kristallisationsvorgänge der Matrix während des Eindampfens der Probe kommt es zur Ausbildung von Inhomogenitäten, so dass die Konzentration der Analyten in dem vom Laserstrahl angeregten Ausschnitt nicht zwangsläufig die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse in der Probe widerspiegelt. Da die Desorbierbarkeit der Analyten neben ihrer Struktur auch noch stark von der Anordnung der umgebenden Matrixmoleküle abhängt, ist die quantitative Auswertung eines MALDI-Massenspektrums nicht ohne weiteres möglich.

Das Massenspektrum in Abb. 4.6 zeigt zwei mit einem Fragezeichen markierte Signale bei  $m/z$  864 bzw. 928. Die Identität dieser Verbindungen konnte nicht geklärt werden. Aufgrund ihrer Masse gehören sie nicht zur Gruppe der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  oder  $Gp_nG$ . Auch aus dem Fragmentierungsmuster in der ESI-MS/MS-Massenspektrometrie konnte keine Klarheit über ihre Identität gewonnen werden.

Allein aus dem Massenspektrum der vollständigen Plättchenprobe können weder Identität noch Reinheit der Signale in der Kapillarelektrophorese geklärt werden. Zusammen jedoch mit den Komigrationsexperimenten bei mindestens zwei pH-Werten und der Kenntnis des charakteristischen Migrationsverhaltens der  $Ap_nA$ ,  $Ap_nG$  bzw.  $Gp_nG$  sind aber sowohl Identität als auch Reinheit der Peaks hinreichend abgesichert.

Vor der eigentlichen Untersuchung humaner Vollblutproben sollte noch ein weiteres Thrombozytenkonzentrat aufgearbeitet werden. Bedingt durch eine zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen herrschende generelle Verknappung an Blutkonserven war es aber nicht möglich, ein weiteres Thrombozytenkonzentrat zu erhalten. Daher wurden für diesen Zweck zwei sogenannte *Buffy-Coats* gepoolt und die Dinukleotide wie in Kap. 4.1.1 beschrieben isoliert.

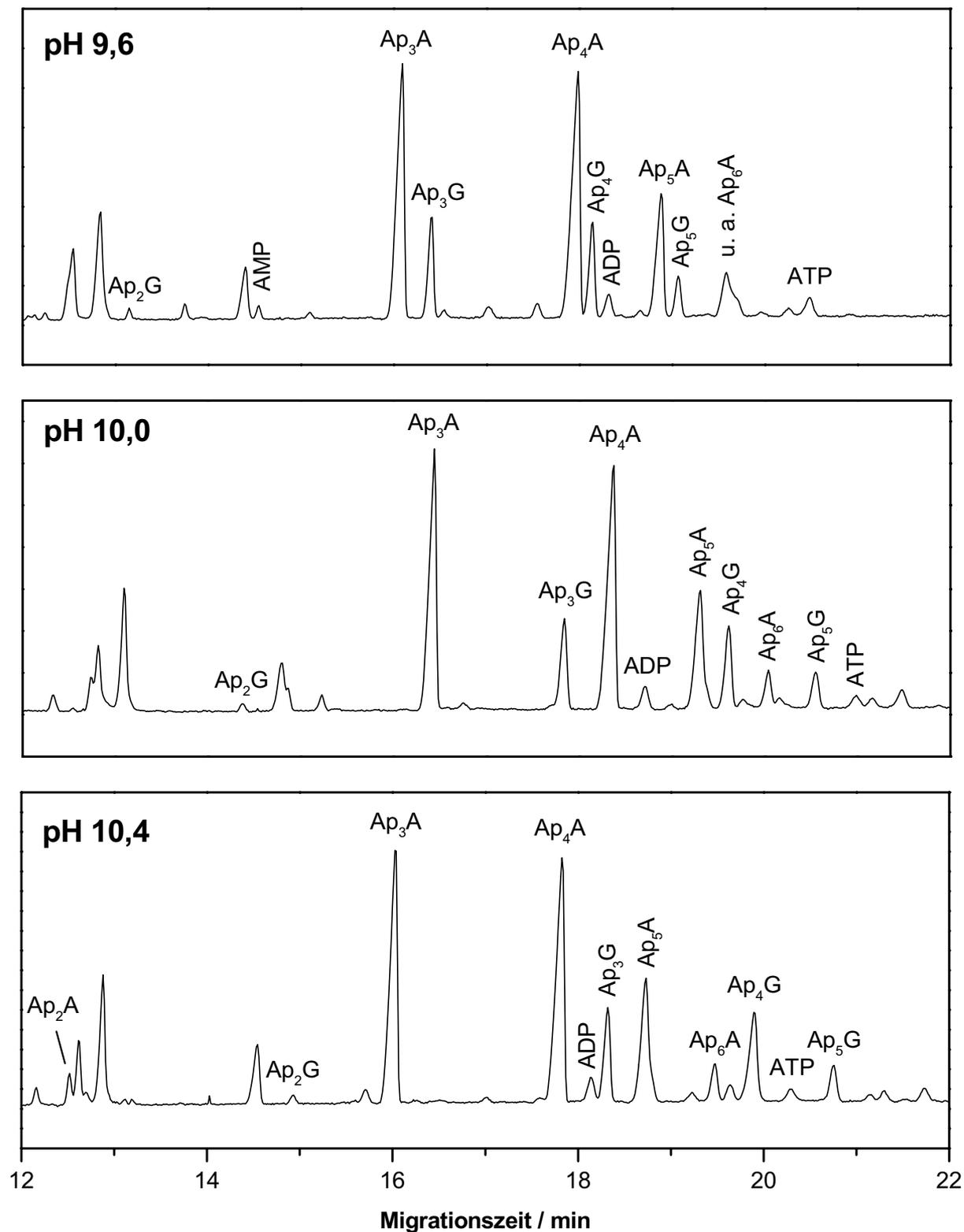


Abb. 4.7 Elektropherogramme einer *Buffy-Coat*-Probe bei verschiedenen pH-Werten (Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

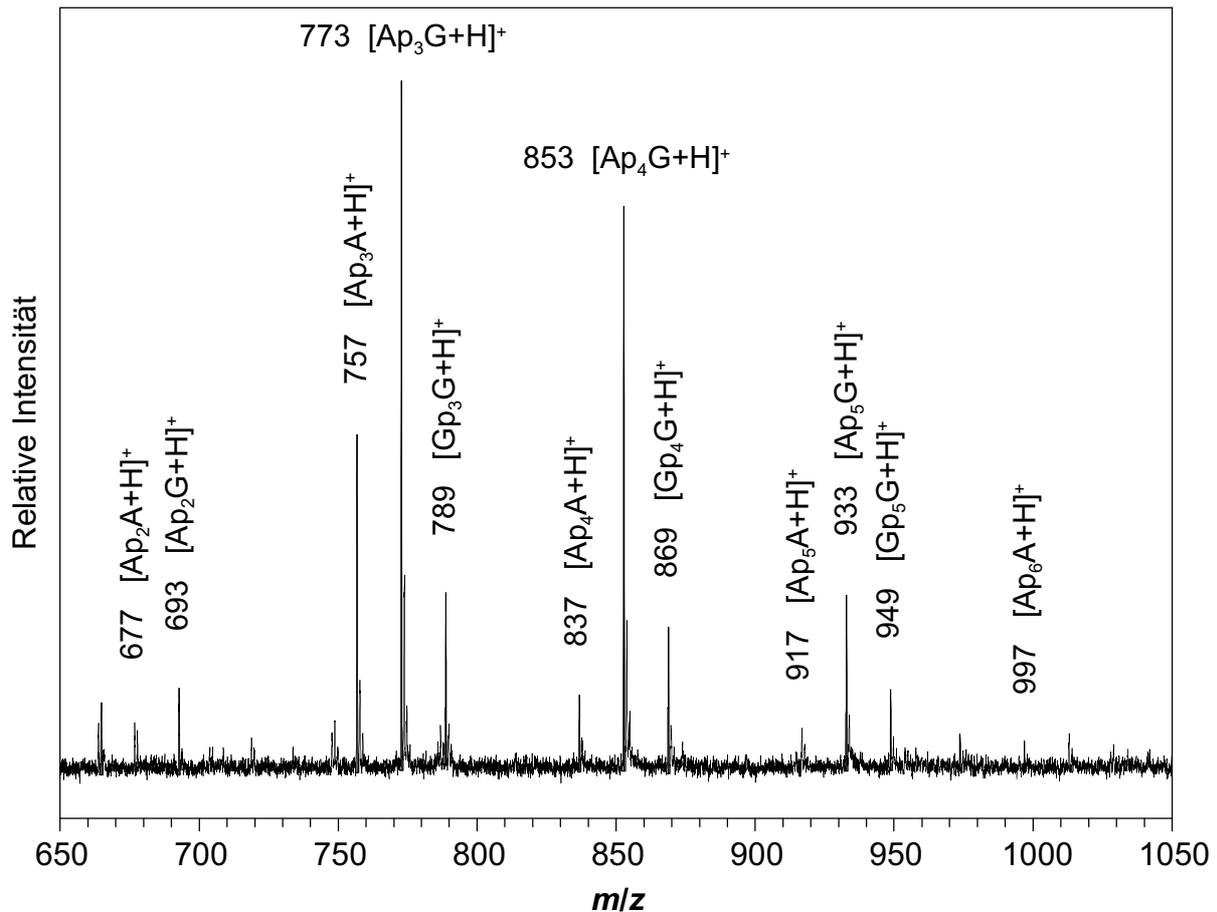


Abb. 4.8 MALDI-TOF-Massenspektrum der Buffy-Coat-Probe aus Abb. 4.7  
(Probenmatrix 5 % 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser)

Durch die beschriebene Methode der Koinjektion und des Migrationszeitvergleichs konnten in der *Buffy-Coat*-Probe die Verbindungen Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>2</sub>G bis Ap<sub>5</sub>G identifiziert werden (vgl. Abb. 4.7). Die Untersuchung der Probe mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigte das Vorliegen dieser Analyten, allerdings wurden zusätzlich Signale für Gp<sub>3</sub>G, Gp<sub>4</sub>G und Gp<sub>5</sub>G gefunden (Abb. 4.8). Vermutlich ist die Konzentration dieser Verbindungen jedoch so gering, dass sie in der Kapillarelektrophorese nicht oder nur als sehr schwache Signale detektiert werden können – im erwarteten Migrationszeitbereich der Diguanosinpolyphosphate konnten in den Elektropherogrammen alle deutlichen Signale identifiziert werden. Referenzsubstanzen für Koinjektionsversuche standen für diese drei Diguanosinpolyphosphate nicht zur Verfügung.

Interessanterweise wurden in dieser Probe aus *Buffy-Coats* weder mit der Kapillarelektrophorese noch mit der Massenspektrometrie Hinweise auf Gp<sub>2</sub>G gefunden, das in der Probe aus dem Thrombozytenkonzentrat in nennenswerter Konzentration nachgewiesen werden konnte. Der Grund dafür könnte möglicherweise in der interindividuellen Variation der Plättcheninhalte zu suchen sein, allerdings wurde auch in keiner der später untersuchten Vollblutproben eine solch nennenswerte Menge von Gp<sub>2</sub>G gefunden.

### 4.3 Bestimmung aus humanem Vollblut

Die Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in den Blutplättchen verschiedener Probanden sollte anhand von Vollblutproben durchgeführt werden, da diese einerseits leicht verfügbar waren und andererseits auch sofort nach der Entnahme aufgearbeitet werden konnten. Zur Erzielung ausreichender Empfindlichkeit in der Kapillarelektrophorese wurde das abzunehmende Blutvolumen auf 20 mL festgesetzt. In dieser Blutmenge sind etwa  $3-8 \cdot 10^9$  Thrombozyten enthalten. Eine Standardisierung der Thrombozytenzahl fand über das abgenommene Blutvolumen statt. Von JANKOWSKI und Mitarbeitern war gezeigt worden, dass der Bezug der gefundenen Dinukleotidmenge auf das Blutvolumen der Probe die am besten reproduzierbaren Ergebnisse liefert.<sup>12</sup>

#### 4.3.1 Interner Standard

Für eine validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in Humanthrombozyten ist die Verwendung eines internen Standards (IS) aufgrund der aufwändigen Probenvorbereitung und der im Vergleich zur HPLC weniger präzisen Probeninjektion der Kapillarelektrophorese zwingend erforderlich.

In den bisher veröffentlichten Arbeiten zur Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate mittels HPLC wurde als interner Standard Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Ap<sub>6</sub>A (auch als  $\epsilon$ -Ap<sub>6</sub>A bezeichnet) verwendet. Bei diesem semisynthetischen Derivat sind der Stickstoff in Position 1 und die exozyklische Aminogruppe an Position 6 des Purinringes in beiden Nukleobasen durch eine Etheno-Brücke zu einem Imidazolring verbunden. Dieses Dinukleotid kommt in humanen Thrombozyten nicht vor, besitzt aber trotzdem große strukturelle Ähnlichkeit mit den Dinukleosidpolyphosphaten. Als interner Standard für die Kapillarelektrophorese war  $\epsilon$ -Ap<sub>6</sub>A jedoch nicht geeignet, da er nur unvollständig von Ap<sub>5</sub>A abgetrennt wurde.

An einen internen Standard für die CE mussten folgende Anforderungen gestellt werden:

- kein natürliches Vorkommen oder kein Nachweis in Thrombozyten
- strukturelle Ähnlichkeit mit den Dinukleosidpolyphosphaten
- mindestens zwei *cis*-Diol-Gruppen, um bei der Boronat-Affinitätschromatographie gebunden zu werden
- gute Abtrennung von den Analyten
- Stabilität während der Probenaufarbeitung
- möglichst kommerzielle Verfügbarkeit in bekannter Reinheit und wägbaren Mengen

Vor allem die erforderliche Bindung bei der Boronat-Affinitätschromatographie erwies sich dabei als stark einschränkendes Kriterium.

Die Möglichkeit, Ap<sub>7</sub>A oder Ap<sub>8</sub>A als internen Standard einzusetzen – wie das bei neueren HPLC-Untersuchungen getan wird<sup>62</sup> – erwies sich wegen mangelnder Selektivität zwischen Ap<sub>6</sub>A und Ap<sub>7</sub>A in der Kapillarelektrophorese und der augenblicklichen schwierigen Verfügbarkeit von Ap<sub>8</sub>A als nicht praktikabel.

Daraufhin wurden die beiden Dinukleotide NAD<sup>+</sup> und NADH auf ihre Eignung als interner Standard untersucht. Vor allem NAD<sup>+</sup> schien alle oben gestellten Anforderungen zu erfüllen. Aber diese Substanz erwies sich gegenüber der Perchlorsäurefällung als nicht stabil. In den nach der Probenaufarbeitung erhaltenen Elektropherogrammen konnte NAD<sup>+</sup> teilweise nur noch in geringen Mengen (< 10 % des Ausgangswertes) nachgewiesen werden. Eine Zugabe der Substanz nach der Perchlorsäurefällung unmittelbar vor der Affinitätschromatographie konnte zwar das Stabilitätsproblem lösen, aber die Reproduzierbarkeit in Wiederfindungsexperimenten mit wässrigen Standardlösungen war unbefriedigend (vgl. Tab. 4.1). Möglicherweise hängt dies mit der positiven Ladung der Substanz im Pyridinring zusammen, die eine starke Retention auf dem Kationenaustauscher, aber nur eine schwache Retention bei der Ionenpaar-*Reversed-Phase*-Chromatographie und damit schwankende Ergebnisse bedingt. Die reduzierte Form NADH war aufgrund der fehlenden positiven Ladung für die chromatographischen Schritte deutlich besser geeignet, konnte aber wegen ihrer hohen Oxidationsempfindlichkeit auch bei Zugabe nach der Perchlorsäurefällung nicht als Standard verwendet werden. So trat zum Beispiel schon deutlicher Abbau in einer wässrigen Probenlösung auf dem Probensteller des Kapillarelektrophoresesystems durch Einwirkung von Luftsauerstoff ein.

	NAD <sup>+</sup> (IS)	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
Wiederfindung absolut (in %)	54 ± 4,7	83 ± 5,9	76 ± 5,3	72 ± 5,3	70 ± 6,0	64 ± 5,8
Wiederfindung rela- tiv zu NAD <sup>+</sup> (in %)		154 ± 3,1	143 ± 13,4	135 ± 13,5	131 ± 15,0	120 ± 16,6

Tab. 4.1 Wiederfindung von NAD<sup>+</sup> und Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A aus wässriger Lösung nach vollständiger Probenaufarbeitung (Mittelwert ± SDV,  $n = 3$ )  
(Zugabe von NAD<sup>+</sup> unmittelbar vor Boronat-Affinitätschromatographie)

Da kein weiterer potentiell geeigneter Standard kommerziell erhältlich war, wurde das Ap<sub>2</sub>A-Analogon des HPLC-Standards Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Ap<sub>6</sub>A semisynthetisch hergestellt. Die Synthese von Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Ap<sub>2</sub>A ( $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A) gelang unter Abwandlung der Vorschrift von IWATA<sup>16</sup> durch Eintopf-Reaktion von Ap<sub>2</sub>A mit Chloracetaldehyd (vgl. Abb. 4.9).

Im Gegensatz zur ursprünglichen Vorschrift wurde dabei das Stoffmengen-Verhältnis von Chloracetaldehyd zu Dinukleotid von 10.000:1 auf etwa 2.000:1 verringert und die Reaktionstemperatur von 80 °C auf 50 °C gesenkt, um die Bildung von Nebenprodukten möglichst zu unterdrücken. Da außerdem auf die Zugabe eines Puffers verzichtet und der pH-Wert der Chloracetaldehyd-Lösung nur durch Titration mit Natronlauge eingestellt wurde, konnte der Verlauf der Reaktion mit der Kapillarelektrophorese durch direkte Injektion des Reaktionsgemisches verfolgt werden (s. Abb. 4.10). Über nicht näher identifizierte Intermediate bildete sich zunächst das Mono-Ethenoderivat, das sich dann mit überschüssigem Chloracetaldehyd zum Di-Ethenoderivat umsetzte. Nach ca. 16 Stunden war die Reaktion abgeschlossen; das Monoethenoderivat war dann nur noch in geringer Menge vorhanden (Abb. 4.10). Weitere Neben- und Abbauprodukte wurden nicht in nennenswerter Menge festgestellt. Durch den Ringschluss zum Imidazol nahm der Absorptionskoeffizient bei 254 nm stark ab, so dass der Peak des Reaktionsproduktes  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A auch nach nahezu vollständiger Umsetzung deutlich kleiner als der des Ausgangsproduktes Ap<sub>2</sub>A war.

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch wie in Kap. 4.1.4 beschrieben über Ionenpaar-*Reversed-Phase*-Chromatographie aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Identität des Reaktionsproduktes mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft. Dabei war nur das Signal von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A bei  $m/z$  725,1 detektierbar; Neben- oder Abbauprodukte konnten nicht festgestellt werden.

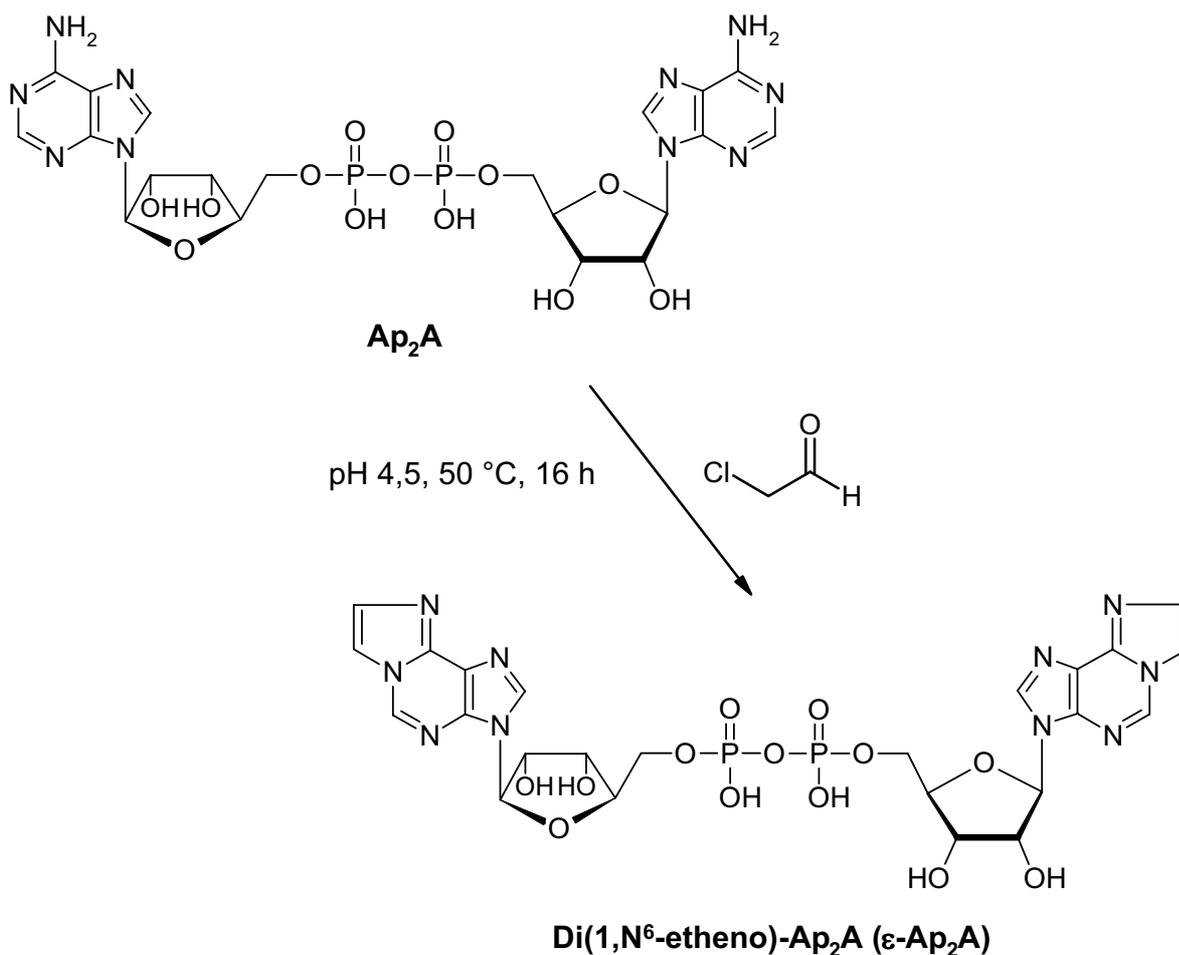


Abb. 4.9 Semisynthetische Darstellung von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A aus Ap<sub>2</sub>A

Wiederfindungsexperimente wässriger Standardlösungen nach vollständiger Proben- aufarbeitung mit  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A als internem Standard lieferten ausgezeichnete Ergebnisse (s. Tab. 4.2). Vor allem die Präzision war gegenüber den gleichen Experimenten mit NAD<sup>+</sup> als internem Standard etwa um den Faktor 10 verbessert, so dass  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A als geeigneter interner Standard angesehen wurde. Allerdings fanden sich in den Elektropherogrammen Hinweise auf Zersetzungsprodukte von Dietheno-Ap<sub>2</sub>A (ca. 10–15 Flächen-%). Dies ist insofern verwunderlich, als für die Diadenosinpolyphosphate keine solchen Abbauprodukte beobachtet wurden, die modifizierte Nukleobase der Ethenoverbindung chemisch stabil sein sollte und die Analogsubstanz  $\epsilon$ -Ap<sub>6</sub>A bereits mehrfach in HPLC-Untersuchungen verwendet worden war. Von den Autoren dieser Untersuchungen waren keine Zersetzungsprodukte des internen Standards berichtet worden. Möglicherweise ist  $\epsilon$ -Ap<sub>6</sub>A gegenüber der Perchlorsäurefällung stabiler als  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A, wahrscheinlicher ist aber, dass ein mögliches Abbauprodukt des internen Standards in der HPLC nicht abgetrennt und daher auch nicht bemerkt wurde.  $\epsilon$ -Ap<sub>6</sub>A

stand nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um dies verifizieren zu können. Um bei der anschließenden Untersuchung der Blutproben kein Risiko wegen einer möglichen Instabilität einzugehen, wurde der interne Standard  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A im folgenden erst unmittelbar vor der Boronat-Affinitätschromatographie zugesetzt.

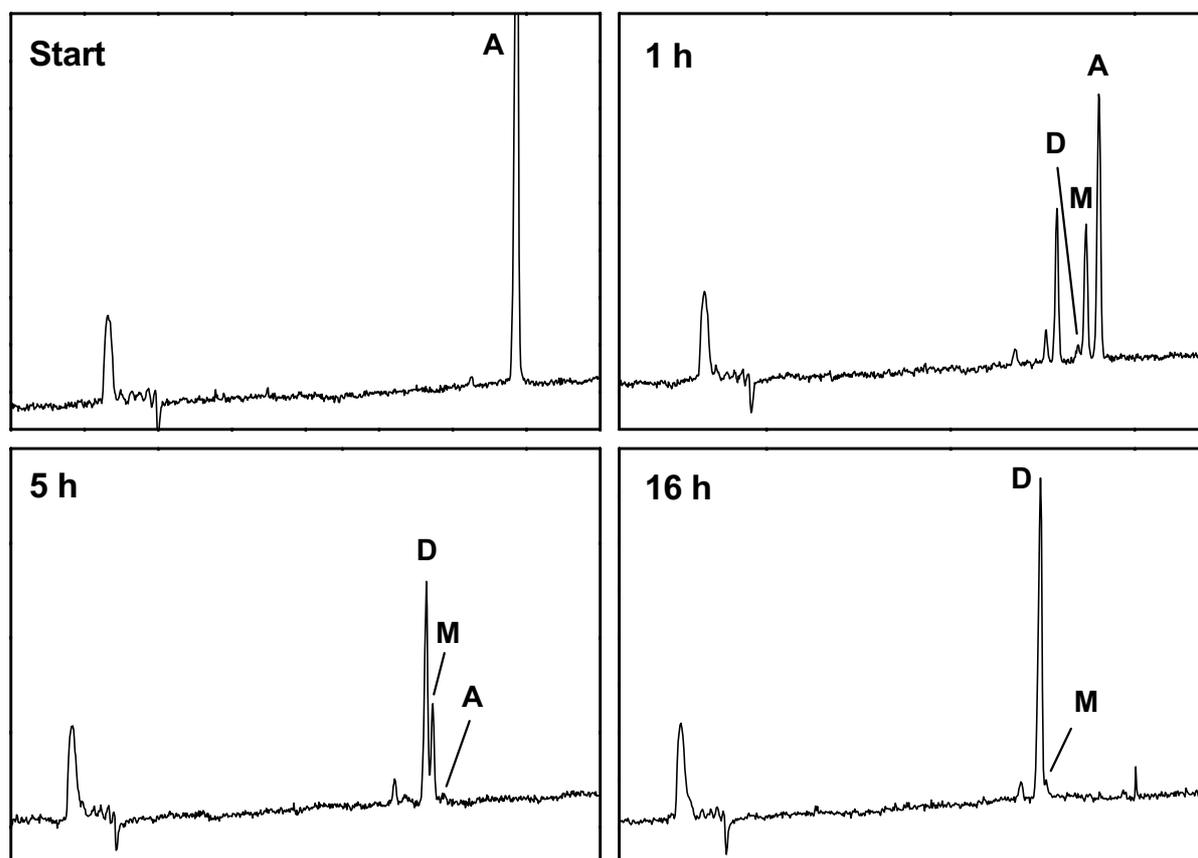


Abb. 4.10 Verlauf der Reaktion von Ap<sub>2</sub>A mit Chloroacetaldehyd

A = Ausgangsprodukt, M = Monoetheno-Ap<sub>2</sub>A, D = Dietheno-Ap<sub>2</sub>A

(CE-Bedingungen: Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L pH 9,9, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV, direkte Injektion des Reaktionsgemisches)

	$\epsilon$ -Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
Wiederfindung absolut (in %)	81 ± 2,6	85 ± 2,8	84 ± 2,8	83 ± 2,3	81 ± 2,3	75 ± 2,5
Wiederfindung relativ zum IS (in %)		105 ± 1,6	104 ± 1,8	102 ± 1,4	100 ± 0,5	93 ± 1,1

Tab. 4.2 Wiederfindung von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A und Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A aus wässriger Lösung nach vollständiger Probenaufarbeitung (Mittelwert ± SDV,  $n = 3$ )

### 4.3.2 Validierung

Die Validierung der Bestimmung von Dinukleosidpolyphosphaten aus Humanthrombozyten sollte so weit wie möglich in Anlehnung an die von der FDA<sup>63,64</sup> bzw. ICH<sup>65,66</sup> veröffentlichten Richtlinien erfolgen. Abweichungen von diesen Richtlinien waren jedoch unvermeidbar, da beispielsweise keine Leermatrix zur Verfügung stand oder aufgrund der aufwändigen Probenaufarbeitung die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit nicht im normalerweise üblichen Umfang möglich war. Abweichungen von den Richtlinien werden dabei in den jeweiligen Unterkapiteln diskutiert.

Als Validierungsparameter wurden Selektivität, Arbeitsbereich mit Nachweis-, Bestimmungsgrenze und Linearität, Präzision, Wiederfindung sowie Robustheit festgelegt.

#### 4.3.2.1 Selektivität

Die Selektivität der verwendeten Methode beruht zum einen auf der selektiven Aufkonzentrierung der Dinukleotide in der Boronat-Affinitätschromatographie und zum anderen auf ihrer kapillarelektrophoretischen Trennung. Beide Schritte wurden daher getrennt untersucht.

Die Selektivität der Affinitäts-Chromatographie wurde anhand der beiden „Modellsubstanzen“ Diadenosindiphosphat und Adenosintriphosphat überprüft. Wie Abb. 4.11 zeigt, wird ein Gemisch aus Ap<sub>2</sub>A und ATP unter den in Kap. 4.1.3 beschriebenen Bedingungen vollständig und hochselektiv getrennt. Werden Gemische der Mononukleotide AMP / ADP /ATP bzw. das Dinukleotid getrennt injiziert, ergeben sich aus den resultierenden Chromatogrammen keine Hinweise auf eine Verschleppung von Mononukleotiden in den Elutionsbereich der Dinukleotide bzw. auf ein Durchbrechen von Dinukleotiden zusammen mit den Mononukleotiden. Eine Auftrennung der verschiedenen Mononukleotide findet wie erwartet nicht statt. Die Selektivität der Affinitätschromatographie kann daher nach diesen Ergebnissen als gegeben angesehen werden.

Das Migrationsverhalten der verschiedenen Mono- und Dinukleotide im Ammoniumcarbonatpuffer wurde bereits in Kap. 3.3.2 ausführlich untersucht. Wie dort diskutiert, muss der für die Bestimmung der Analyten verwendete pH-Wert in Abhängigkeit der in der Probe tatsächlich detektierbaren Analyten festgelegt werden. Zu diesem Zweck wurden mehrere Blutproben von verschiedenen Probanden aufgearbeitet und in Bezug auf die in der Kapillarelektrophorese sichtbaren Analyten verglichen. Die erhaltenen

Elektropherogramme zeigten keine signifikanten Unterschiede, so dass die massenspektrometrische Untersuchung und die Festlegung der zur Messung verwendeten pH-Werte nur an einer Probe durchgeführt wurde.

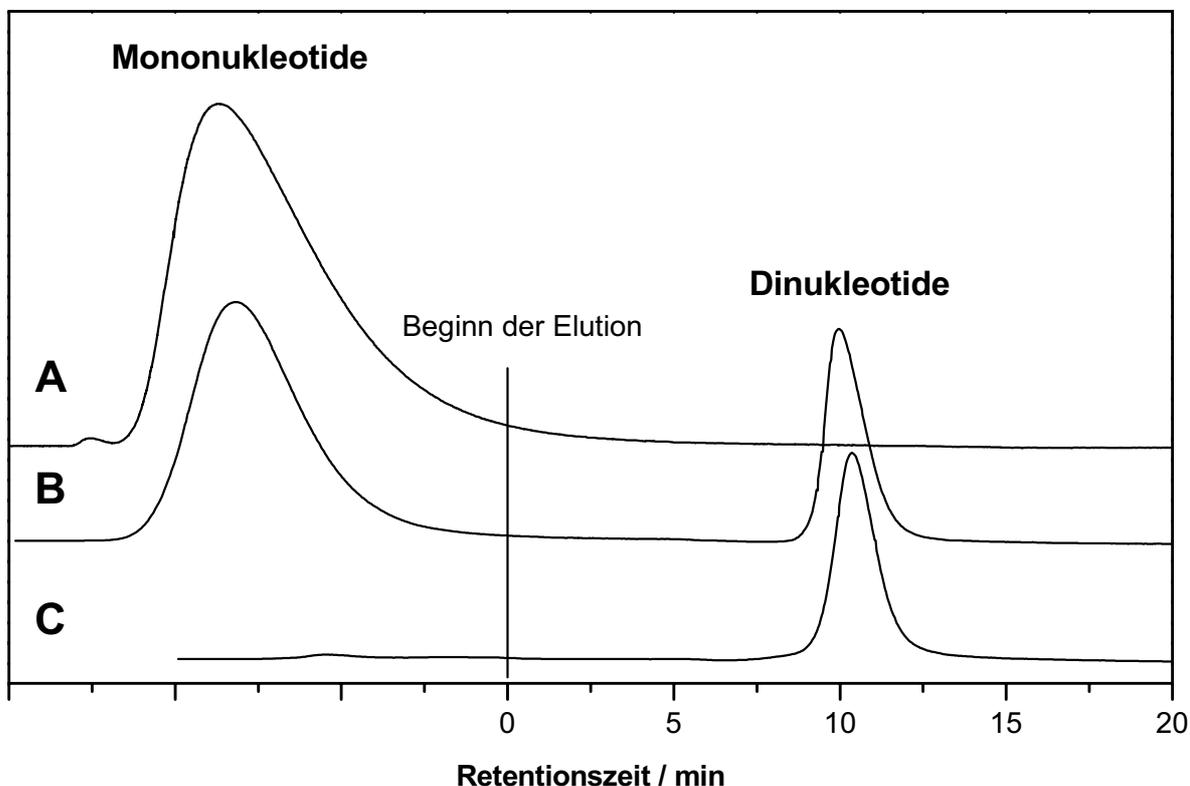


Abb. 4.11 Überprüfung der Selektivität der Boronat-Affinitätschromatographie

(Abszisse: Zeit nach Beginn der Elution mit 1 mM-HCl)

A: Gemisch aus 18  $\mu\text{g}$  AMP / 44  $\mu\text{g}$  ADP / 45  $\mu\text{g}$  ATP

B: Gemisch aus 90  $\mu\text{g}$  ATP / 20  $\mu\text{g}$  Ap<sub>2</sub>A

C: 20  $\mu\text{g}$  Ap<sub>2</sub>A

Durch eine MALDI-TOF-massenspektrometrische Analyse konnten in der Blutprobe Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>2</sub>G bis Ap<sub>5</sub>G nachgewiesen werden (s. Abb. 4.12). In der Kapillarelektrophorese wurden durch Komigrationsexperimente und Migrationszeitvergleich ebenfalls Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>4</sub>G identifiziert. Ap<sub>2</sub>G und Ap<sub>5</sub>G waren aufgrund zu geringer Konzentration in der Probe nicht nachweisbar. Andere, nicht identifizierbare Signale in nennenswerter Höhe wurden nicht festgestellt. Daher wurden als Zielanalyten für die kapillarelektrophoretische Bestimmung Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>4</sub>G festgelegt.

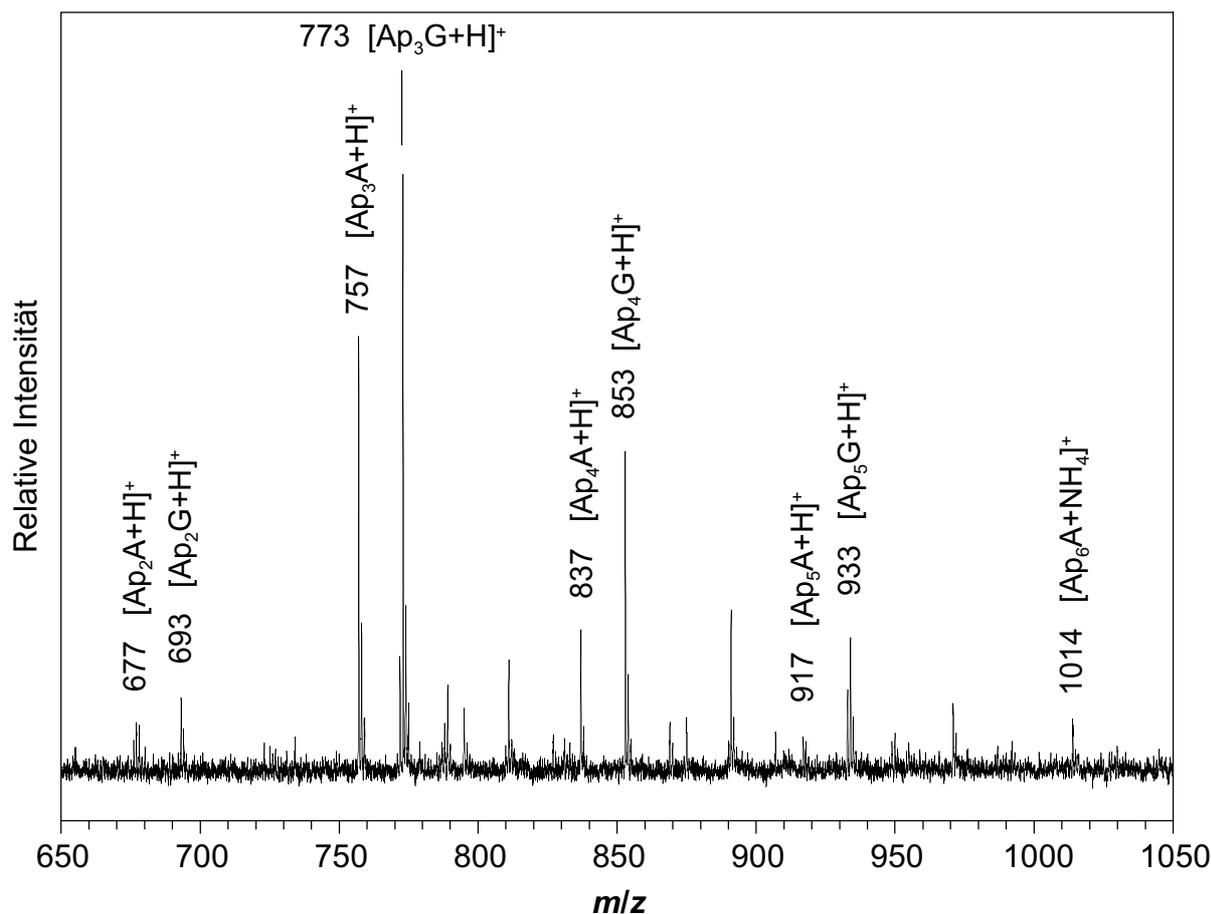


Abb. 4.12 MALDI-TOF-Massenspektrum eines aus 20 mL Vollblut gewonnenen Thrombozytenextraktes  
(Probenmatrix 5 % 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser)

Zur Erzielung maximaler Selektivität für diese Verbindungen wurde der Thrombozytenextrakt bei verschiedenen pH-Werten im Bereich von 9,5–10,5 untersucht. Als am besten geeignet erwies sich dabei die kombinierte Bestimmung der Probe bei pH 9,80 und pH 10,35. Bei pH 9,80 konnten Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A sowie Ap<sub>3</sub>G selektiv bestimmt werden. Aufgrund Überlagerung durch andere Matrixbestandteile konnte Ap<sub>2</sub>A bei diesem pH-Wert nicht erfasst werden, darüber hinaus kam es zur teilweisen Komigration von Ap<sub>4</sub>G mit ADP sowie von Ap<sub>6</sub>A mit evtl. vorhandenem Ap<sub>5</sub>G. Die fehlenden Verbindungen Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>6</sub>A sowie Ap<sub>4</sub>G konnten anschließend bei pH 10,35 bestimmt werden; eine teilweise Komigration von Ap<sub>3</sub>G mit ADP bei diesem pH-Wert störte nicht, da Ap<sub>3</sub>G bereits bei pH 9,80 bestimmt worden war. Eventuell vorhandenes Ap<sub>5</sub>G wäre bei pH 10,35 ebenfalls detektierbar. Die entsprechenden Elektropherogramme sind in Abb. 4.13 gezeigt.

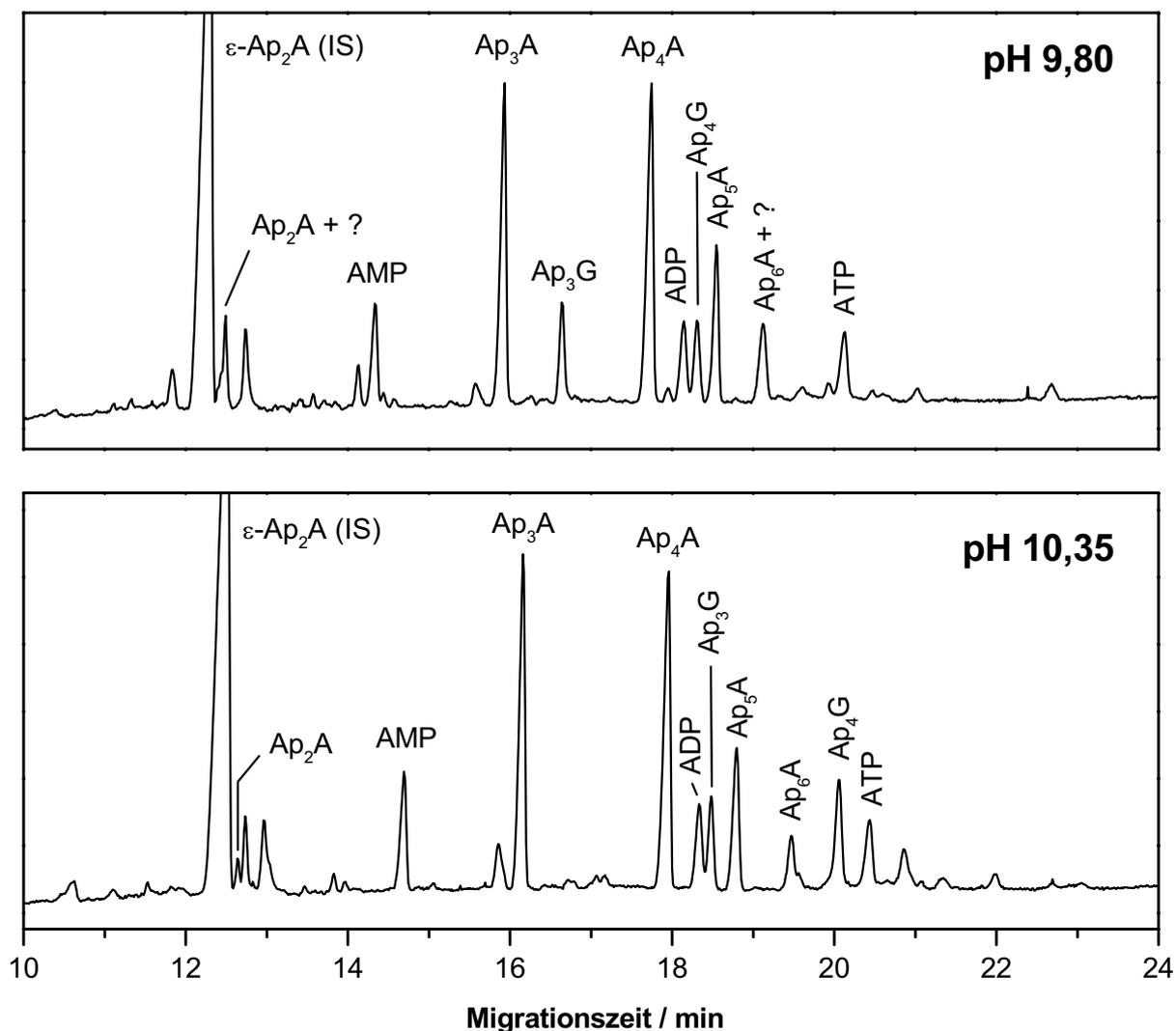


Abb. 4.13 Elektropherogramme des Thrombozytenextraktes aus Abb. 4.12  
(Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

Durch die Messung bei diesen zwei verschiedenen pH-Werten waren alle Zielanalyten selektiv bestimmbar. Natürlich war es aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Plättchenproben nicht auszuschließen, dass in der einen oder anderen Probe neue, bisher nicht beobachtete Interferenzen auftreten konnten. Dieses Problem wäre nur durch die Möglichkeit einer online-massenspektrometrischen Detektion zu umgehen, die jedoch zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen technisch nicht möglich war. In den bisher veröffentlichten Bestimmungen der Diadenosinpolyphosphate in Humanthrombozyten mittels HPLC war die Selektivität der Methode ebenfalls nur exemplarisch an einer Probe untersucht worden.<sup>12,14</sup> Allerdings wurde bei keiner der in dieser Arbeit untersuchten Plättchenproben weder bei pH 9,80 noch bei pH 10,35 ein signifikantes unbekanntes Signal im Migrationszeitbereich der Analyten gefunden.

Vor Verwendung wurde der interne Standard  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A ebenfalls auf eventuell störende Abbau- oder Nebenprodukte überprüft. Solche konnten nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 4.14). Der einzige detektierbare Nebenpeak bei 12,5 Minuten ist gut abgetrennt und interferiert nicht mit den Dinukleosidpolyphosphaten.

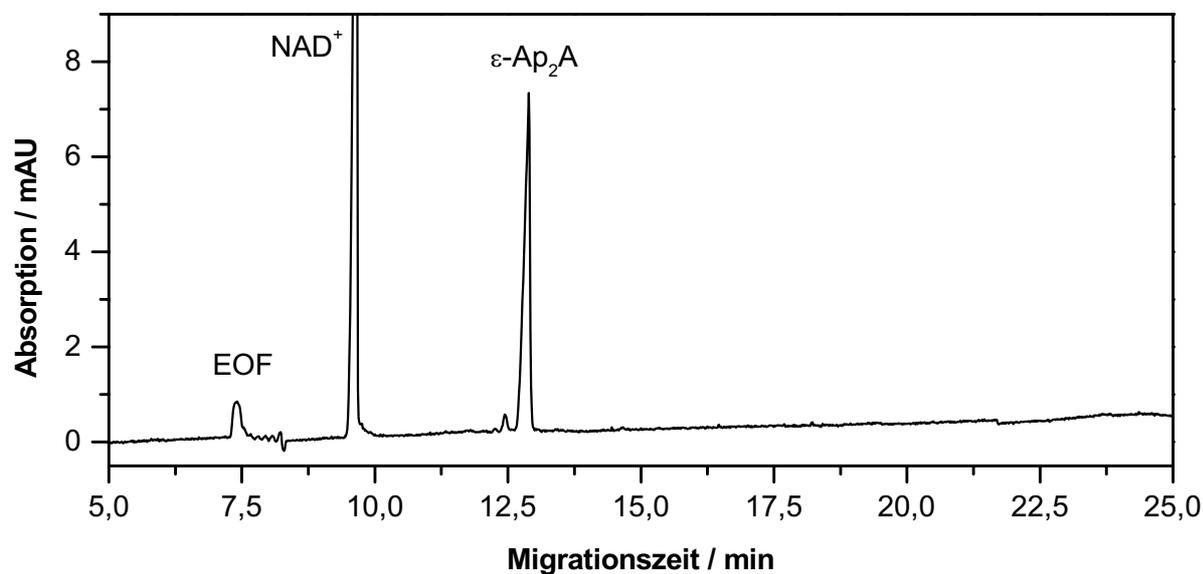


Abb. 4.14 Elektropherogramm des internen Standards  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A. Das ebenfalls sichtbare NAD<sup>+</sup> diente als Standard zur Quantifizierung der Diethenoverbindung.

#### 4.3.2.2 Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Der angestrebte Arbeitsbereich orientierte sich an den bisher mittels HPLC veröffentlichten Daten<sup>12,14</sup> und reichte von der Bestimmungsgrenze bis etwa 8 nmol Dinukleotid pro Vollblutprobe.

Da für solche Bestimmungen eine dinukleotidfreie Leermatrix nicht zur Verfügung stand, erfolgte die Überprüfung der Linearität durch Aufstockung authentischer Plättchenproben mit verschiedenen Mengen an Diadenosinpolyphosphaten. Um für alle Kalibrationsproben eine einheitliche Menge bereits vorhandener Dinukleotide zu gewährleisten, wurde eine größere Menge Vollblut gepoolt und nach der Isolierung der Thrombozyten für jede Kalibrationsprobe ein der Thrombozytenmenge von 20 mL Blut entsprechendes Aliquot entnommen. Insgesamt wurden drei verschiedene Konzentrationsstufen im Verhältnis 16:4:1 sowie die Leerprobe ohne Zusatz von Dinukleotiden bestimmt. Für jede Konzentrationsstufe wurden dabei drei Aliquots separat aufgearbeitet und vermessen. Die Zugabe der Spikelösungen erfolgte unmittelbar nach dem Aliquotieren der Plättchensuspension.

Es standen keine  $Ap_nA$ -Referenzsubstanzen in wägbarer Menge zur Verfügung. Daher wurden die zum Spiken verwendeten Lösungen mit der in Kap. 3.3.3 beschriebenen validierten Methode quantifiziert. In Tab. 4.3 sind die bei den einzelnen Konzentrationsstufen zugesetzten Dinukleotid-Mengen aufgeführt. Dabei und auch im weiteren Verlauf der Validierung sind die zugesetzten Stoffmengen und nicht die resultierenden Konzentrationen angegeben, um Verwirrungen bezüglich der Konzentration im Blut, der Thrombozytensuspension oder der eigentlichen Probenlösung zu vermeiden.

Konzentrationsstufe	Zugespikte Dinukleotidmenge in nmol				
	$Ap_2A$	$Ap_3A$	$Ap_4A$	$Ap_5A$	$Ap_6A$
0	0	0	0	0	0
1	0,48	0,45	0,52	0,45	0,32
2	1,85	1,77	2,04	1,79	1,30
3	7,54	7,18	8,40	7,42	5,37

Tab. 4.3 Zugespikte Mengen an  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  in den Kalibrationsproben

Der interne Standard  $\epsilon$ - $Ap_2A$  wurde ebenfalls mit der Methode aus Kap. 3.3.3 gegen  $NAD^+$  als Referenzstandard eingestellt. Da kein Absorptionskoeffizient für das Diethenoprodukt bekannt ist, wurde seine Konzentration als  $Ap_2A$  berechnet.

Zu jeder Kalibrationsprobe wurden 4,54 nmol  $\epsilon$ - $Ap_2A$  (berechnet als  $Ap_2A$ ) nach der Perchlorsäurefällung, unmittelbar vor der Boronat-Affinitätschromatographie, hinzugefügt.

Nach vollständiger Probenaufarbeitung wurde jede Kalibrationsprobe bei pH 9,80 sowie pH 10,35 vermessen. Wie bereits im Abschnitt Selektivität diskutiert, wurden bei pH 9,80  $Ap_3A$  bis  $Ap_5A$  und bei pH 10,35  $Ap_2A$  und  $Ap_6A$  bestimmt. Für jeden Analyten berechnete man das Verhältnis der korrigierten Peakfläche zur korrigierten Peakfläche des internen Standards. Die Mehrfachbestimmungen wurden im arithmetischen Mittelwert zusammengefasst und auf der Ordinate über der jeweiligen Dinukleotid-Menge (in nmol) aufgetragen. Anschließend wurde für jedes Dinukleotid eine Kalibrationsgerade mittels ungewichteter linearer Regression berechnet. Die resultierenden Werte sind in Tab. 4.4 zusammengefasst. Die Steigung der Regressionsgeraden diente zur Bestimmung der Dinukleotidmenge in den späteren Blutproben; der

Quotient aus  $y$ -Achsenabschnitt und Steigung lieferte die Dinukleotidmenge in der Leerprobe (in nmol).

Wie Tab. 4.4 zeigt, besteht für alle untersuchten Diadenosinpolyphosphate im gewählten Arbeitsbereich Linearität, so dass dieser als bestätigt angesehen werden kann. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten liegen mindestens bei 0,9992. Mit Ausnahme der Leerwerte für  $Ap_2A$  und  $Ap_6A$  liegen die berechneten Residuen allesamt unter 9 % und typischerweise im Bereich von 0–5 %. Die Präzision, ausgedrückt als relative Standardabweichung der  $y$ -Werte für jede Konzentrationsstufe, liegt typischerweise im Bereich von 5–10 %. Alle Werte liegen unter 15 % und entsprechen somit den von der FDA gestellten Anforderungen an bioanalytische Methoden.<sup>63</sup>

Wie bereits diskutiert, können  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$  und  $Ap_5A$  auch bei pH 10,35 selektiv bestimmt werden. Daher wurde für diese Substanzen die bei pH 9,80 in der Leerprobe bestimmte Menge mit dem Ergebnis bei pH 10,35 verglichen. Die Abweichung zwischen den beiden Werten lag für alle drei Analyten unter 5 %. Dieses Resultat ist eine weitere Bestätigung für die Selektivität der Methode.

Basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von zehn wurde die Bestimmungsgrenze (*limit of quantification, LOQ*) auf 200 pmol Dinukleotid pro Plättchenprobe festgesetzt. Bei 100%iger Wiederfindung entspricht dies einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$  in der für die CE-Messung eingesetzten Probenlösung; bei einer typischen Wiederfindung von etwa 40–50 % (s. Kap. 4.3.2.4) beträgt die Dinukleotidkonzentration in der CE-Probe am *LOQ* etwa 4–5  $\mu\text{mol/L}$  und liegt damit im Bereich der bei der Bestimmung aus wässriger Lösung erhaltenen Ergebnisse.

Die Nachweisgrenze (*limit of detection, LOD*) wurde basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei auf 30 % *LOQ*, also 60 pmol Dinukleotid pro Plättchenprobe, festgelegt.

	<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>
	pH 10,35	pH 9,80	pH 9,80	pH 9,80	pH 10,35
<b>Regressionsgerade</b>					
Steigung	1,399*10 <sup>-1</sup>	1,330*10 <sup>-1</sup>	1,204*10 <sup>-1</sup>	1,016*10 <sup>-1</sup>	6,995*10 <sup>-2</sup>
y-Achsenabschnitt	2,466*10 <sup>-2</sup>	2,647*10 <sup>-1</sup>	2,457*10 <sup>-1</sup>	7,880*10 <sup>-2</sup>	2,170*10 <sup>-2</sup>
Korrelationskoeffizient <i>r</i>	0,99956	0,99934	0,99984	0,99980	0,99922
Gehalt Leerprobe [nmol]	0,176	0,199	0,204	0,776	0,310
<b>Residuen (Abweichungen vom berechneten Wert in %)</b>					
Stufe 0	36,7	6,6	3,8	-5,7	-37,1
Stufe 1	8,2	-0,6	-0,3	-0,3	4,4
Stufe 2	-7,5	-4,2	-2,2	4,1	7,3
Stufe 3	0,4	0,4	0,2	-0,3	-0,5
<b>Präzision (relative Standardabweichung in %)</b>					
Stufe 0	0,1	6,8	6,7	6,7	7,3
Stufe 1	7,6	10,0	8,0	7,8	8,7
Stufe 2	6,6	3,9	3,6	5,1	14,6
Stufe 3	3,2	1,9	2,3	3,8	14,5

Tab. 4.4 Ergebnisse der Kalibration für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A

#### 4.3.2.3 Präzision

Aufgrund der zeitaufwändigen Probenvorbereitung und der begrenzten Verfügbarkeit konnte die Bestimmung der Präzision nicht wie in den entsprechenden Richtlinien vorgeschlagen durchgeführt werden (z. B. 4 Konzentrationsstufen zu je 6 Proben an 3 aufeinander folgenden Tagen). Daher wurde auch auf die Unterscheidung zwischen *intraday*- und *interday*-Präzision verzichtet.

Die Präzision der verwendeten Methode wurde zum einen untersucht durch die Dreifachbestimmung jeder Kalibrationsstufe (s. Kap. 4.3.2.2, Tab. 4.4). Die dort erhaltenen Werte lagen – wie bereits diskutiert – alle im Bereich der von der FDA für bioanalytische Methoden geforderten Grenze von 15 %.

Weiter wurde die Präzision untersucht durch die getrennte Aufarbeitung und Vermessung von fünf Aliquots einer aus gepooltem Vollblut erhaltenen Plättchenprobe. Die erhaltenen Werte liegen ebenfalls unter der Grenze von 15 % (s. Tab. 4.5).

	<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>
relSDV ( <i>n</i> = 5)	6,9 %	6,8 %	8,3 %	10,5 %	12,0 %

Tab. 4.5 Präzision der Bestimmung der Ap<sub>n</sub>A aus Thrombozyten

#### 4.3.2.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung der Analyten wurde durch Vergleich der korrigierten Peakflächen vor und nach der Probenaufarbeitung ermittelt. Um mögliche Fehler durch die im Vergleich zur HPLC geringere Injektionspräzision der CE auszuschließen, wurden die entsprechenden Proben nach der Vakuumtrocknung mit einer NAD<sup>+</sup>-haltigen Lösung aufgenommen. Das enthaltene NAD<sup>+</sup> diente dann als zweiter interner Standard für die Korrektur evtl. verschiedener Injektionsmengen. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

<b>ε-Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>
93 ± 6,2 %	69 ± 17,8 %	41 ± 13,6 %	42 ± 7,6 %	42 ± 2,7 %	39 ± 11,1 %

Tab. 4.6 Wiederfindung der Ap<sub>n</sub>A bei der Bestimmung aus Thrombozyten  
(Mittelwert ± SDV, *n* = 9)

Dabei zeigte der interne Standard mit 93 % die höchste Wiederfindung. Die Diadenosinpolyphosphate zeigen eine durchschnittliche Wiederfindung von ca. 42 %, lediglich der Wert für Ap<sub>2</sub>A ist mit 69 % deutlich höher. Die gegenüber der Aufarbeitung wässriger Probenlösungen (vgl. Tab. 4.2) in etwa halbierte Wiederfindung aus den Plättchenproben ist vermutlich auf Matrixeffekte zurückzuführen. Möglicherweise werden die Diadenosinpolyphosphate an Proteine oder Zellbestandteile adsorbiert und bei der Perchlorsäurezugabe im Niederschlag mitgefällt. Dafür spricht auch, dass der interne Standard eine Wiederfindung im Bereich der Ergebnisse aus wässriger Lösung aufweist; er wird erst nach der Perchlorsäurefällung und Abzentrifugation des Niederschlages sowie des gefällten KClO<sub>4</sub> der Probenlösung zugesetzt. In den bisher publi-

zierten Arbeiten zur Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate in Humanthrombozyten wurden ebenfalls absolute Wiederfindungsraten für die  $Ap_nA$  im Bereich von 36 bis 62 % beschrieben.<sup>12,14</sup>

#### 4.3.2.5 Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde im Hinblick auf folgende Parameter untersucht:

1. Abbau der Dinukleosidpolyphosphate in der Plättchensuspension
2. Stabilität der Migrationszeiten in CE
3. Einfluss des pH-Wertes auf die Selektivität

Nach dem Auftauen des eingefrorenen Plättchenpellets und der Suspendierung in Wasser besteht bis zum Perchlorsäurezusatz die Gefahr des enzymatischen oder hydrolytischen Abbaus der Dinukleosidpolyphosphate. Um den Einfluss der Standzeit nach der Suspendierung zu bestimmen, wurden zwei Aliquots der zur Kalibration verwendeten Plättchenprobe erst nach einer Standzeit von 60 Minuten bei 0–1 °C weiter aufgearbeitet. Der Dinukleotidgehalt lag dabei um 15–30 % niedriger als bei sofortiger Perchlorsäurefällung. Da auch bei der gleichzeitigen Aufarbeitung mehrerer Proben maximal zwei Minuten zwischen Resuspendierung und Perchlorsäurefällung vergehen, sollte in diesem Zeitraum kein nennenswerter Abbau der Dinukleotide aufgetreten sein. Darüber hinaus wurden alle Plättchenproben bis zur Perchlorsäurefällung grundsätzlich im Eisbad gehandhabt.

In Abb. 4.15 sind die Migrationszeiten der Analyten in den zur Kalibration der Bestimmung durchgeführten Läufen graphisch dargestellt. Obwohl bei den Verbindungen mit langer Migrationszeit leichte Schwankungen erkennbar sind, können die Migrationszeiten doch insgesamt als stabil angesehen werden. Insbesondere ist kein gerichteter Trend zu längeren oder kürzeren Migrationszeiten und damit kein systematischer Fehler erkennbar.

Die sich aus Abb. 4.15 ergebenden Mittelwerte für die absoluten bzw. relativen Migrationszeiten (bezogen auf den internen Standard) sowie für die effektiven Mobilitäten sind in Tab. 4.7 zusammengestellt. Die Variabilität der absoluten Migrationszeiten (ausgedrückt als relative Standardabweichung) liegt im Bereich von 0,7–1,4 %. Bei Verwendung der relativen Migrationszeit oder der effektiven Mobilität kann die Schwankung noch deutlich reduziert werden. Die relativen Standardabweichungen liegen dann im Bereich von 0,2–0,7 %. Damit sollte eine sichere Peakidentifizierung auch bei den komplexen biologischen Proben möglich sein.

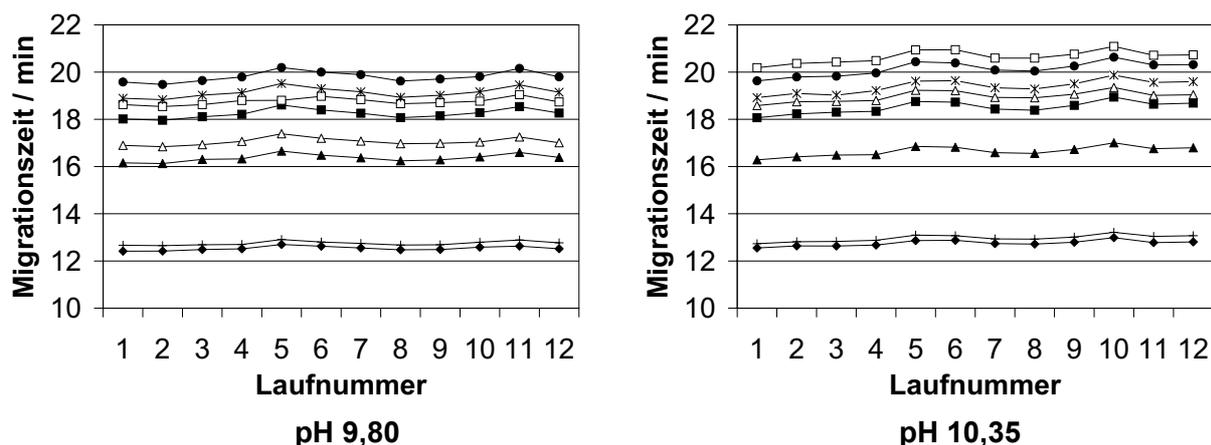


Abb. 4.15 Stabilität der Migrationszeiten in den Läufen für die Kalibration

pH 9,80	Migrationszeit (min)		relative Migrationszeit		$\mu_{\text{eff}}$ (cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
	Mittelwert	relSDV	Mittelwert	relSDV	Mittelwert	relSDV
$\epsilon$ -Ap <sub>2</sub> A	12,53	0,69 %	1,00	0 %	-0,198	0,67 %
Ap <sub>2</sub> A	12,75	0,68 %	1,02	0,21 %	-0,198	0,67 %
Ap <sub>3</sub> A	16,36	0,98 %	1,31	0,33 %	-0,256	0,44 %
Ap <sub>3</sub> G	17,05	0,92 %	1,36	0,33 %	-0,265	0,44 %
Ap <sub>4</sub> A	18,24	1,09 %	1,46	0,44 %	-0,277	0,40 %
Ap <sub>4</sub> G	18,76	0,78 %	1,50	0,47 %	-0,283	0,75 %
Ap <sub>5</sub> A	19,13	1,12 %	1,53	0,47 %	-0,286	0,40 %
Ap <sub>6</sub> A	19,80	1,13 %	1,58	0,50 %	-0,292	0,43 %
<b>pH 10,35</b>						
$\epsilon$ -Ap <sub>2</sub> A	12,75	0,96 %	1,00	0 %	-0,194	0,40 %
Ap <sub>2</sub> A	12,97	1,08 %	1,02	0,21 %	-0,194	0,40 %
Ap <sub>3</sub> A	16,65	1,26 %	1,31	0,37 %	-0,251	0,31 %
Ap <sub>4</sub> A	18,51	1,38 %	1,45	0,48 %	-0,272	0,30 %
Ap <sub>3</sub> G	18,97	1,19 %	1,49	0,27 %	-0,276	0,31 %
Ap <sub>5</sub> A	19,39	1,48 %	1,52	0,58 %	-0,280	0,32 %
Ap <sub>6</sub> A	20,14	1,49 %	1,58	0,57 %	-0,286	0,26 %
Ap <sub>4</sub> G	20,65	1,28 %	1,62	0,35 %	-0,290	0,30 %

Tab. 4.7 Stabilität der absoluten bzw. relativen Migrationszeiten und der effektiven Mobilitäten in den Läufen für die Kalibration

Als kritischer Faktor bei der kapillarelektrophoretischen Trennung erwies sich der pH-Wert des Trennpuffers. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, musste die Abweichung zwischen Puffern verschiedener Ansätze kleiner 0,05 pH-Einheiten sein. Da eine solche Reproduzierbarkeit auch bei Einsatz guter pH-Meter und verlässlicher Kalibrationslösungen nur schwer zu gewährleisten ist, wurde der pH-Wert jeder Puffercharge durch einen Systemeignungstest bei pH 9,80 und pH 10,35 überprüft. Zusammensetzung und Konzentration der Testlösung entsprachen dabei in etwa einer authentischen Thrombozytenprobe aus Vollblut. Als Indikator für die korrekte Einstellung des pH-Wertes diente bei pH 9,80 die Trennung von ADP,  $Ap_4G$  und  $Ap_5A$ , bei pH 10,35 die Trennung von ADP,  $Ap_3G$  und  $Ap_5A$ . Entsprechende Elektropherogramme sind in Abb. 4.16 gezeigt. Entsprach die Trennung nicht den Anforderungen, wurde der Puffer-pH so lange verändert, bis der Systemeignungstest erfüllt war.

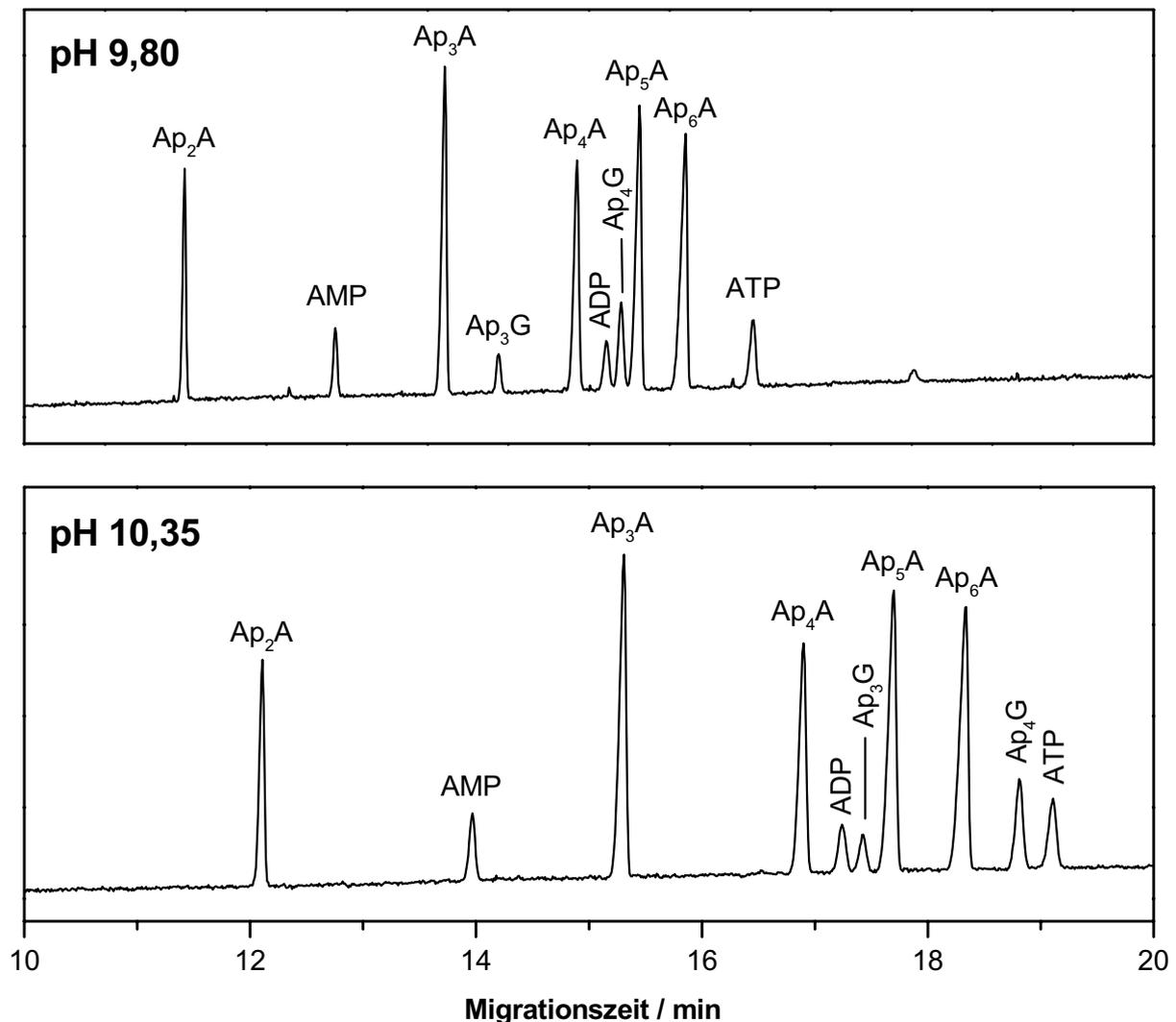


Abb. 4.16 Elektropherogramme bei erfülltem Systemeignungstest

(Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV)

Auf den Einsatz entsprechender Systemeignungstests für die Boronat-Affinitätschromatographie und die Ionenpaar-*Reversed-Phase*-Chromatographie wurde verzichtet. Bei der Affinitätschromatographie wurde die Retentionszeit der Analyten nach Beginn der Elution mit 1 mmol/L-HCl als Maß für den Zustand des Systems herangezogen und bei jeder Probe beobachtet. Eine zuverlässige Funktion der Ionenpaar-Chromatographie wurde angenommen, wenn kein oder nur ein geringer UV-aktiver Durchbruch nach der Totzeit des Systems detektiert wurde.

#### 4.3.2.6 Zusammenfassung

Mit den in den vorangegangenen Unterkapiteln vorgestellten Ergebnissen bezüglich Selektivität, Linearität, Präzision, Wiederfindung und Robustheit wurde die entwickelte Methode zur Bestimmung von Dinukleosidpolyphosphaten in Humanthrombozyten als valide angesehen und für die Untersuchung von Probandenblutproben herangezogen.

Im Vergleich zu den bisher publizierten HPLC-Methoden erwies sich die kapillarelektrophoretische Bestimmung als zumindest gleichwertig. Im Gegensatz zur HPLC, für die bisher nur simultane Bestimmungen von Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A ohne Berücksichtigung eventuell vorhandener Mononukleotide beschrieben worden sind, können in der Kapillarelektrophorese zusätzlich auch Ap<sub>2</sub>A sowie Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>4</sub>G hochselektiv erfasst werden. Mononukleotide stellen bis etwa zu einem äquimolaren Verhältnis, das nach der Boronat-Affinitätschromatographie leicht erreicht wird, kein Problem dar. Bezüglich Linearität, Präzision und Wiederfindung sind die hier vorgestellte CE-Methode und die publizierten HPLC-Methoden<sup>12,14</sup> vergleichbar. Lediglich die Konzentrationsempfindlichkeit der Kapillarelektrophorese ist aufgrund des kurzen optischen Lichtweges etwa um den Faktor 50 geringer als in der Flüssigchromatographie; dieser Nachteil kann jedoch durch das hier mögliche Arbeiten mit kleineren Probenvolumina (20 µL) zumindest teilweise kompensiert werden.

### 4.3.3 Untersuchung von Probandenblutproben

Nach Validierung der Methode wurden Thrombozyten von insgesamt 21 freiwilligen Probanden untersucht. Eine Unterscheidung zwischen Normo- und Hypertonikern erfolgte nicht. Jedem Probanden wurden 20 mL Vollblut entnommen und wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Dabei konnten – wie bereits in Kap. 4.3.2.1 diskutiert – bei pH 9,80 Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A sowie Ap<sub>3</sub>G und bei pH 10,35 Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>6</sub>A und Ap<sub>4</sub>G bestimmt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 4.8 und Abb. 4.18 zusammengefasst. Dabei werden – wie auch bereits bei der Validierung – die absoluten Mengen an Dinukleotiden in der aus 20 mL Vollblut erhaltenen Probe angegeben. Die Quantifizierung von Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>4</sub>G erfolgte mangels Referenzsubstanzen über die für Ap<sub>3</sub>A bzw. Ap<sub>4</sub>A bestimmten Kalibrationsgeraden. Dieses Verfahren erscheint zulässig, da sich die Wiederfindung zwischen den Diadenosinpolyphosphaten und ihren Mono-Guanosin-Analoga nicht signifikant unterscheiden sollte und in der Literatur sehr ähnliche UV-Absorptionskoeffizienten für Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>3</sub>G bzw. Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>4</sub>G beschrieben sind.<sup>19</sup>

In Abb. 4.18 sowie Abb. 4.19 sind die Messwerte in Form eines sog. Box-Plots dargestellt. Im Gegensatz zur bloßen Abbildung von Mittelwert und Standardabweichung (bzw. Standardfehler des Mittelwertes) können dieser Darstellung weitere Erkenntnisse über die Streuung der Messwerte entnommen werden. Um die Interpretation des Box-Plots zu erleichtern, ist diese Art der Darstellung in Abb. 4.17 näher erläutert.

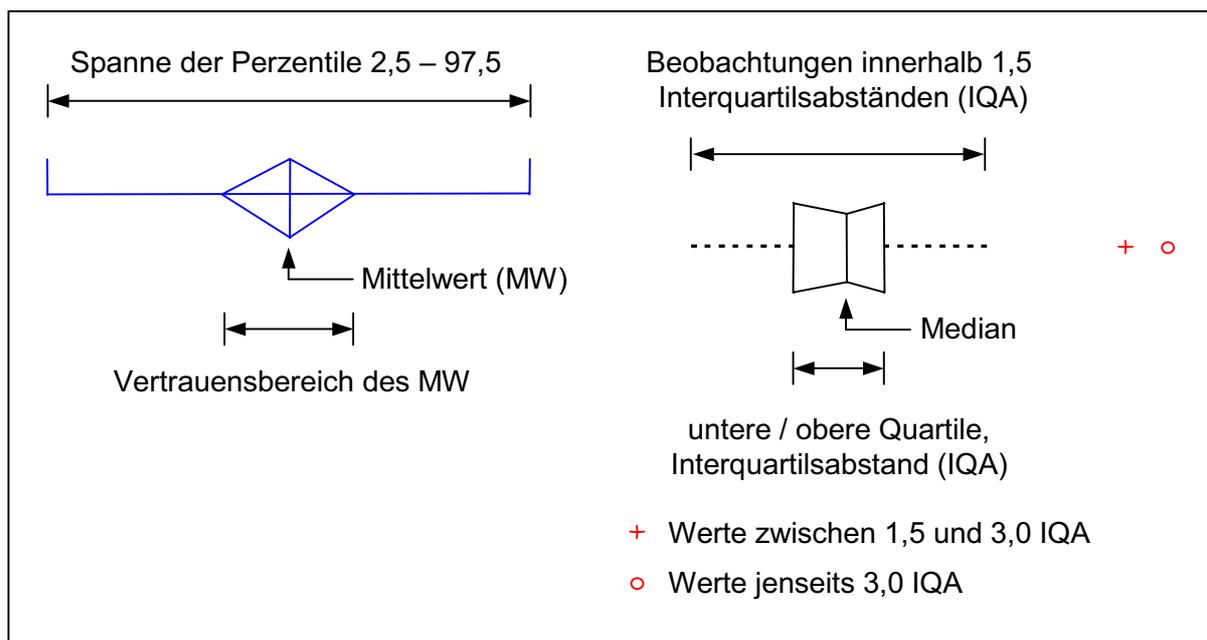


Abb. 4.17 Erläuterung des Box-Plots

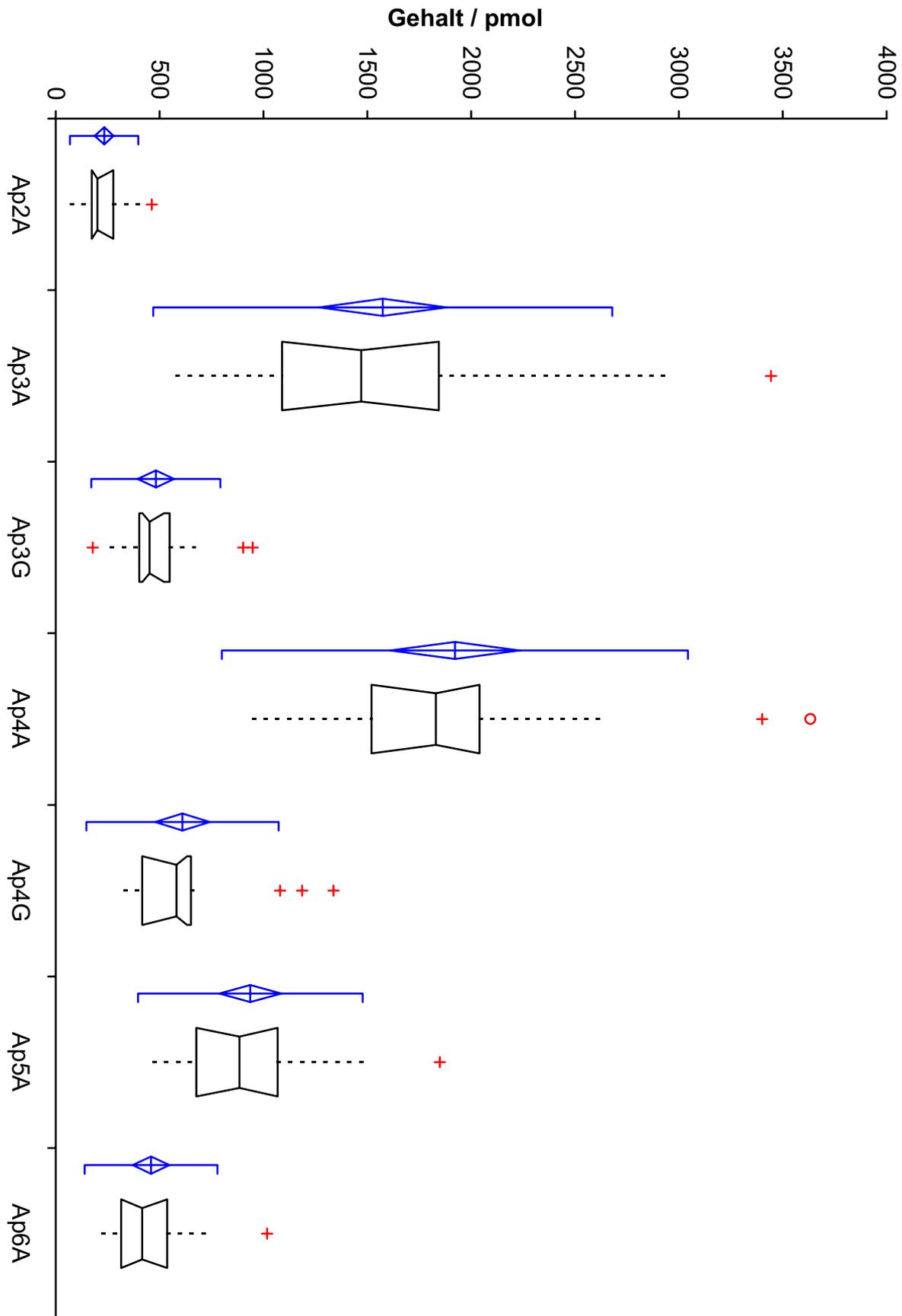


Abb. 4.18 Box-Plot der Untersuchung von Thrombozytenproben von 21 Probanden (Ordinate: absoluter Gehalt einer Thrombozytenprobe aus 20 mL Blut)

	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b> pmol	<b>SDV</b> pmol	<b>SEM</b> pmol	<b>95% CI des MW</b> pmol	<b>Median</b> pmol
<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	21	233	100,2	21,9	187 - 279	201
<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	21	1574	672,0	146,7	1269 - 1880	1470
<b>Ap<sub>3</sub>G</b>	21	482	188,7	42,2	393 - 570	452
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	21	1922	682,0	148,8	1611 - 2232	1830
<b>Ap<sub>4</sub>G</b>	21	610	281,3	62,9	478 - 742	582
<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	21	937	328,6	71,7	787 - 1087	884
<b>Ap<sub>6</sub>A</b>	21	459	194,2	42,4	370 - 547	416

Tab. 4.8 Dinukleotid-Gehalt der untersuchten Thrombozytenproben (angegeben ist der absolute Gehalt der Proben bei Gewinnung der Thrombozyten aus 20 mL Vollblut)

Die breite Streuung der gemessenen Dinukleotidmengen bei 21 Probanden mag auf den ersten Blick irritierend wirken. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die angewandte Bestimmungsmethode recht reproduzierbare Ergebnisse liefert. Daher ist ein Großteil der Variation auf individuelle Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Probanden zurückzuführen. Verglichen mit der Streuung z. B. der Plasma-Katecholaminkonzentration erscheint die Variationsbreite für Dinukleosidpolyphosphate nicht übermäßig. Als biologische Faktoren, die den Dinukleosidpolyphosphat-Gehalt beeinflussen, kommen z. B. hormonale Einflüsse oder unterschiedliche Clearance-Raten, basierend auf der unterschiedlichen Aktivität abbauender Enzyme, in Betracht. Weiter könnten die Thrombozyten auch während der Blutentnahme und Zentrifugation aktiviert worden sein und die Inhalte ihrer Plättchengranula durch Exozytose in das umgebende Medium freigesetzt haben. Da der Dinukleotidgehalt auf das entnommene Blutvolumen bezogen wurde, kann ein Großteil der Abweichung auch durch die natürliche Streuung der Thrombozytenzahl in den Blutproben ( $1,5\text{--}3,8 \cdot 10^5/\mu\text{L}$ ) zurückzuführen sein.<sup>12</sup>

Für die Quantifizierung der Dinukleosidpolyphosphate in klinischen Studien empfiehlt es sich, Parameter wie Serotoningehalt oder  $\beta$ -Thromboglobulin direkt nach dem Auftauen der Plättchen zu bestimmen. Vor allem das thrombozytenspezifische  $\beta$ -Thromboglobulin könnte als Maß für den Funktionszustand der Plättchen dienen: Bei der Sekretion der Granula verändern sich der Gehalt an Dinukleosidpolyphosphaten und  $\beta$ -Thromboglobulin parallel. Daher können Verluste an Dinukleosidpolyphosphaten aufgrund von Plättchenaktivierung während der Gewinnung und Isolierung der Thrombo-

zyten aus der  $\beta$ -Thromboglobulin-Konzentration abgeschätzt werden. Bezieht man die gefundene Dinukleotidmenge anschließend auf den  $\beta$ -Thromboglobulingehalt, sollte die durch verschiedene Thrombozytenkonzentrationen und unterschiedliche Verluste bei der Aufarbeitung hervorgerufene Variabilität kompensiert werden. Eine Bestimmung des  $\beta$ -Thromboglobulins kann allerdings nur über einen Radioimmunoassay (RIA) oder einen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) erfolgen. Beide Verfahren standen hier jedoch nicht zur Verfügung und hätten den Rahmen dieser analytischen Arbeit überschritten, so dass der Dinukleosidpolyphosphat-Gehalt wie bereits diskutiert auf die Vollblutmenge bezogen wurde.

Tab. 4.9 zeigt einen Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit publizierten Daten aus flüssigchromatographischen Untersuchungen. Vor allem die Resultate von JANKOWSKI und Mitarbeitern korrelieren sehr gut mit den eigenen Untersuchungen. Die etwas stärkeren Abweichungen zur Arbeit von HOLLAH und Mitarbeitern liegt wahrscheinlich darin begründet, dass von diesen Autoren die gefundenen Dinukleosidpolyphosphate auf den Gehalt an  $\beta$ -Thromboglobulin bezogen wurden. Damit ist der Verlust während der Gewinnung und Isolierung der Thrombozyten bereits eingerechnet und der resultierende Dinukleotid-Gehalt pro Plättchenprobe entsprechend höher. Bezieht man jedoch die Komplexität der Matrix und der Probenaufarbeitung sowie die natürliche Schwankungsbreite in den Vergleich mit ein, so kann festgestellt werden, dass alle drei Methoden ein vergleichbares Ergebnis liefern und somit als valide angesehen werden können. Ein Vergleich der Ergebnisse für  $Ap_2A$ ,  $Ap_3G$  und  $Ap_4G$  kann nicht durchgeführt werden, da für diese Verbindungen mit der Kapillarelektrophorese erstmals quantitative Werte gewonnen wurden.

	<b>eigenes Ergebnis</b>	<b>Jankowski et al.<sup>12</sup></b>	<b>Hollah et al.<sup>14</sup></b>
	pmol	pmol	pmol
<b><math>Ap_3A</math></b>	1570	3850	5550
<b><math>Ap_4A</math></b>	1920	4480	10900
<b><math>Ap_5A</math></b>	940	2000	3440
<b><math>Ap_6A</math></b>	460	640	560

Tab. 4.9 Dinukleotidgehalt in humanen Thrombozyten  
(angegeben ist jeweils die Menge Dinukleotid in Thrombozyten aus 20 mL Blut)

#### 4.3.4 Vergleich von Normo- und Hypertonikerproben

Aufgrund des pharmakologischen Profils der Dinukleosidpolyphosphate wird eine Beteiligung dieser Substanzen an pathophysiologischen Prozessen wie der essentiellen Hypertonie diskutiert.<sup>11,13</sup> Auch wurden bereits von HOLLAH signifikant erhöhte Mengen von Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A in Thrombozyten von Hypertonikern im Vergleich zu normotonen Probanden gefunden.<sup>14</sup> Signifikante Veränderungen der anderen untersuchten Verbindungen, Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A, konnten nicht festgestellt werden.

Auf diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit zumindest ein kurzer Vergleich des Dinukleosidpolyphosphat-Gehaltes in Thrombozyten von Normo- und Hypertonikern durchgeführt werden. Dafür standen Thrombozyten aus jeweils 100 mL Vollblut eines Hypertonikers und eines normotensiven Probanden zur Verfügung. Nach Auftauen des Plättchenpellets und Resuspendierung wurden die beiden Plättchenproben in jeweils 5 Aliquots, entsprechend Thrombozyten aus 20 mL Blut, aufgeteilt. Jedes dieser Aliquots wurde separat aufgearbeitet und vermessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.10 sowie in Abb. 4.19 dargestellt.

	<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>G</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>G</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>
	pmol						
normo- tensiv	234 ± 7,3	1857 ± 56,6	479 ± 13,2	1904 ± 70,6	491 ± 27,2	676 ± 31,9	(178 ± 15,0)
hyper- tensiv	219 ± 31,4	1420 ± 86,8	374 ± 25,5	1576 ± 119,2	390 ± 29,9	626 ± 64,6	234 ± 23,3
<i>F</i> -test (99 %)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>t</i> -test (99 %)	<i>eq.</i>	<i>n. eq.</i>	<i>n. eq.</i>	<i>eq.</i>	<i>eq.</i>	<i>eq.</i>	<i>eq.</i>

Tab. 4.10 Dinukleotid-Gehalt der Thrombozytenproben von Normo- und Hypertonikern (angegeben ist der absolute Gehalt eines Thrombozytenaliquots entsprechend 20 mL Vollblut in der Form MW ± SEM)

Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch einen *F*-Test auf Gleichheit der Varianzen untersucht. Auf einem Signifikanzniveau von  $P = 99\%$  ergab sich für keine der betrachteten Verbindungen ein signifikanter Unterschied zwischen Normo- und Hypertonikerproben. Damit konnte die durch die Aufarbeitung verursachte Streuung der beiden Serien als vergleichbar angesehen werden. Durch die Aliquotierung der aus einer größeren Blutmenge gewonnenen Thrombozyten sollte der Dinukleotidgehalt jeder Probe annähernd gleich gewesen sein.

Ein anschließender zweiseitiger *t*-Test, ebenfalls auf einem Signifikanzniveau von  $P = 99\%$ , ergab einen signifikant niedrigeren Gehalt an  $Ap_3A$  und  $Ap_3G$  in den Thrombozytenproben des Hypertonikers. Für die anderen Dinukleotide konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Durch die hohe natürliche Schwankungsbreite des Dinukleotidgehaltes und die kleine Probandenzahl kann diesen Ergebnissen noch keine pharmakologische Relevanz beigemessen werden. Möglicherweise geben sie jedoch einen Hinweis darauf, in größeren Studien das Augenmerk nicht nur auf die am stärksten vasoaktiven Substanzen  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  zu legen, sondern auch die anderen Dinukleosidpolyphosphate nicht aus den Augen zu verlieren.

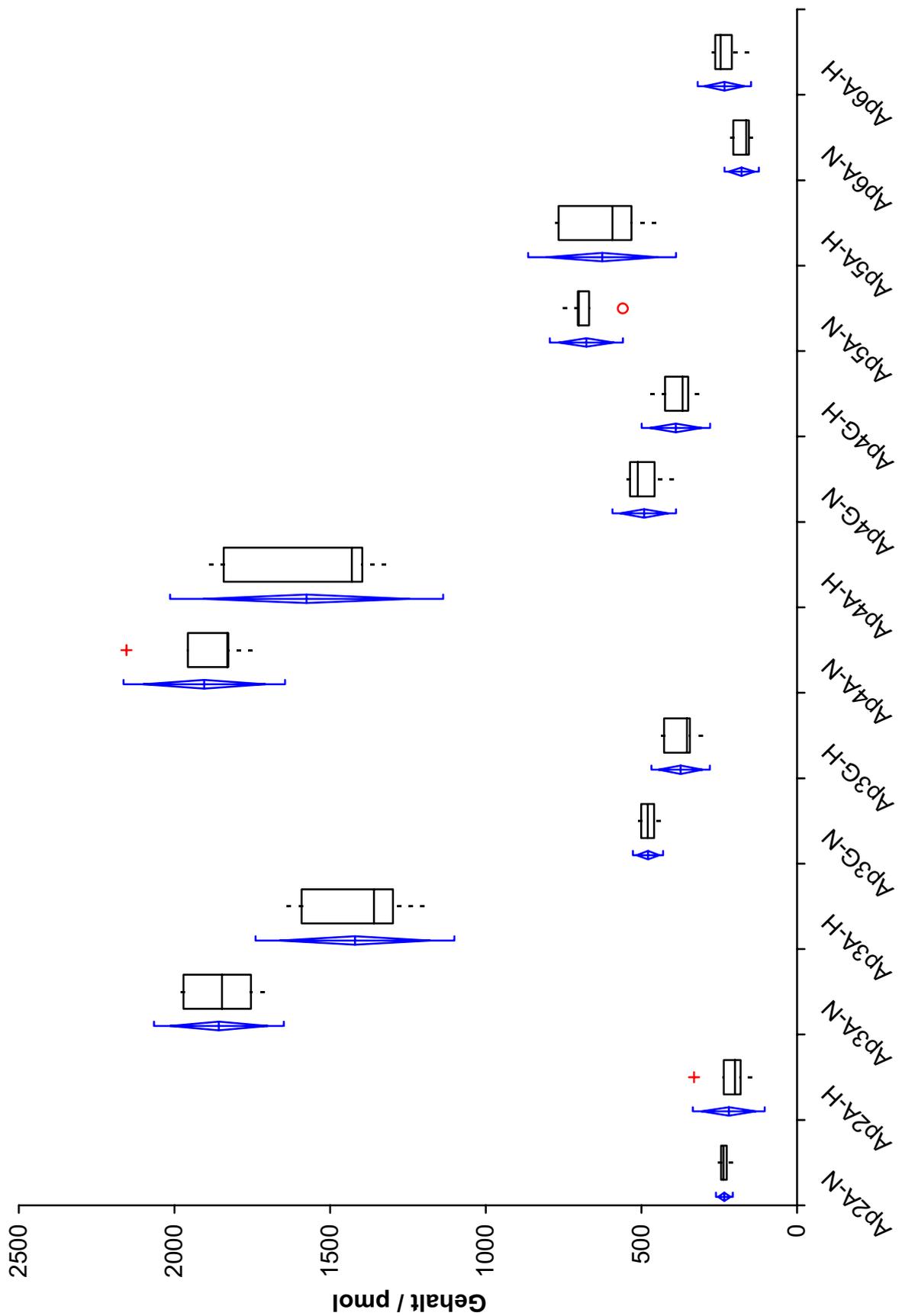


Abb. 4.19 Box-Plot der Untersuchung von Normotonikern (N) bzw. Hypertonikern (H)  
(Ordinate: absoluter Gehalt einer Thrombozytenprobe aus 20 mL Blut)



## 5 Anhang: Versuche zur CE/MS-Kopplung

### 5.1 Einführung

Die Identifizierung von Analyten aufgrund ihrer Molekülmasse bietet vor allem bei der Untersuchung von komplexen Matrices und/oder Substanzgemischen entscheidende Vorteile gegenüber Migrationszeitvergleich oder UV-Spektrum. Auch die Aufnahme eines MALDI-TOF-Massenspektrums der Probenlösung – wie bei der Untersuchung von Thrombozytenproben durchgeführt – kann zwar Auskunft über die in der Probe vorhandenen Analyten geben, nicht aber zur Identifizierung eines bestimmten Peaks im Elektropherogramm herangezogen werden. Dazu wäre die – im Falle der CE so gut wie nicht durchführbare – Fraktionierung der Probe und massenspektrometrische Untersuchung der einzelnen Fraktionen erforderlich. Daher sollte untersucht werden, inwieweit eine *online*-Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie möglich und vorteilhaft ist. Während die LC/MS-Kopplung als ausgereifte Methode schon seit Jahren auch im Routinebetrieb eingesetzt wird, ist der Bereich der CE/MS-Kopplung noch in der Entwicklung.

Wie bei der LC/MS-Kopplung wird auch bei der Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie überwiegend die Elektrospray-Ionisierung (ESI) eingesetzt. Dabei wird der Eluent bzw. Laufpuffer zur Ionisierung der Analyten durch eine auf hohem Potenzial liegende Metallkapillare geleitet. Die Oberfläche der Flüssigkeit wird dadurch aufgeladen, und es bildet sich ein feiner Nebel aus hochgeladenen Tröpfchen. Diese Tröpfchen werden im elektrischen Feld von der Gegenelektrode, die eine kleine Öffnung zum Massenspektrometer besitzt, angezogen. Währenddessen verdampft das Lösungsmittel aus den geladenen Tröpfchen; ihr Durchmesser nimmt ab. Schließlich übersteigen die Abstoßungskräfte der Ionen die Oberflächenspannung, die Tröpfchen werden instabil und zerreißen in zahlreiche kleinere Tröpfchen. Dieser Zyklus wiederholt sich mehrmals, bis aus den extrem kleinen Tröpfchen einzelne Ionen desorbiert werden.

Elektrospray ist ein sogenanntes „weiches“ Ionisierungsverfahren. Dabei entstehen fast ausschließlich Quasi-Molekülonen, also protonierte bzw. deprotonierte Moleküle. Neben den Quasi-Molekülonen treten kaum Fragmentierungsprodukte auf, so dass im Gegensatz zu einem durch Elektronenstoß- oder *electron impact* (EI)-Ionisation erhaltenen Massenspektrum nur wenige Strukturinformationen über die Analyten gewonnen werden können. Dieser Nachteil kann jedoch durch die Verwendung sog. *Iontrap-*

Massenspektrometer, die eine stufenweise Fragmentierung der Analyten in der Ionenfalle ermöglichen, ausgeglichen werden. Die Verwendung eines *Iontrap*-MS bietet außerdem den Vorteil einer erhöhten Empfindlichkeit, da die Analytionen über einen bestimmten Zeitraum in der Ionenfalle gesammelt werden können. Aufgrund der geringen Injektionsvolumina ist dies insbesondere in der CE/MS-Kopplung von Bedeutung. Dennoch ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei der CE/MS-Kopplung in der Regel deutlich schlechter als bei der LC/MS-Kopplung.

Im Gegensatz zur LC/MS-Kopplung sind die Flussraten bei der CE/MS-Kopplung für ein stabiles Elektrospray zu gering. Außerdem muss ein elektrischer Kontakt zwischen der CE-Kapillare und der Metallkapillare des ESI-Interface hergestellt werden, damit die für Elektrophorese und Elektrospray benötigten Spannungen aufgebaut werden können. Bei der CE/MS-Kopplung wird das Outlet-Ende der CE-Kapillare über das Massenspektrometer geerdet, das MS dient also gewissermaßen als „Gegenelektrode“. Bei den kommerziell erhältlichen CE/MS-Interfaces werden diese Probleme durch den Einsatz eines sog. *sheath-flow interface* gelöst. Dabei wird die CE-Kapillare durch eine Edelstahlkapillare in das ESI-Interface eingeführt. Zwischen diesen beiden Kapillaren wird die sog. *sheath-liquid* mit einer Flussrate von wenigen  $\mu\text{L}/\text{min}$  zum Ende der CE-Kapillare gepumpt. Hier vermischen sich der aus der CE-Kapillare austretende Trennpuffer und die zugeführte *sheath-liquid* und schließen den elektrischen Kontakt. Außerdem wird durch den *sheath-flow* die Vernebelung der nur geringen aus der Kapillare austretenden Flüssigkeitsvolumina verbessert. Die Zugabe der *sheath-Flüssigkeit* führt einerseits zu einem Verdünnungseffekt, der eine Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit zur Folge hat. Andererseits kann aber als *sheath-liquid* eine Flüssigkeit gewählt werden, die im Gegensatz zum Trennpuffer optimale Elektrospray-Eigenschaften besitzt. CE- und ESI-Kapillare werden von einer weiteren Kapillare umgeben, die Stickstoff als *sheath-gas* an das Kapillarende liefert. Durch diese Vernebelung wird die Bildung des Elektrospray weiter unterstützt.

Zur Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie ist die Verwendung leicht flüchtiger Puffer notwendig, da sich sonst die Puffersalze auf den Oberflächen im Massenspektrometer ablagern. In der Folge kann es zu einer Verringerung der Nachweisempfindlichkeit oder gar einer Verstopfung der Transferkapillare kommen.

## 5.2 Ergebnisse

Das bereits zur Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in wässrigen Lösungen und Thrombozyten eingesetzte Trennsystem ist aufgrund der Flüchtigkeit des Ammoniumcarbonatpuffers ohne weitere Veränderungen zur Kopplung mit einem Massenspektrometer geeignet. Da bekannt ist, dass der Zusatz eines organischen Modifiers zum Laufpuffer das Elektrospray-Verhalten durch Verringerung der Oberflächenspannung verbessern kann,<sup>67</sup> wurde versucht, dem Trennpuffer Methanol zuzusetzen. Leider zeigte sich im angestrebten Konzentrationsbereich von 5–15 Vol.-% Methanol eine deutliche Verschlechterung der Trennung vor allem im Bereich von Ap<sub>4</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A, so dass auf den Zusatz eines organischen Lösungsmittels verzichtet wurde. Somit kam als Laufpuffer ein Ammoniumcarbonatpuffer pH 9,5 der Konzentration 50 mmol/L zum Einsatz; als *sheath-liquid* wurde eine Mischung aus Methanol, Wasser und konz. Ammoniak im Verhältnis 50+49+1 verwendet.

Aus apparativen Gründen musste die Gesamtlänge der Kapillare von bisher 67 cm auf 78 cm verlängert werden. Um Störungen der empfindlichen Elektronik des Massenspektrometers zu vermeiden, darf der Stromfluss in der Kapillare außerdem 50  $\mu$ A nicht überschreiten. Daher wurde die Trennungsspannung trotz der längeren Kapillare bei 20 kV belassen und die elektrische Feldstärke und damit die Stromstärke reduziert. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt.

Um das Ionisierungsverhalten der Diadenosinpolyphosphate zu untersuchen, wurden zuerst die Verbindungen Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A einzeln in die Kapillarelektrophorese injiziert. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit des Massenspektrometers wurden dazu Probenlösungen mit einer Konzentration von ca. 2 mmol/L verwendet. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abb. 5.1 A und Abb. 5.1 B dargestellt. Mit Ausnahme von Ap<sub>2</sub>A stellte bei allen Verbindungen das Teilchen  $[M-2H]^{2-}$  den Basispeak dar, für Ap<sub>6</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A konnte das Quasi-Molekülion  $[M-H]^-$  sogar überhaupt nicht mehr detektiert werden. Signale weiter noch deprotonierter Moleküle wie  $[M-3H]^{3-}$  oder auch Fragmentionen wurden nicht beobachtet. Das im Massenspektrum von Ap<sub>8</sub>A sichtbare starke zweite Signal bei  $m/z$  624,7 konnte nicht näher identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Adduktbildung, allerdings kann es sich aufgrund der Massendifferenz nicht um ein Acetat- oder Carbonataddukt handeln.

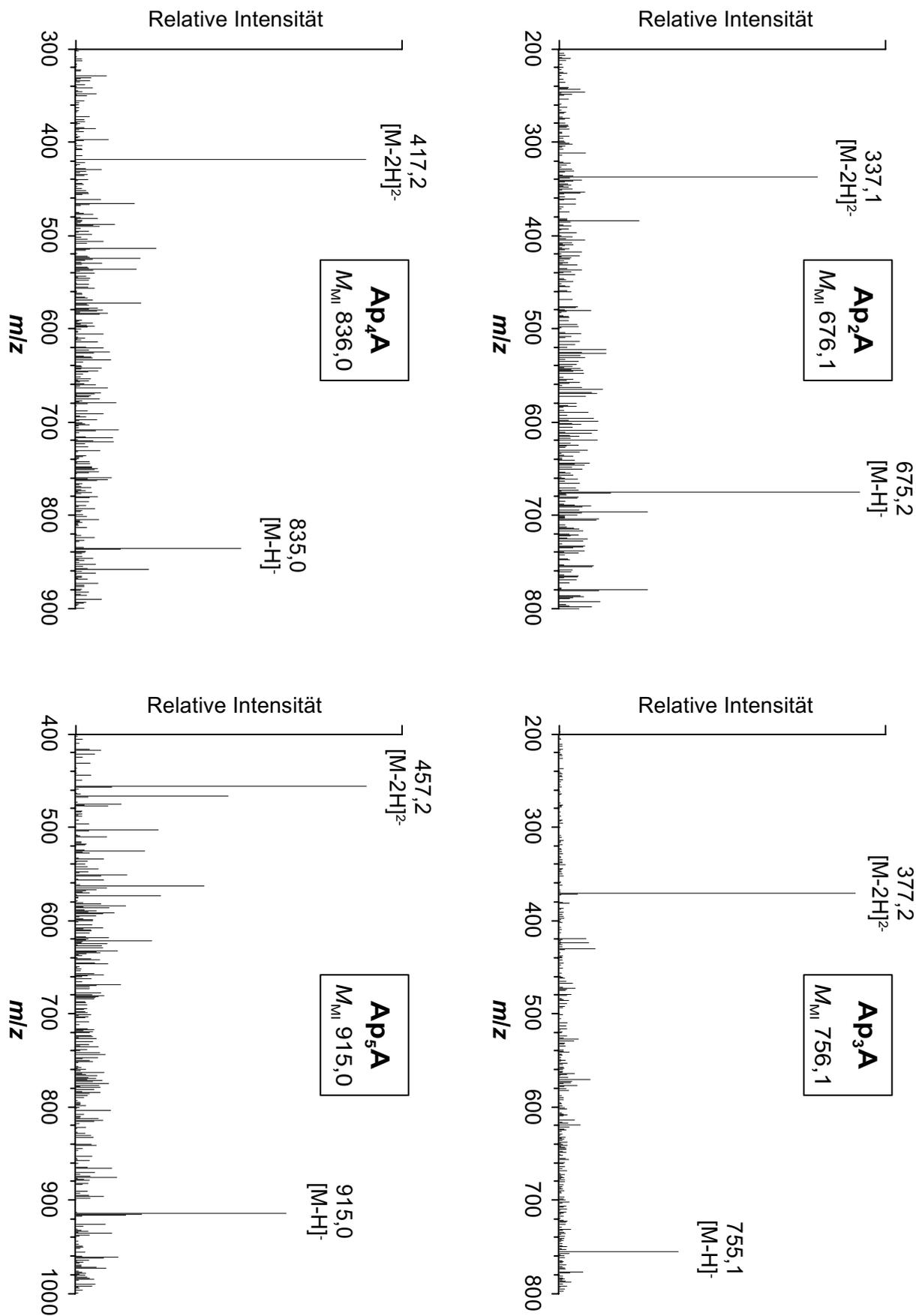


Abb. 5.1 A CE/ESI-MS-Spektren von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>5</sub>A  
(CE- und MS-Bedingungen siehe Kap. 5 des experimentellen Teils)

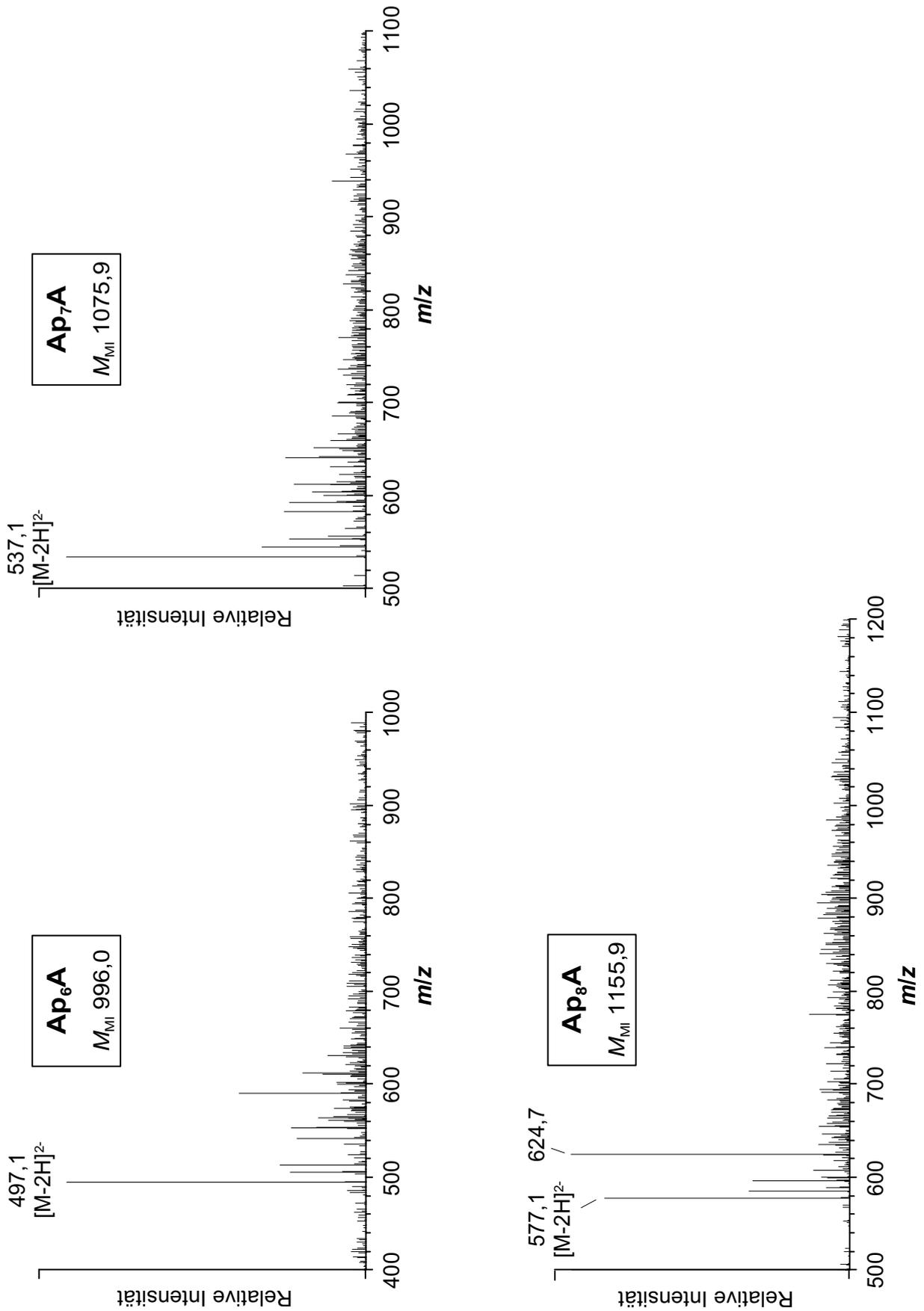


Abb. 5.1 B CE/ESI-MS-Spektren von Ap<sub>6</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A  
(CE- und MS-Bedingungen siehe Kap. 5 des experimentellen Teils)

In einem zweiten Schritt wurde eine Mischung verschiedener Diadenosinpolyphosphate untersucht. Die Konzentration jedes einzelnen Dinukleotids betrug wieder etwa 2 mmol/L ( $\text{Ap}_7\text{A}$  ca. 400  $\mu\text{mol/L}$ ). Da für  $\text{Ap}_6\text{A}$  und  $\text{Ap}_8\text{A}$  keine ausreichend konzentrierten Stammlösungen zur Verfügung standen, konnte nur ein Gemisch aus  $\text{Ap}_2\text{A}$ ,  $\text{Ap}_3\text{A}$ ,  $\text{Ap}_4\text{A}$ ,  $\text{Ap}_5\text{A}$  und  $\text{Ap}_7\text{A}$  untersucht werden.

Abb. 5.2 zeigt das resultierende UV-Signal und den Totalionenstrom (*total ion current*, TIC). Während die Peakhöhe im UV mit etwa 70 mAU der Substanzkonzentration entsprechend groß ausfällt, beträgt das Signal-Rausch-Verhältnis im TIC nur etwa 4–5. An den im TIC mit  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_5\text{A}$  bezeichneten Positionen konnten dabei noch zur Substanzidentifizierung ausreichende Massenspektren erhalten werden; für das geringer konzentrierte  $\text{Ap}_7\text{A}$  war das jedoch nicht mehr möglich. Damit wird deutlich, dass aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit eine CE/MS-Untersuchung von aus Thrombozyten gewonnenen Proben mit einem Konzentrationsbereich von 5–100  $\mu\text{mol/L}$  nicht möglich ist. Wie bereits in Kap. 3.5 diskutiert, gelang es auch nicht, die in die Kapillare injizierte Substanzmenge durch Stacking-Techniken zu erhöhen, ohne die kapillarelektrophoretische Trennung deutlich zu verschlechtern. Obwohl man bei einer massenspektrometrischen Untersuchung im Gegensatz zur UV-Detektion prinzipiell nicht auf eine vollständige Trennung der Analyten angewiesen ist, so lange die Massen der Teilchen verschieden sind, erscheint dies doch hier wenig sinnvoll, da das Ziel der CE/MS-Kopplung die Identifizierung der Signale bei UV-Detektion sein sollte und dazu eine durch Stacking-Techniken deutlich verschlechterte Trennung nur wenig hilfreich ist.

Möglicherweise ergibt sich hier in naher Zukunft eine deutliche Verbesserung durch die Entwicklung eines sog. *sheathless interface*. Dabei wird versucht, die Konstruktion des ESI-Interface so abzuändern, dass auch bei den geringen Flussraten der Kapillarelektrophorese zur Erzeugung eines stabilen Elektrospray keine *sheath-liquid* mehr erforderlich ist. In der Literatur sind bereits die Möglichkeit eines solchen Interface sowie dessen erfolgreicher Einsatz beschrieben worden,<sup>68,69</sup> allerdings sind diese Geräte noch nicht kommerziell erhältlich. Nach Verfügbarkeit könnte sich aber zusammen mit dem Einsatz hochempfindlicher Massenspektrometer die Nachweisgrenze derart absenken lassen, dass eine direkte Untersuchung von niedrig konzentrierten Proben wie den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Thrombozytenextrakten mittels CE/MS möglich sein sollte.

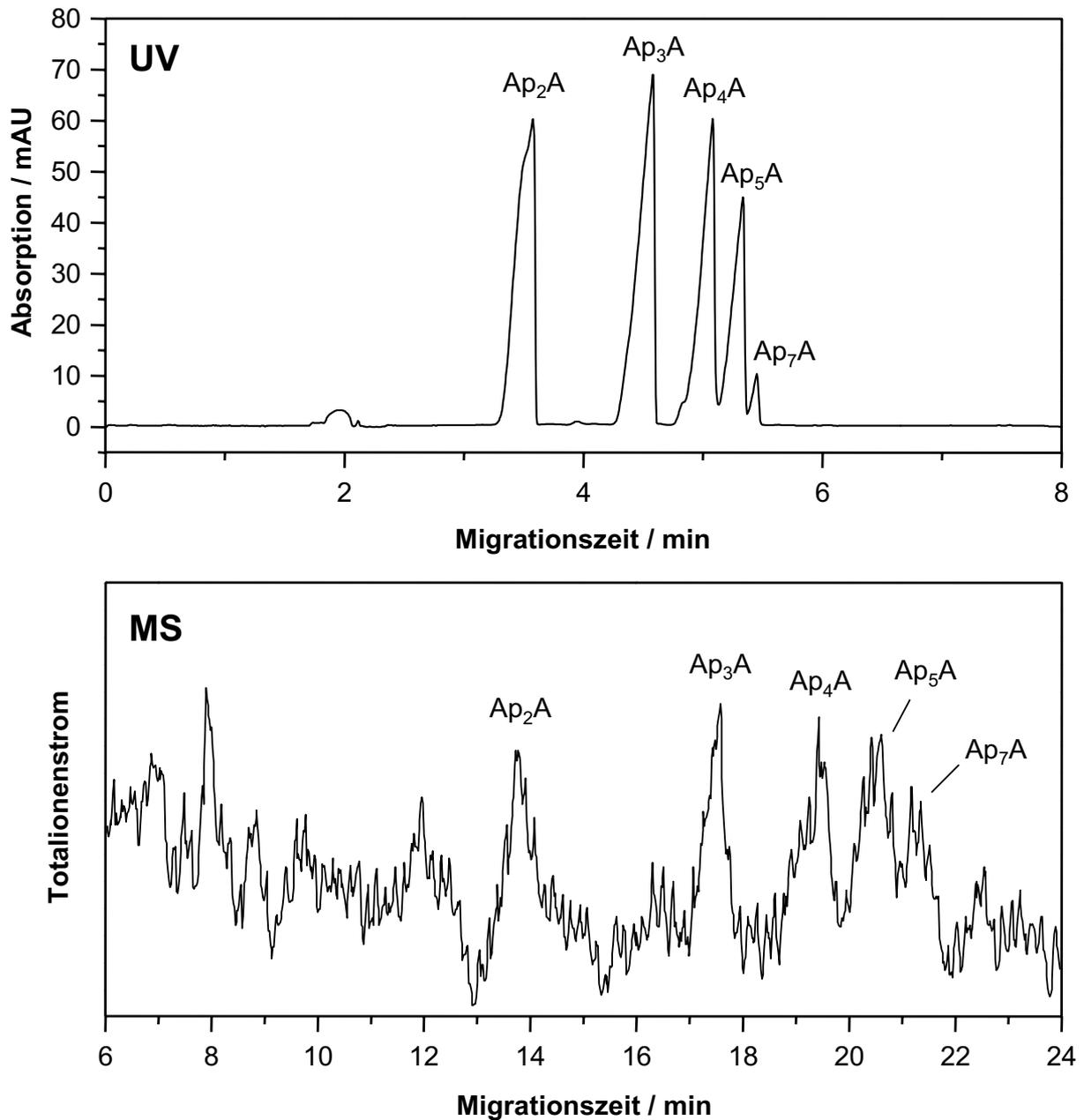


Abb. 5.2 UV-Signal und Totalionenstrom bei der CE/MS-Untersuchung einer Mischung verschiedener Diadenosinpolyphosphate  
Konzentration der Dinukleotide ca. 2 mmol/L ( $Ap_7A$  ca. 400  $\mu\text{mol/L}$ )  
(CE- und MS-Bedingungen siehe Kap. 5 des experimentellen Teils)



## 6 Anhang: Versuche zur Fluoreszenzderivatisierung

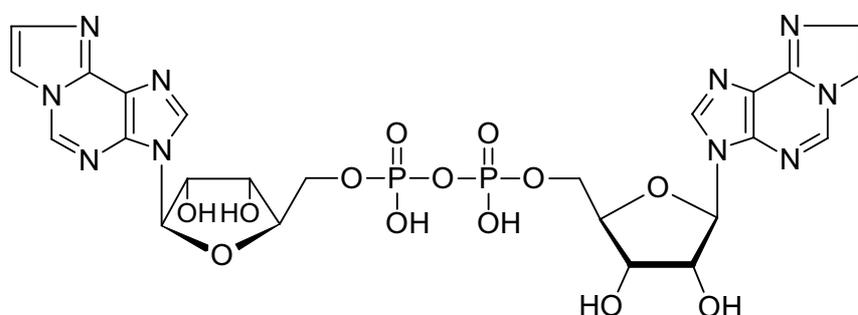
### 6.1 Fluoreszierende Derivate

Eine Möglichkeit zur Verbesserung von Selektivität und Nachweisempfindlichkeit in der HPLC oder in der Kapillarelektrophorese besteht im Einsatz der Fluoreszenzdetektion. Bei dieser Technik wird nicht die von den Analyten absorbierte, sondern die von den Molekülen nach Anregung emittierte Lichtintensität gemessen.

Obwohl die Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate mittels Fluoreszenzdetektion nicht primäres Ziel dieser Arbeit war, sollte dennoch zumindest exemplarisch untersucht werden, ob eine solche Detektionsmethode Vorteile für die Bestimmung dieser Substanzklasse bietet.

Diadenosinpolyphosphate zeigen im Anregungsbereich kommerzieller Fluoreszenzdetektoren keine Eigenfluoreszenz. Nur unter Verwendung spezieller, hier nicht verfügbarer, im tiefen UV emittierender Argon-Ionen- oder Krypton-Fluorid-Laser war MILOFSKY und YEUNG die Bestimmung von Adeninnukleotiden durch Laser-induzierte native Fluoreszenz-Detektion gelungen.<sup>70</sup> Die Verbindungen müssen daher in ein geeignetes fluoreszierendes Derivat überführt werden. Dabei wird für adeninhaltige Mono- und Dinukleotide in der Regel die Umsetzung mit Chloracetaldehyd zu den entsprechenden Mono- bzw. Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Derivaten herangezogen.<sup>16,71,72</sup> Diese Reaktion entspricht der bereits in Kap. 4.3.1 beschriebenen Darstellung des internen Standards  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A.

Für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurde als Modells substanz ebenfalls  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A verwendet (Abb. 6.1).



**Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Ap<sub>2</sub>A ( $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A)**

Abb. 6.1 Struktur von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A

## 6.2 Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion

Für die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion wurde ein HeCd-Laser mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$  eingesetzt. In Abb. 6.2 A ist das UV-Spektrum von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A in dem für die Kapillarelektrophorese eingesetzten Ammoniumcarbonatpuffer pH 9,9 wiedergegeben. Das Absorptionsmaximum liegt bei etwa 265 nm; die Absorption bei der Anregungswellenlänge des Lasers von 325 nm ist dagegen deutlich geringer. Dennoch ist es möglich, die Diethenoverbindung bei dieser Wellenlänge zur Fluoreszenz anzuregen. Das Emissionsmaximum im Elektrophoresepuffer liegt bei etwa 410 nm (s. Abb. 6.2 B).

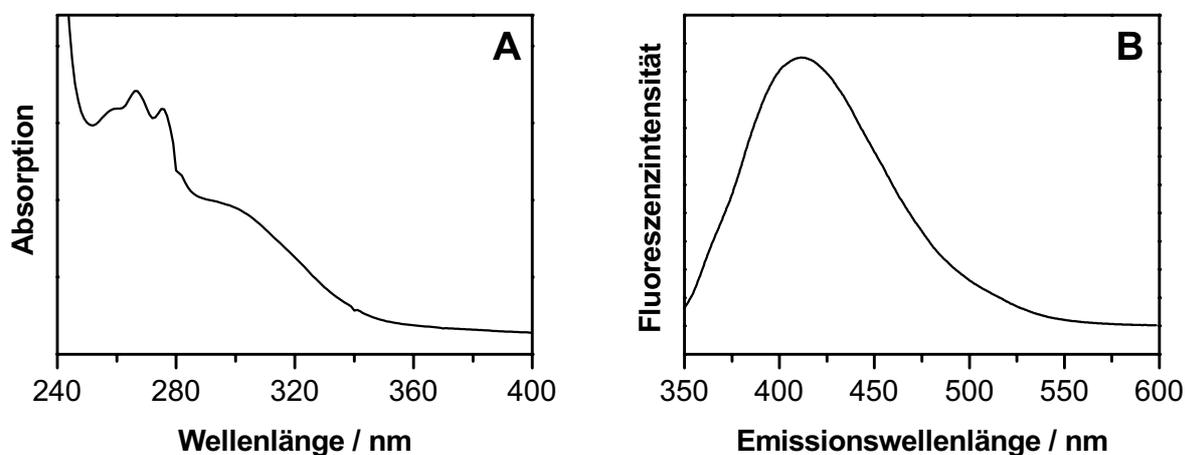


Abb. 6.2 UV- und Fluoreszenzspektren von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A im Ammoniumcarbonatpuffer pH 9,9  
 A: UV-Absorption;  $c = 25 \mu\text{mol/L}$   
 B: Emissionsspektrum für  $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ ,  $c = 2,5 \mu\text{mol/L}$

Es war nicht möglich, durch die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion einen Empfindlichkeitsvorteil in der Kapillarelektrophorese zu erzielen. In Abb. 6.3 ist das Elektropherogramm einer  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A-Lösung mit einer Konzentration von etwa  $230 \mu\text{mol/L}$  gezeigt. Die Konzentration der Ethenoverbindung wurde dabei – wie bereits in Kap. 4.3.1 beschrieben – als Ap<sub>2</sub>A berechnet. Da die UV-Absorption von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A deutlich geringer als bei der underivatisierten Verbindung ist, dürfte die tatsächliche Konzentration noch deutlich höher liegen. Der verwendete Emissionsfilter besaß dabei eine maximale Durchlässigkeit bei  $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$  mit einer Halbwertsbreite von 10 nm, war also dem Emissionmaximum von  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A gut angepasst. Während die Bestimmung einer so hochkonzentrierten Lösung mittels UV-Detektion kein Problem darstellt (Bestimmungsgrenze in wässriger Lösung etwa  $3 \mu\text{mol/L}$ ), liegt das Signal-

Rausch-Verhältnis in der LIF-Detektion bereits schon bei etwa 20. Die Bestimmungsgrenze kann damit auf etwa 100  $\mu\text{mol/L}$  abgeschätzt werden.

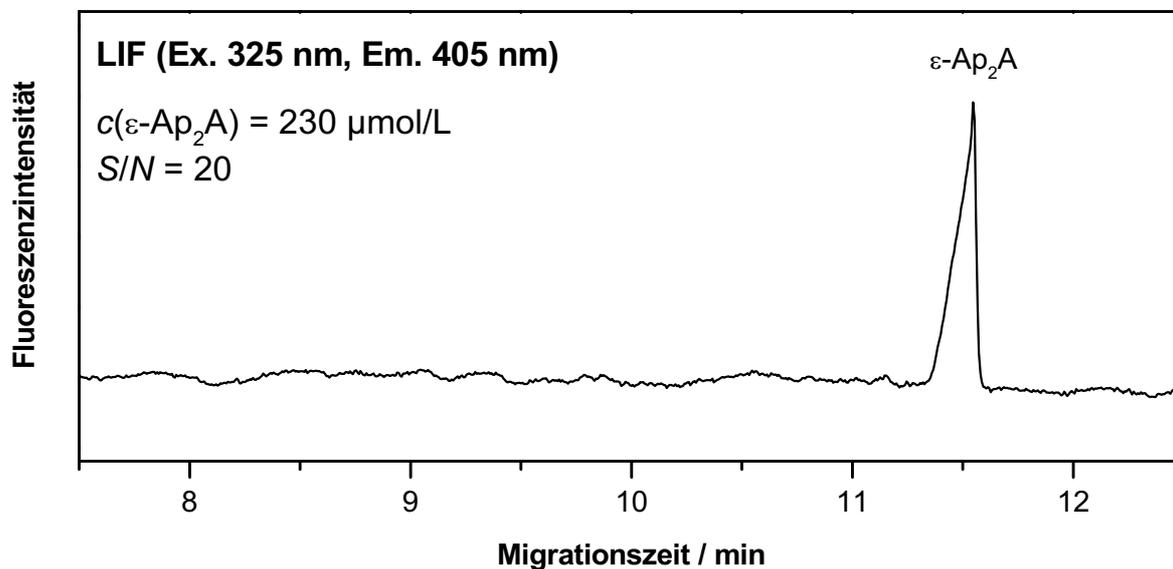


Abb. 6.3 Elektropherogramm einer  $\epsilon\text{-Ap}_2\text{A}$ -Probe mit LIF-Detektion  
(Ammoniumcarbonatpuffer 50 mmol/L pH 9,9, Kap. 60/67 cm, Spannung +20 kV)

Dieses Ergebnis verwundert, da von TSENG und Mitarbeitern bei der kapillarelektrophoretischen Bestimmung von fluoreszenzderivatisierten Adenin-Mononukleotiden bei Anregung durch einen HeCd-Laser ( $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ ) ein Empfindlichkeitsvorteil gegenüber der UV-Detektion bei 254 nm gefunden wurde.<sup>71</sup> Die Abweichung zu diesen Ergebnissen kann sicher nur zum Teil über die bereits von ROTILAN<sup>72</sup> beschriebene, gegenüber den Mononukleotiden etwa um den Faktor 10 geringere Fluoreszenz der Dinukleotide und über spezifische Vorteile der von TSENG selbst entwickelten Detektionseinheit erklärt werden.

Mit den hier erhaltenen Ergebnissen stellt die LIF-Detektion mit Anregung durch einen HeCd-Laser und den hier zur Verfügung stehenden Detektoren keine Alternative zur UV-Detektion dar.

### 6.3 ARGOS 250B-Fluoreszenzdetektor

Prinzipiell handelt es sich beim ARGOS-Detektor um einen zum Einsatz in der Kapillarelektrophorese speziell angepassten Fluoreszenzdetektor nach Art der entsprechenden Detektoren für die Flüssigchromatographie. Als Anregungs-Lichtquelle wird eine Xenon-Lampe verwendet, aus deren kontinuierlichem Emissionsspektrum die gewünschte Anregungswellenlänge durch Einsatz eines Filters oder eines Monochromators selektiert wird. Im Gegensatz zur Laser-induzierten Fluoreszenz kann damit die Anregungswellenlänge an das Absorptionsmaximum der Analyten angepasst werden. Aus dem emittierten Licht wird dann mittels Filtern der gewünschte Wellenlängenbereich ausgewählt. Durch den Einbau der eigentlichen optischen Detektionseinheit in eine normale CE-Kartusche ist es außerdem möglich, Fluoreszenz- und UV-Signal nebeneinander in einem Lauf aufzuzeichnen.

Zur Untersuchung des Argos-Detektors wurde wiederum  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A herangezogen. Als Anregungswellenlänge wurde mit 265 nm das Absorptionsmaximum dieser Verbindung verwendet; das Emissionslicht wurde durch einen *cut-off*-Filter mit der Ausschlussgrenze 320 nm geleitet. Leider konnte ein direkter Vergleich mit dem HeCd-Laser nicht durchgeführt werden, da kein Emissionsfilter mit einer höheren Ausschlussgrenze als 320 nm vorhanden war. Bei einer Anregungswellenlänge über der Ausschlussgrenze des Emissionsfilters war die Sensitivität des Detektors durch Streulichteinflüsse drastisch herabgesetzt.

Verglichen mit der gleichzeitig durchgeführten UV-Detektion ergab sich hier ein Vorteil der Fluoreszenzdetektion im Signal-Rausch-Verhältnis von etwa sieben (s. Abb. 6.4). Berücksichtigt man, dass die Ethenverbindung eine etwa um den Faktor 3–4 geringere UV-Absorption als die underivatisierten Dinukleotide aufweist, so beträgt der Vorteil der Fluoreszenzdetektion nur noch etwa Faktor zwei, was den Aufwand einer Derivatisierung nicht gerechtfertigt erscheinen lässt. Auch die durch Fluoreszenzdetektion erreichbare Erhöhung der Selektivität lässt eine Vereinfachung der Probenaufarbeitung nicht zu, da die Haupt-,„verunreinigung“ der Analyten in ebenfalls zu fluoreszierenden Derivaten umgesetzten Adenosinmononukleotiden besteht.

Abschließend muss somit festgestellt werden, dass die Fluoreszenzderivatisierung und -detektion mit den im Rahmen dieser Arbeit verfügbaren Geräten keine Vorteile gegenüber den in Kapitel 3 und 4 vorgestellten, auf UV-Absorption beruhenden Methoden bietet.

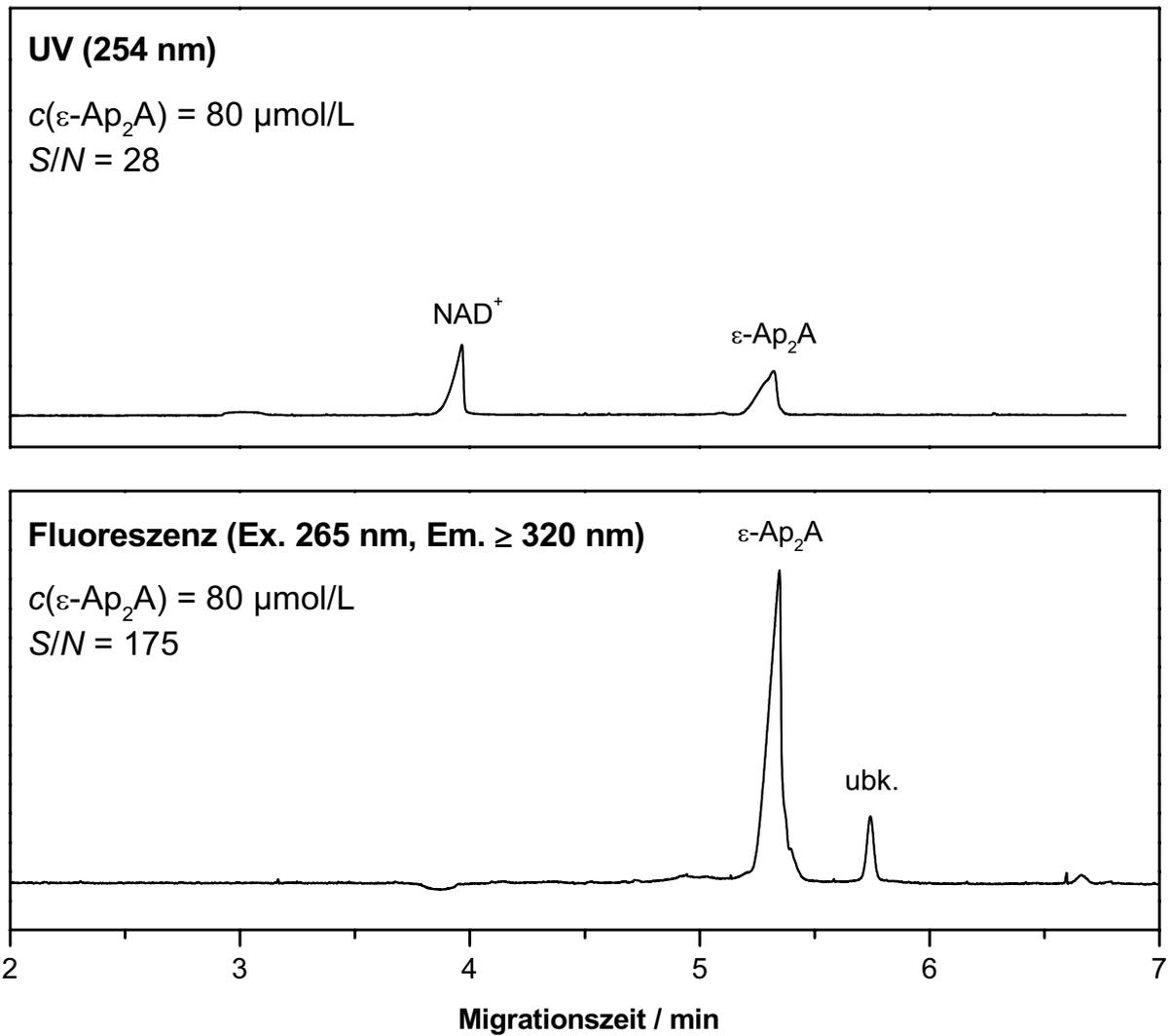


Abb. 6.4 UV- und Fluoreszenzsignal von  $\epsilon\text{-Ap}_2\text{A}$  bei Verwendung des ARGOS-Detektors (Ammoniumcarbonat-Puffer 50 mmol/L pH 9,9, Kap. 38 cm Gesamtlänge, Spannung +10 kV)



## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Dinukleosidpolyphosphate stellen eine vielfältige Gruppe körpereigener Botenstoffe dar. In den letzten Jahren hat das Interesse an dieser Substanzklasse aufgrund ihrer zahlreichen pharmakologischen Effekte, insbesondere ihres Einflusses auf das Herz-Kreislauf-System, stark zugenommen. So wird eine ursächliche Beteiligung vor allem der Diadenosinpolyphosphate an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie diskutiert. In Abb. 7.1 ist die Struktur dieser Verbindungen dargestellt.

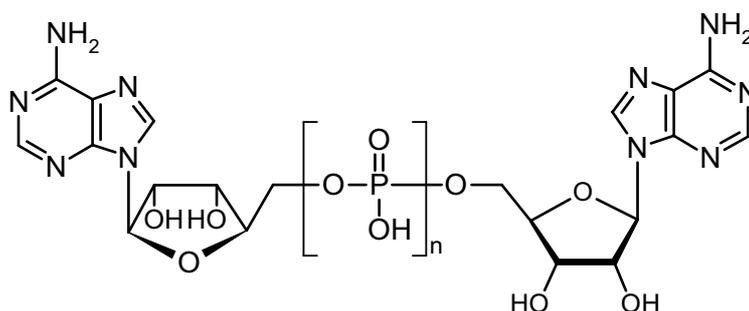


Abb. 7.1 Struktur der Diadenosinpolyphosphate  $Ap_nA$  ( $n = 2-7$ )

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Trennung der Diadenosinpolyphosphate und ihrer Guanosinderivate mittels Kapillarelektrophorese systematisch untersucht. Weiter wurde eine kapillarelektrophoretische Bestimmung dieser Substanzen in humanen Thrombozyten entwickelt, validiert und auf die Untersuchung von Thrombozytenproben freiwilliger Probanden angewendet. Die so erzielten Ergebnisse wurden mit den bisher veröffentlichten, durch chromatographische Methoden erhaltenen Daten verglichen.

Durch die systematische Untersuchung des Migrationsverhaltens sind mehrere zur Trennung der Dinukleosidpolyphosphate geeignete Methoden entwickelt worden.

Eine schnelle Trennung der Diadenosinpolyphosphate  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  sowie der Adenosinphosphate gelang in einem schwach sauren Citratpuffer innerhalb von acht Minuten. Dabei wurden Werte für den Trennleistungsparameter  $N$  von 250.000 und höher erzielt. Durch den Zusatz von Magnesium-Ionen gelang eine Erweiterung der Trennung auf die beiden höheren Homologen  $Ap_7A$  und  $Ap_8A$ . Die zur Trennung aller Verbindungen erforderliche Analysendauer konnte dabei auf sechs Minuten verringert und die Kapillare auf eine effektive Länge von 20 cm verkürzt werden. Ohne den Einsatz solcher komplexbildender Zusätze war die Trennung von  $Ap_6A$  bis  $Ap_8A$  auf-

grund ihres nur minimal verschiedenen Ladungs-Masse-Verhältnisses nicht möglich. Beide hier beschriebenen Trennungen sind in Abb. 7.2 dargestellt.

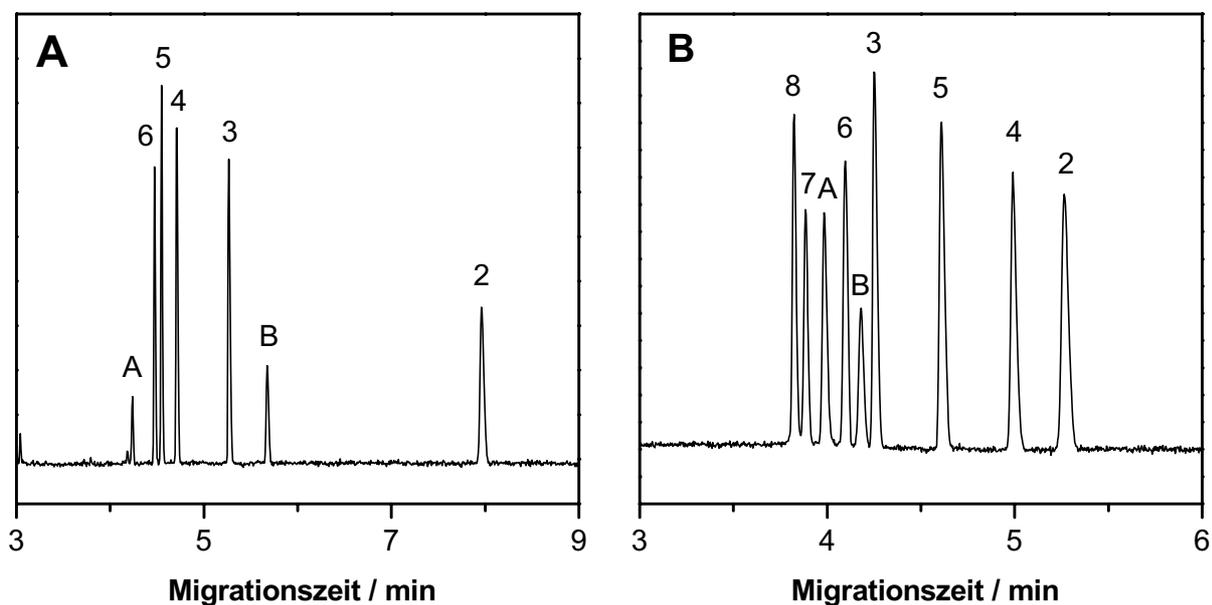


Abb. 7.2 A: Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und ADP / ATP im Citratpuffer pH 5,25 (Pufferkonzentration 50 mmol/L, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV)  
 B: Trennung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A und ADP / ATP durch Mg<sup>2+</sup>-Zusatz (Citratpuffer 50 mmol/L pH 5,25, Kapillare 20/27 cm, Spannung -11,5 kV, Mg<sup>2+</sup>-Konzentration 10,5 mmol/L)

Substanzbezeichnung: 2–8 = Ap<sub>2</sub>A – Ap<sub>8</sub>A, A = ATP, B = ADP

In beiden Abbildungen ist AMP aufgrund zu langer Migrationszeiten (11 bzw. 7 Minuten) nicht gezeigt.

Die Wahl des Pufferkations hat starken Einfluss auf die Trennung vor allem der Verbindungen mit längerer Phosphatkette. Die beste Selektivität zeigten dabei Ammonium-Ionen. Dieser Einfluss kann mit unterschiedlichen taxigenen, d. h. die innere Struktur des Lösungsmittels beeinflussenden Eigenschaften der Kationen erklärt werden. Ein solcher Einfluss des Pufferkations wurde bisher bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung von Nukleotiden nur für die Selektivität zwischen den verschiedenen Nukleobasen, nicht aber für die Selektivität zwischen den Verbindungen verschiedener Phosphatkettenlänge beschrieben.

Zur Trennung eines komplexen, aus Adenosin- und Guanosin-Dinukleotiden bestehenden Gemisches erwiesen sich schwach saure Citratpuffer aber wegen der zu geringen Selektivität zwischen den verschiedenen Nukleobasen als weniger geeignet.

Eine Trennung der Dinukleosidpolyphosphate in Phosphat- oder Boratpuffern gelang, war aber aufgrund deutlich geringerer Trennleistung für die höheren Homologen und der aus der Komplexbildung zwischen den Ribose-Partialstrukturen und der Borsäure resultierenden irregulären Migrationsreihenfolge problematisch.

Die besten Ergebnisse wurden bei der Verwendung von alkalischen Carbonatpuffern erhalten. Eine Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  sowie der Adenosinphosphate gelang hier innerhalb von ca. 25 Minuten (Abb. 7.3). Die beste Selektivität für die länger-kettigen Verbindungen wurde wiederum bei der Verwendung von Ammoniumcarbonat erzielt. Durch die Deprotonierung des Guaninringes bei pH-Werten oberhalb von 9–9,5 gelingt die Trennung von adenosin- und guanosinhaltigen Verbindungen im alkalischen pH-Bereich. Auch wenn nicht alle Diadenosin-, Adenosin-Guanosin- und Diguanosinpolyphosphate in einem Lauf voneinander zu trennen sind, können selbst komplexe Mischungen durch die Messung bei zwei verschiedenen pH-Werten bestimmt werden. Eine solche Variation des pH-Wertes ist im alkalischen pH-Bereich problemlos durchführbar, da der EOF hier nur eine geringe pH-Abhängigkeit aufweist und aufwändige Äquilibrierungsschritte nicht erforderlich sind.

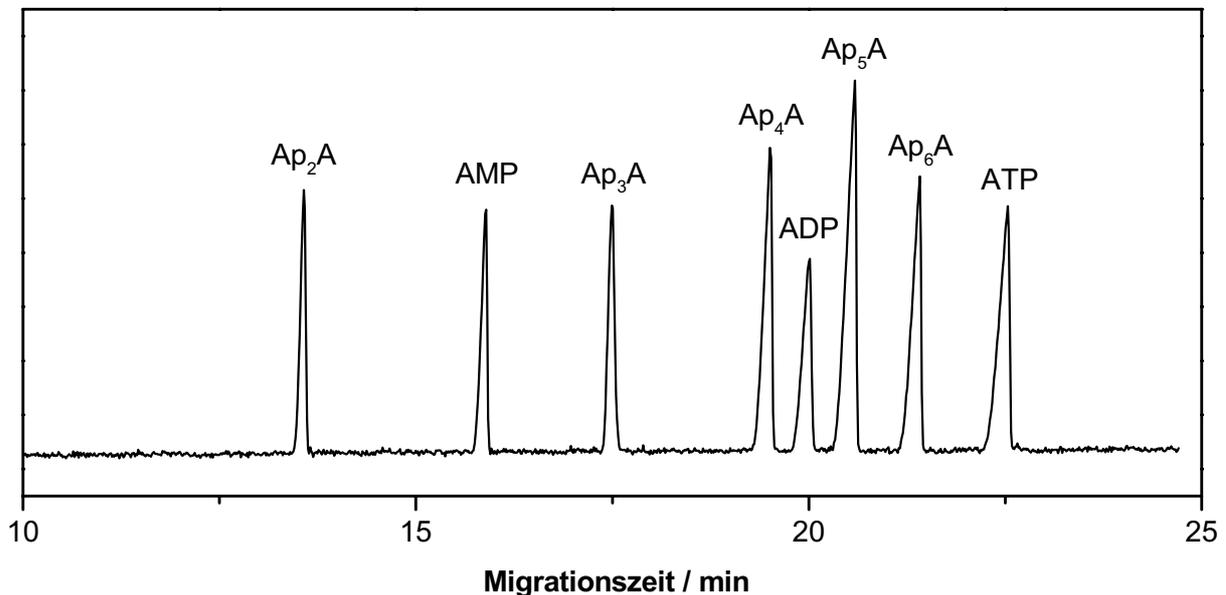


Abb. 7.3 Trennung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  und AMP / ADP / ATP im Ammoniumcarbonatpuffer bei pH 10,5  
(Pufferkonzentration 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV)

Im Ammoniumcarbonatpuffer wurde eine Methode zur Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in wässrigen Lösungen validiert; als interner Standard wurde  $\text{NAD}^+$  verwendet. Die Bestimmungsgrenze lag bei  $2,6 \mu\text{mol/L}$ . Eine solche validierte Bestimmung ist für die Arbeit mit diesen Verbindungen außerordentlich wichtig, da viele Substanzen nicht kommerziell erhältlich sind.

Basierend auf der Trennung im Ammoniumcarbonatpuffer wurde eine validierte Bestimmung der Diadenosinpolyphosphate und ihrer Guanosinderivate in Humanthrombozyten entwickelt. Als interner Standard wurde das Diethenoderivat  $\epsilon\text{-Ap}_2\text{A}$  verwendet. Diese Verbindung ist partialsynthetisch aus  $\text{Ap}_2\text{A}$  dargestellt worden. Die Probenaufarbeitung folgte dem für chromatographische Untersuchungen beschriebenen Verfahren aus Proteinfällung, selektiver Konzentration der Dinukleotide mittels Boronat-Affinitätschromatographie und anschließender Entsalzung. Eine ursprünglich angestrebte Vereinfachung der Probenaufarbeitung war nicht möglich. Es gelang zwar, in der Kapillarelektrophorese Mono- und Dinukleotide abzutrennen, allerdings war eine Bestimmung der Dinukleotide neben dem in den Thrombozyten enthaltenen extrem hohen Überschuss an Mononukleotiden von ca. 100:1 nicht durchführbar, so dass auf die Affinitätschromatographie nicht verzichtet werden konnte. Weiter sind im Eluat der Affinitätschromatographie der Salzgehalt zu hoch und die Substanzkonzentrationen aufgrund der hohen Flussrate zu niedrig, um eine prinzipiell mögliche direkte Injektion des Eluates ohne vorherige Entsalzung und Aufkonzentrierung durchzuführen.

Die Identifizierung der Analyten in den Plättchenproben erfolgte über Migrationszeitvergleich bei verschiedenen pH-Werten und Untersuchung der Proben mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Andere Verfahren wie die Aufnahme von DAD-Spektren oder die online-CE/MS-Kopplung waren aufgrund zu hoher Nachweisgrenzen nicht für biologische Proben geeignet. Außerdem besitzen UV-Spektren für die Differenzierung zwischen Dinukleosidpolyphosphaten nur geringe Aussagekraft.

Die Nachweisgrenze dieser Methode lag bei etwa  $200 \text{ pmol}$  Dinukleotid pro Plättchenprobe, dies entspricht einer effektiven Konzentration der Probenlösung von etwa 4 bis  $5 \mu\text{mol/L}$ . Dies ist prinzipbedingt aufgrund des kürzeren Lichtweges etwa um den Faktor 10–50 schlechter als bei vergleichbaren HPLC-Methoden, wird aber durch die viel kleineren Probenvolumina teilweise kompensiert.

Mit dieser Methode gelang die routinemäßige Bestimmung von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  sowie  $\text{Ap}_3\text{G}$  und  $\text{Ap}_4\text{G}$  in Humanthrombozyten. Jede Probe wurde dabei zur Erhöhung der Selektivität bei zwei verschiedenen pH-Werten untersucht. Bisher sind in der Literatur nur chromatographische Bestimmungen von  $\text{Ap}_3\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  beschrieben. Somit ist

durch CE erstmals zusätzlich die Bestimmung von  $Ap_2A$ ,  $Ap_3G$  und  $Ap_4G$  möglich. In Abb. 7.4 ist das Pherogramm einer Thrombozytenprobe zusammen mit einem typischen HPLC-Chromatogramm aus der Literatur abgebildet.

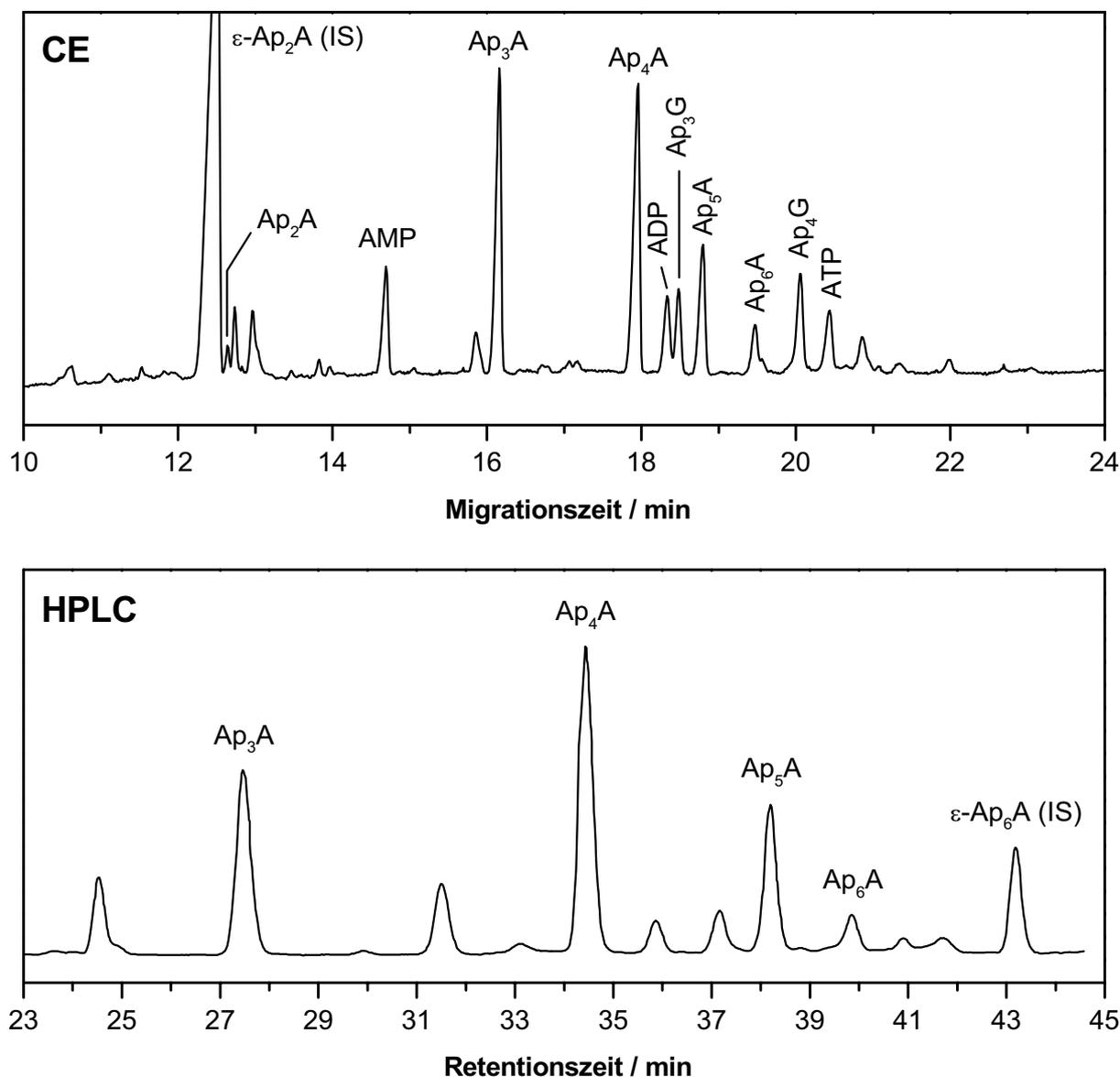


Abb. 7.4 Elektropherogramm und Chromatogramm einer Thrombozytenprobe nach vollständiger Probenaufarbeitung

CE: Ammoniumcarbonatpuffer 50 mmol/L pH 10,35, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV

HPLC: LiChrospher 100 RP-18 (250\*3 mm), Eluent A: 50 mmol/L  $KH_2PO_4$  pH 6,5 mit 8 mmol/L TBAHSO<sub>4</sub>, Eluent B 80 % MeCN in Wasser, Gradientenelution (Abbildung aus der Literatur entnommen.<sup>14</sup>)

Die aus der Untersuchung von 21 Thrombozytenproben freiwilliger Probanden gewonnenen Daten für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A stimmen sehr gut mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen aus chromatographischen Untersuchungen überein. Für Ap<sub>2</sub>A sowie die Guanosinverbindungen Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>4</sub>G wurden mit dieser Arbeit erstmals Daten gewonnen. In einem Vergleich von Thrombozytenproben eines Hypertonikers mit Proben eines normotensiven Probanden konnte ein signifikant niedrigerer Gehalt an Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>3</sub>G in den Blutplättchen des Hypertonikers festgestellt werden.

Die Kapillarelektrophorese hat sich somit als geeignete und zuverlässige Analyse-methode zur Untersuchung von Dinukleosidpolyphosphaten in komplexer Matrix wie humanen Thrombozyten erwiesen. Aufgrund ihres Trennprinzips stellt sie eine zur HPLC orthogonale Methode und damit eine Ergänzung und Absicherung zu etablierten Verfahren dar. Die Trennung der Verbindungen beruht auf Unterschieden im Ladungs-Masse-Verhältnis und somit auf einem völlig anderen Mechanismus als bei der Ionen-paar-*Reversed-Phase*-Chromatographie. Aufgrund der Ladung der Mono- und Dinukleotide können einfache Puffersysteme ohne weitere Zusätze verwendet werden. In der Kapillarelektrophorese beträgt die Analysenzeit etwa 30 Minuten, in der HPLC benötigt ein Lauf ca. 45 Minuten zuzüglich Reäquilibration der Säule. Selbst wenn in der Kapillarelektrophorese zur Bestimmung vieler verschiedener Verbindungen zwei Läufe bei verschiedenen pH-Werten erforderlich sind, bleiben die Analysenzeiten in HPLC und CE vergleichbar. Ein weiterer Vorteil der Kapillarelektrophorese ist das extrem kleine Injektionsvolumen von wenigen Nanolitern.

Zukünftig sollten sich durch die Entwicklung sog. *sheathless-CE/ESI-MS-Interfaces* entscheidende Verbesserungen bei der Detektion in der CE/MS-Kopplung ergeben. Damit wäre es möglich, auch biologische Proben mit ausreichender Nachweisgrenze massenspektrometrisch zu detektieren. Da die hier entwickelte kapillarelektrophoretische Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate bereits zur Kopplung mit der Massenspektrometrie kompatibel ist, ließen sich *online* simultan sowohl die Identifizierung mittels Massenspektrometrie als auch die Quantifizierung durch UV-Absorption oder ESI-MS durchführen. Dies wäre ein weiterer Vorteil gegenüber den bisher beschriebenen HPLC-Trennungen, deren Eluent aufgrund der fehlenden Flüchtigkeit nicht kompatibel zur Kopplung mit einem Massenspektrometer ist.

## **II. Experimenteller Teil**



---

# 1 Allgemeines

## 1.1 Geräte

### 1.1.1 Allgemeine Geräte

Abblasgerät	Hausangefertigtes Gerät mit 12 Ausgängen und Stickstoffanschluss
Analytische Waage	Mettler H 33 (Mettler Waagen, Gießen)
Bidestillationsapparatur	Bi 18 (Heraeus Quarzschmelze, Kleinostheim)
Feinwaage	Mettler P 1000 (Mettler Waagen, Gießen)
Gefriertrocknungsanlage	Lyovac GT-2 (Finn-Aqua Santasalo Sohlberg, Hürth)
Magnetrührer	Variomag <sup>®</sup> Electronicrührer MULTIPOINT HP 15 (H+P Labortechnik, München)
Mikrowaage	Sartorius 4125 mit Digitalvoltmeter Sartorius 708501 (Sartorius Werke, Göttingen)
pH-Elektroden	Einstabmesskette SenTix 50 (WTW, Weilheim) Mikro-Einstabmesskette InLab <sup>®</sup> 423 (Mettler Toledo, Gießen)
pH-Meter	pH 522 (WTW, Weilheim)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg)
Spektralfluorophotometer	RF 540 (Shimadzu, Columbia, MD, USA)
Spektralphotometer	UVIKON 922 (Kontron Instruments, Mailand, Italien)
Ultraschallbad	Sonorex TK 52 (Bandelin Elektronik, Berlin)
Vakuum-Zentrifuge	SpeedVac Concentrator (ThermoSavant, Holbrook, NY, USA)
Vortexer	IKA Vibro-Fix (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Zentrifuge	Labofuge 400R mit Rotor 8179 und Becher 8172 (Heraeus Instruments, Osterode)

### 1.1.2 Kapillarelektrophorese

Geräte	P/ACE System 2050 mit Software System Gold V. 7.11 P/ACE System 2100 mit Software System Gold V. 7.11 P/ACE System 5510 mit Software System Gold V. 8.10 P/ACE System MDQ mit Software System MDQ V. 2.3 (alle Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) HP <sup>3D</sup> CE mit Software ChemStation V. A.06.03[509] (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
UV-Detektoren	P/ACE UV-Absorbance Detector mit Filter 254 nm P/ACE Dioden-Array-Detektor P/ACE MDQ Dioden-Array-Detektor (alle Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA ) HP <sup>3D</sup> Dioden-Array-Detektor (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
Fluoreszenz-Detektoren	P/ACE LIF-Detektor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) in Kombination mit HeCd-Laser Omnicrome Series 74 (Laser 2000, Wessling), Ausgangsleistung 20 mW bei 325 nm Argos 250B Fluoreszenzdetektor mit Anregungsmono- chromator (Flux Instruments, Basel, Schweiz)
Kapillaren	fused-silica, 50 µm ID, 365 µm OD, unbehandelte Ober- fläche, Meterware (Polymicro Inc., Phoenix, AZ, USA)
Mikrovials für Beckman P/ACE 2xxx und 5510	selbstgefertigte Kunststoff-Mikrovials aus Polycarbonat mit Doppelkegel, Fassungsvermögen 25 µL

### 1.1.3 Hochdruck-Flüssigchromatographie

Pumpe	L-6000A Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Tokio, Japan)
Säule für Affinitäts- chromatographie	Kationenaustauscher BioRex 70 (BioRad Laboratories, Hercules, CA), derivatisiert mit <i>m</i> -Aminophenylboronsäure Eigenbefüllung in Leersäule HR 5/5 5*50 mm (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)
Säule für Entsalzung	LiChrospher® 100 RP-18 5 µm (Merck, Darmstadt) Eigenbefüllung in Stahlsäule 4*250 mm
Probenaufgabe	Rheodyne Modell 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA)
Probenschleifen	div. Probenschleifen aus Edelstahl (Rheodyne, Cotati, USA) 5-mL-Probenschleife aus PEEK (Latek Labortechnik, Eppelheim)
Detektoren	655A UV-Detektor (Merck Hitachi, Tokio, Japan) Model 430 Conductivity Detector (Waters Millipore, Milford, MA, USA)
Schreiber	Dreikanalschreiber Typ 2041 (Linseis, Selb)
Integrator	D-2000 Chromato-Integrator (Merck Hitachi, Tokio, Japan)

### 1.1.4 Massenspektrometrie

MALDI-TOF-MS	TofSpec-2E (Micromass, Manchester, UK) Reflex III (Bruker Daltonics, Bremen)
ESI-MS	LCQ® mit ESI-Interface (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA)

## 1.2 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien entstammten verschiedenen kommerziellen Quellen und besaßen einen dem jeweiligen Verwendungszweck entsprechenden Reinheitsgrad (*purissimum, pro analysi, gradient grade* etc.). Eine weitere Aufreinigung wurde nicht durchgeführt.

Wasser zur Herstellung von Puffern und Eluenten wurde durch doppelte Destillation von demineralisiertem Wasser gewonnen.

## 1.3 Mono- und Dinukleotide

Diadenosindi-, -tri-, -tetra-, -penta- und -hexaphosphat sowie Adenosinmono-, -di- und -triphosphat wurden bei der Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, erworben. Alle anderen Dinukleosidpolyphosphate wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. H. Schlüter, Berlin, synthetisch hergestellt und für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Strukturformeln und Nomenklatur der Analyten sind in Kap. 2.1 des theoretischen Teils beschrieben. In den folgenden Tabellen sind die relativen Molekülmassen, die monoisotopischen Massen und die Summenformeln der untersuchten Mono- und Dinukleotide zusammengestellt.

### Diadenosin-(5',5''')-p<sup>1</sup>,p<sup>n</sup>-polyphosphate, Ap<sub>n</sub>A

	$M_R$	Monoisotop. Masse	Summenformel
Ap <sub>2</sub> A	676,4	676,116	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> P <sub>2</sub>
Ap <sub>3</sub> A	756,4	756,082	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>10</sub> O <sub>16</sub> P <sub>3</sub>
Ap <sub>4</sub> A	836,4	836,048	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>10</sub> O <sub>19</sub> P <sub>4</sub>
Ap <sub>5</sub> A	916,4	916,015	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>10</sub> O <sub>22</sub> P <sub>5</sub>
Ap <sub>6</sub> A	996,4	995,981	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub> P <sub>6</sub>
Ap <sub>7</sub> A	1076,4	1075,947	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> N <sub>10</sub> O <sub>28</sub> P <sub>7</sub>
Ap <sub>8</sub> A	1156,4	1155,913	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>10</sub> O <sub>31</sub> P <sub>8</sub>

**Diguanosin-(5',5''')-p<sup>1</sup>,p<sup>n</sup>-polyphosphate, Gp<sub>n</sub>G**

	$M_R$	Monoisotop. Masse	Summenformel
Gp <sub>2</sub> G	708,4	708,105	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> P <sub>2</sub>
Gp <sub>3</sub> G	788,4	788,072	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>10</sub> O <sub>18</sub> P <sub>3</sub>
Gp <sub>4</sub> G	868,4	868,038	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>10</sub> O <sub>21</sub> P <sub>4</sub>
Gp <sub>5</sub> G	948,4	948,004	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>10</sub> O <sub>24</sub> P <sub>5</sub>
Gp <sub>6</sub> G	1028,4	1027,971	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>10</sub> O <sub>27</sub> P <sub>6</sub>

**Adenosin-Guanosin-(5',5''')-p<sup>1</sup>,p<sup>n</sup>-polyphosphate, Ap<sub>n</sub>G**

	$M_R$	Monoisotop. Masse	Summenformel
Ap <sub>2</sub> G	692,4	692,111	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> P <sub>2</sub>
Ap <sub>3</sub> G	772,4	772,077	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>10</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub>
Ap <sub>4</sub> G	852,4	852,043	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>10</sub> O <sub>20</sub> P <sub>4</sub>
Ap <sub>5</sub> G	932,4	932,009	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>10</sub> O <sub>23</sub> P <sub>5</sub>
Ap <sub>6</sub> G	1012,4	1011,976	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>10</sub> O <sub>26</sub> P <sub>6</sub>

**Di(1,N<sup>6</sup>-etheno)-Ap<sub>n</sub>A, ε-Ap<sub>n</sub>A**

	$M_R$	Monoisotop. Masse	Summenformel
ε-Ap <sub>2</sub> A	724,5	724,116	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> P <sub>2</sub>

**Adenosin-5'-phosphate, Ap<sub>n</sub>**

	$M_R$	Monoisotop. Masse	Summenformel
Ap <sub>1</sub> (AMP)	347,2	347,063	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P
Ap <sub>2</sub> (ADP)	427,2	427,029	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub>
Ap <sub>3</sub> (ATP)	507,2	506,996	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub>

## 1.4 Allgemeine Methoden und Verfahrensweisen

In den folgenden Kapiteln werden allgemeine Methoden und Verfahrensweisen bei der Durchführung dieser Arbeit beschrieben. Eventuelle Abweichungen oder spezielle Techniken sind in den jeweiligen speziellen Kapiteln des experimentellen Teils angegeben.

### 1.4.1 Handhabung der Mono- und Dinukleotide

Von allen untersuchten Mono- und Dinukleotiden wurden wässrige Lösungen der ungefähren Konzentration 10 mmol/L hergestellt, kapillarelektrophoretisch auf Reinheit geprüft und mit der in Kap. 3.3.3 beschriebenen Methode quantifiziert. Danach wurden diese Lösungen durch Verdünnung auf eine Konzentration von 1 mmol/L für Dinukleotide bzw. 2 mmol/L für Mononukleotide eingestellt.

Probenlösungen für die Kapillarelektrophorese wurden aus den ein- bzw. zweimolaren Stocklösungen erhalten. Soweit nicht anders angegeben, betrug die Konzentration 100  $\mu\text{mol/L}$  für jedes Dinukleotid und 200  $\mu\text{mol/L}$  für jedes Mononukleotid.

Alle Stock- und Probenlösungen wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 1.4.2 Kalibration des pH-Meters

Aufgrund der teilweise starken pH-Abhängigkeit der Migrationszeit war eine sorgfältige Kalibration des pH-Meters erforderlich. Diese wurde mit den nachfolgend beschriebenen pH-Standardlösungen nach USP 23 mindestens einmal täglich durchgeführt. Die Temperaturabhängigkeit der Elektrodensteilheit und des pH-Wertes der Standardlösungen wurden dabei berücksichtigt.

#### 1. 50 mmol/L-Kaliumhydrogenphthalat

10,12 g zuvor 1 Stunde bei  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknetes Kaliumhydrogenphthalat werden in bidestilliertem Wasser zu 1000 mL gelöst.

pH 4,00 ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) – pH 4,00 ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) – pH 4,01 ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

#### 2. 50 mmol/L-Natrium-/ Kaliumphosphat

3,53 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 3,39 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , beide zuvor zwei Stunden bei  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet, werden in bidestilliertem Wasser zu 1000 mL gelöst.

pH 6,90 ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) – pH 6,88 ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) – pH 6,86 ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

### 3. 10 mmol/L-Natriumtetraborat

3,80 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  werden in bidestilliertem Wasser zu 1000 mL gelöst.

pH 9,28 (15 °C) – pH 9,23 (20 °C) – pH 9,18 (25 °C)

Der Übervorrat der pH-Standardlösungen wurde bei +4 °C aufbewahrt und nach 3–4 Monaten verworfen. Die zur Kalibration verwendeten Teilmengen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und in regelmäßigen Zeitabständen erneuert.

### 1.4.3 Herstellung der Elektrophoresepuffer

Zur Herstellung von Puffern für die Kapillarelektrophorese wurde die entsprechende Menge Puffersubstanz in bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zusatz der in den einzelnen Vorschriften angegebenen Säure oder Base angepasst. Da die Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes für die Pufferlösungen nicht bekannt war, wurde deren pH-Wert unabhängig von der Raumtemperatur auf den jeweiligen Sollwert eingestellt.

Vor Gebrauch wurden die Puffer 5–10 Minuten im Ultraschallbad entgast. Eine Filtration wurde nicht durchgeführt.

### 1.4.4 Durchführung der Kapillarelektrophorese

Soweit nicht anders angegeben, wurde die Kapillarelektrophorese unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- P/ACE System 2050 mit P/ACE UV-Detektor, Filterwellenlänge 254 nm, Datenrate 5 Hz, *rise time* des Detektors 0,5 s
- Kapillare fused silica 50  $\mu\text{m}$  ID, Apertur der Kapillarkartusche 100\*800  $\mu\text{m}$ , Kapillartemperatur 20 °C
- Injektion hydrodynamisch mit 0,5 psi (entsprechend ca. 35 mbar) Überdruck, Injektion von 2 s Wasser nach der Probe
- Probenvolumen 10  $\mu\text{L}$  in Kunststoff-Mikrovials, zur Vermeidung von Verdunstung mit ca. 10–15  $\mu\text{L}$  dünnflüssigem Paraffin überschichtet
- Spülen hydrodynamisch mit 20 psi (entsprechend ca. 1,4 bar) Überdruck
- Spülen neuer Kapillaren bzw. zu Beginn eines Tages: 10 min 1 M-NaOH / 10 min Wasser / 10 min Puffer, danach 1–2 Läufe unter Trennbedingungen
- Spülen der Kapillare am Ende eines Tages: 5 min Wasser, 5 min Stickstoff



## 2 Kenngrößen und Abkürzungen

### 2.1 Kenngrößen

#### 2.1.1 Elektrophoretische Kenngrößen

$U$	[V]	Spannung	
$E$	[V/cm]	Feldstärke	$E = U / l_{\text{ges}}$
$I$	[A]	Strom	
$l_{\text{eff}}$	[cm]	effektive Kapillarlänge	
$l_{\text{ges}}$	[cm]	gesamte Kapillarlänge	
$t_{\text{m}}$	[min]	Migrationszeit	
$t_{\text{m,rel}}$		relative Migrationszeit	$t_{\text{m,rel}} = t_{\text{m,2}} / t_{\text{m,1}}$
$v$	[cm min <sup>-1</sup> ]	Wanderungsgeschwindigkeit	$v = l_{\text{eff}} / t_{\text{m}}$
$\mu_{\text{app}}$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	scheinbare Mobilität	$\mu_{\text{app}} = v / E = l_{\text{eff}} / (t_{\text{m}} E)$
$\mu_{\text{EOF}}$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	elektroosmotische Mobilität	
$\mu_{\text{eff}}$	[cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	effektive oder Nettomobilität	$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}}$
$r_{\text{S}}$	[Å]	Stokes-Radius	
$h$	[mAU]	Peakhöhe	
$A$	[mAU min]	Peakfläche	
$A_{\text{corr}}$	[mAu cm]	korrigierte Peakfläche	$A_{\text{corr}} = A v = A l_{\text{eff}} / t_{\text{m}}$
$w_{\text{b}}$	[min]	Basisbreite des Peaks	$w_{\text{b}} \approx 2 w_{0.5}$
$w_{0.5}$	[min]	Breite des Peaks in halber Höhe	$w_{0.5} \approx A / h$
$\alpha$		Trennfaktor	$\alpha = \mu_{\text{eff,2}} / \mu_{\text{eff,1}}$
$R$		Auflösung	$R = 2 (t_{\text{m,2}} - t_{\text{m,1}}) / (w_{\text{b,1}} + w_{\text{b,2}})$
$N$		Trennleistungsparameter	$N = 5,54 (t_{\text{m}} / w_{0.5})^2$ $\approx 5,54 [t_{\text{m}} / (A/h)]^2$

### 2.1.2 Massenspektrometrische Kenngrößen

$M_{MI}$	Monoisotopische Masse
$m/z$	Masse-Ladungs-Verhältnis

### 2.1.3 Statistische Kenngrößen und Kenngrößen der Validierung

CI	<i>confidence intervall</i> , Vertrauensbereich
IQA	Interquartilsabstand, Abstand zwischen der ersten (unteren) und dritten (oberen) Quartile
LOD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LOQ	<i>limit of quantitation</i> , Bestimmungsgrenze
MW	Mittelwert
$n$	Anzahl Messwerte
$r$	Korrelationskoeffizient
relSDV%	<i>relative standard deviation</i> , relative Standardabweichung in Prozent
SDV	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes

## 2.2 Verwendete Abkürzungen

AU	<i>absorption unit</i> , Einheit der Absorption
CD	Zirkulardichroismus
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CE/MS	<i>capillary electrophoresis / mass spectrometry</i> , Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> , Kapillarzonenelektrophorese
EOF	<i>electroosmotic flow</i> , elektroosmotischer Fluss
eq.	<i>equal</i> , gleich
ESI	<i>electrospray ionization</i> , Elektrospray-Ionisierung
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Amerikanische Gesundheitsbehörde

---

ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> , Internationale Konferenz zur Harmonisierung von Zulassungsanforderungen
ID	Innendurchmesser
IS	interner Standard
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
LC/MS	<i>liquid chromatography / mass spectrometry</i> , Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie
LIF	<i>laser-induced fluorescence</i> , Laser-induzierte Fluoreszenz
LOD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LOQ	<i>limit of quantification</i> , Bestimmungsgrenze
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionization</i> , Matrix-gestützte Laser-Desorptions-Ionisierung
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt
n. eq.	<i>not equal</i> , ungleich
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz
OD	Außendurchmesser
ORD	Optische Rotationsdispersion
PAA	Polyacrylamid
psi	<i>pounds per square inch</i> , Druckeinheit
RP	<i>reversed-phase</i> , Umkehr-Phase
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> , Signal-Rausch-Verhältnis
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TIC	<i>total ion current</i> , Totalionenstrom
TOF	<i>time of flight</i> , Flugzeit



### 3 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung der Dinukleosidpolyphosphate

#### 3.1 Allgemeines

Die Methodenentwicklung wurde mit wässrigen Lösungen von Referenzsubstanzen durchgeführt. Die Konzentration betrug ca. 100  $\mu\text{mol/L}$  für jedes Dinukleotid und ca. 200  $\mu\text{mol/L}$  für jedes Mononukleotid.

Zu den allgemeinen Bedingungen für die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen vgl. Kap. 1.4.4. des experimentellen Teils. Im folgenden sind jeweils nur Ergänzungen oder Abweichungen der dort beschriebenen Parameter angegeben.

#### 3.2 Schwach saure und neutrale Puffersysteme

##### 3.2.1 Citratpuffer

Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte ausgehend von Citronensäure-Lösungen der jeweiligen Konzentration. Soweit nachfolgend oder in den Abbildungen des theoretischen Teils nicht anders angegeben wurde der pH-Wert mit 5 M-NaOH eingestellt.

##### 3.2.1.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat

**Tab. E-3.1** Scheinbare Mobilitäten (in  $\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  sowie ADP und ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes

pH	$\text{Ap}_6\text{A}$	$\text{Ap}_5\text{A}$	$\text{Ap}_4\text{A}$	$\text{Ap}_3\text{A}$	$\text{Ap}_2\text{A}$	ATP	ADP
2,80	-0,206	-0,206	-0,206			-0,206	-0,106
3,25	-0,196	-0,195	-0,185	-0,104		-0,197	-0,113
3,75	-0,209	-0,208	-0,185	-0,142		-0,210	-0,136
4,25	-0,211	-0,207	-0,194	-0,173	-0,114	-0,222	-0,159
4,75	-0,219	-0,215	-0,207	-0,185	-0,128	-0,230	-0,172
5,25	-0,206	-0,203	-0,196	-0,176	-0,116	-0,218	-0,163
5,75	-0,181	-0,178	-0,171	-0,150		-0,194	-0,143

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

pH	Ap <sub>6</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>2</sub> A	ATP	ADP
6,25	-0,150	-0,147	-0,139	-0,118		-0,167	-0,126
6,75	-0,111	-0,108	-0,100			-0,134	-0,102

Bedingungen: Citronensäure 50 mmol/L, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 5 min 0,1 M-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / 5 min Wasser / 5 min Puffer

**Tab. E-3.2** Auflösung und Trennleistungsparameter von Ap<sub>5</sub>A bzw. Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH	Ap <sub>6</sub> A				Ap <sub>5</sub> A				R
	t <sub>m</sub> min	A mAU min	h mAU	N	t <sub>m</sub> min	A mAU min	h mAU	N	
4,25	4,39	0,126	2,51	42 370	4,48	0,187	1,87	11 120	0,60
4,75	4,22	0,129	5,37	172 110	4,30	0,176	6,21	127 820	1,53
5,25	4,48	0,128	6,64	299 210	4,55	0,177	8,45	261 400	1,74
5,75	5,10	0,148	6,47	275 380	5,19	0,204	7,72	213 710	1,83
6,25	6,17	0,188	5,48	179 190	6,31	0,255	6,70	152 280	1,94
6,75	8,35	0,263	4,62	119 360	8,59	0,360	5,60	98 670	1,98

Bedingungen: s. Tab. E-3.1

**Tab. E-3.3** Auflösung und Trennleistungsparameter von Ap<sub>5</sub>A bzw. Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit der Pufferkonzentration

c mmol/L	Ap <sub>6</sub> A				Ap <sub>5</sub> A				R
	t <sub>m</sub> min	A mAU min	h mAU	N	t <sub>m</sub> min	A mAU min	h mAU	N	
25	6,27	0,179	3,01	61 340	6,43	0,225	4,22	80 340	1,42
50	6,58	0,154	3,92	155 410	6,69	0,198	4,26	117 780	1,28
100	7,33	0,136	3,90	245 140	7,41	0,167	4,97	269 580	1,17

Bedingungen: Puffer Citronensäure pH 4,75, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-NaOH / 3 min Puffer

**Tab. E-3.4** Auflösung und Trennleistungsparameter von Ap<sub>5</sub>A bzw. Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des Methanolgehaltes des Trennpuffers

MeOH	Ap <sub>6</sub> A				Ap <sub>5</sub> A				R
	t <sub>m</sub>	A	h	N	t <sub>m</sub>	A	h	N	
Vol.-%	min	mAU min	mAU		min	mAU min	mAU		
0	5,29	0,141	2,77	59 960	5,43	0,190	3,88	67 820	1,40
1	5,53	0,099	1,91	63 370	5,62	0,135	2,63	66 550	0,87
2	5,90	0,101	1,79	60 840	6,00	0,137	2,50	66 650	0,90
4	6,18	0,105	2,01	76 290	6,24	0,152	2,55	60 800	0,54
10	7,03	0,250	2,30	23 180	7,03	0,250	2,30	23 170	0

Bedingungen: Puffer Citronensäure 50 mmol/L pH 4,75, Methanolzusatz nach pH-Einstellung des Puffers, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-NaOH / 3 min Puffer

### 3.2.1.2 Guanosin-Derivate

**Tab. E-3.5** Scheinbare Mobilitäten (in cm<sup>2</sup> kV<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) der Ap<sub>n</sub>A, Ap<sub>n</sub>G und Gp<sub>n</sub>G in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes

	pH 4,75	pH 5,25	pH 5,75	pH 6,25	pH 6,75
Ap <sub>2</sub> A	-0,131	-0,133	-0,124	-0,110	-0,102
Ap <sub>3</sub> A	-0,191	-0,192	-0,182	-0,170	-0,165
Ap <sub>4</sub> A	-0,211	-0,214	-0,205	-0,188	-0,180
Ap <sub>5</sub> A	-0,220	-0,222	-0,213	-0,195	-0,187
Ap <sub>6</sub> A	-0,224	-0,224	-0,216	-0,198	-0,191
Ap <sub>2</sub> G	-0,139	-0,131	-0,117	-0,105	-0,099
Ap <sub>3</sub> G	-0,202	-0,186	-0,173	-0,161	-0,155
Ap <sub>4</sub> G	-0,208	-0,214	-0,193	-0,181	-0,175
Ap <sub>5</sub> G	-0,215	-0,220	-0,202	-0,191	-0,186
Ap <sub>6</sub> G	-0,215	-0,223	-0,209	-0,194	-0,188
Gp <sub>2</sub> G	-0,143	-0,129	-0,116	-0,105	-0,099
Gp <sub>6</sub> G	-0,215	-0,222	-0,200	-0,187	-0,181

Bedingungen: Puffer Citronensäure 50 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 5 min Puffer

### 3.2.1.3 Diadenosinhepta- und octaphosphat

**Bedingungen bei der Aufnahme der Elektropherogramme in Abb. 3.10 des theoretischen Teils:**

Puffer Citronensäure 50 mmol/L, pH 5,25 eingestellt mit 5 M-NaOH / 5 M-KOH / 25 % NH<sub>4</sub>OH, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 5 min Puffer

**Tab. E-3.6 Auflösung und Trennleistungsparameter von Ap<sub>5</sub>A bzw. Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des Puffer-Gegenions**

	Ap <sub>6</sub> A				Ap <sub>5</sub> A				R
	<i>t<sub>m</sub></i>	A	<i>h</i>	N	<i>t<sub>m</sub></i>	A	<i>h</i>	N	
	min	mAU min	mAU		min	mAU min	mAU		
Na <sup>+</sup>	7,20	0,301	8,14	210 300	7,31	0,332	9,19	226 830	1,51
K <sup>+</sup>	6,29	0,206	6,64	227 730	6,75	0,244	7,60	244 890	7,29
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	6,59	0,286	8,52	213 510	7,14	0,347	10,21	244 510	8,14

Bedingungen: Puffer Citronensäure 50 mmol/L, pH 5,25 eingestellt mit 5 M-NaOH / 5 M-KOH / 25 % NH<sub>4</sub>OH, Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 5 min Puffer

**Tab. E-3.7 Scheinbare Mobilitäten von Ap<sub>5</sub>A bzw. Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des Puffer-Gegenions sowie resultierender Elektrophoresestrom**

	$\mu_{\text{app}} \text{ Ap}_5\text{A}$ cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$\mu_{\text{app}} \text{ Ap}_6\text{A}$ cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	<i>I</i> μA
Na <sup>+</sup>	-0,214	-0,218	70
K <sup>+</sup>	-0,242	-0,249	90
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0,230	-0,238	93

Bedingungen: s. Tab. E-3.6

### 3.2.2 Phosphat-Puffer

#### 3.2.2.1 Diadenosinverbindungen

**Tab. E-3.8** Trennleistung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und Auflösung des Peakpaares Ap<sub>4</sub>A / Ap<sub>5</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes; pH-Einstellung mit äquimolarer Lösung

pH	<i>N</i> Ap <sub>3</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>4</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>5</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>6</sub> A	<i>R</i> Ap <sub>4</sub> A / Ap <sub>5</sub> A
4,75	177 800	84 700	85 100	11 200	0,72
5,00	165 000	90 000	74 900	13 600	0,75
5,25	140 500	66 200	91 000	17 700	0,68
5,50	10 8200	71 700	62 000	35 200	0,91

Bedingungen: Puffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol/L, pH-Wert eingestellt mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol/L bzw. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mmol/L, Kapillare 40/47 cm, Spannung -23,5 kV (*E* = -500 V/cm), Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

**Tab. E-3.9** Trennleistung für Ap<sub>3</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und Auflösung des Peakpaares Ap<sub>5</sub>A / Ap<sub>6</sub>A in Abhängigkeit des pH-Wertes; pH-Einstellung mit 5 M-NaOH

pH	<i>N</i> Ap <sub>3</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>4</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>5</sub> A	<i>N</i> Ap <sub>6</sub> A	<i>R</i> Ap <sub>5</sub> A / Ap <sub>6</sub> A
6,0	192 900	219 100	52 600	52 500	0
6,5	100 500	129 800	124 000	33 900	1,22
7,0		47700	53 100	22 800	1,35

Bedingungen: Puffer Phosphorsäure 100 mmol/L, pH-Wert eingestellt mit 5 M-NaOH, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV (*E* = -540 V/cm), Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 5 min 0,1 M-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / 5 min Wasser / 5 min Puffer

### 3.2.2.2 Guanodin-Derivate

**Bedingungen bei der Aufnahme der Elektropherogramme in Abb. 3.17 des theoretischen Teils:**

- A: Puffer Phosphorsäure 100 mmol/L, pH 6,7 eingestellt mit 5 M-NaOH, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ 5 min Puffer
- B: Puffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mmol/L, pH 6,7 eingestellt mit 50 mM Citronensäure, Kapillare 30/37 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

### 3.2.3 Acetat- bzw. Formiat-Puffer

Für die Versuche mit Acetat- und Formiatpuffern wurden Lösungen von Ammoniumacetat und Ammoniumformiat mit den Konzentrationen 25, 50 und 100 mmol/L verwendet. Die Einstellung auf pH 5,0 erfolgte mit Eisessig bzw. konzentrierter Ameisensäure.

Elektrophoretische Bedingungen: Kapillare 40/47 cm, Spannung -20 kV, Injektion 5s, Spülen zwischen den Läufen 3 min Puffer

### 3.2.4 Einsatz von mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillaren

#### 3.2.4.1 Herstellung der Kapillaren

Die Herstellung der mit linearem PAA belegten Kapillaren erfolgte nach folgender Vorschrift:

##### *Aktivierung der Kapillare*

- Spülen (CE-System, 20 psi) mit NaOH,  $c = 1 \text{ mol/L}$ , für 60 min
- Spülen (CE-System, 20 psi) mit Aqua bidest. für 60 min
- Spülen (CE-System, 20 psi) mit Stickstoff für 5 min
- Trockenschrank,  $T = 100 \text{ °C}$ , für 120 min
- Entfernung des Polyimid-Coatings am Detektionsfenster

##### *Silanisierung*

- Spülen (Spritze) mit MAPS-Lösung
- 12 h stehen lassen
- Spülen (Spritze) mit Aqua bidest.

**MAPS-Lösung:**

Mischung aus gleichen Volumenteilen MAPS (Methacrylsäure-3-trimethoxysilylpropylester, Methacryloyloxypropyltrimethoxysilan) und Methanol, frisch hergestellt

**Polymerisation**

Spülen (Spritze) mit Acrylamid-Lösung

12 h stehen lassen bei Raumtemperatur / Tageslicht

Spülen (Spritze) mit Aqua bidest.

**Acrylamid-Lösung:**

Acrylamid,  $c = 40$  mg/mL, in TBE-Puffer 0,1 M, frisch hergestellt; Zusatz von 5  $\mu$ L Natriumperoxodisulfat-Lösung und 5  $\mu$ L N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) je mL Lösung unmittelbar vor Verwendung

**TBE-Puffer 0,1 M:**

121 mg Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 62 mg Borsäure, 200  $\mu$ L EDTA-Lösung 0,1 M, Aqua bidest. ad 10,0 mL

**EDTA-Lösung 0,1 M:**

Na<sub>2</sub>Mg-EDTA in H<sub>2</sub>O,  $c = 35,9$  mg/mL

**Natriumperoxodisulfat-Lösung:**

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in H<sub>2</sub>O,  $c = 100$  mg/mL

**Lagerung**

in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,  $c = 50$  mmol/L, pH 2,5 (Einstellung mit NaOH,  $c = 1$  mol/L)

Das manuelle Spülen der Kapillare erfolgte dabei mit einer durch ein passendes Verbindungsstück mit der Kapillare verbundenen Mikroliterspritze. Während Silanierung, Polymerisation und Lagerung wurden die Kapillarenden grundsätzlich mit Parafilm verschlossen.

Vor der Verwendung jeder neuen Kapillare wurde überprüft, ob Mesityloxid als EOF-Marker in einem Citratpuffer,  $c = 50$  mmol/L, bei pH 6,0 in Normalpolung innerhalb von 60 min detektiert werden konnte. War dies nicht der Fall, wurde die Kapillare für die Untersuchungen verwendet.

### 3.2.4.2 Ergebnisse

Unter der Annahme  $\mu_{\text{EOF}} = 0$  wurden aus den Migrationszeiten direkt die effektiven Mobilitäten berechnet.

**Tab. E-3.10 Effektive Mobilitäten (in  $\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in einer PAA-belegten Kapillare bei verschiedenen pH-Werten**

pH	Ap <sub>6</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>2</sub> A	ATP	ADP	AMP
4,50	-0,253	-0,245	-0,235	-0,213	-0,161	-0,260	-0,202	-0,113
4,75	-0,256	-0,253	-0,244	-0,225	-0,171	-0,268	-0,212	-0,123
5,00	-0,262	-0,259	-0,252	-0,234	-0,178	-0,271	-0,221	-0,133
5,25	-0,267	-0,265	-0,256	-0,237	-0,181	-0,276	-0,225	-0,140
5,50	-0,267	-0,264	-0,258	-0,238	-0,182	-0,278	-0,228	-0,146
5,75	-0,267	-0,264	-0,258	-0,238	-0,182	-0,279	-0,232	-0,155
6,00	-0,268	-0,265	-0,258	-0,238	-0,183	-0,282	-0,241	-0,171

Bedingungen: Puffer Citronensäure 50 mmol/L, pH-Einstellung mit 5 M-NaOH, Kapillare 40/47 cm, Spannung -18,8 kV ( $E = -400 \text{ V/cm}$ ), Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min Puffer

**Tab. E-3.11 Trennleistung und Auflösung für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A in einer PAA-belegten Kapillare bei verschiedenen pH-Werten**

pH	Ap <sub>6</sub> A		Ap <sub>5</sub> A		Ap <sub>4</sub> A		Ap <sub>3</sub> A		Ap <sub>2</sub> A
	N	R	N	R	N	R	N	R	N
4,50	66 000	1,70	53 000	2,53	114 000	4,72	32 000	16,58	241 000
4,75	261 000	0,99	95 000	2,60	148 000	7,63	305 000	28,45	200 000
5,00	448 000	1,78	452 000	3,61	402 000	8,82	271 000	24,17	128 000
5,25	570 000	0,95	197 000	2,98	170 000	7,32	205 000	28,67	303 000
5,50	444 000	1,56	380 000	2,95	266 000	9,26	329 000	31,47	297 000
5,75	395 000	1,40	314 000	2,40	143 000	7,62	290 000	29,46	263 000
6,00	392 000	1,43	338 000	2,44	143 000	7,69	298 000	30,20	282 000

Bedingungen: s. Tab. E-3.10

**Tab. E-3.12 Trennleistung und Auflösung für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A in einer PAA-belegten Kapillare bei Variation von Pufferkonzentration und elektrischer Feldstärke**

<b>c</b> mmol/L	<b>E</b> V/cm	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>		<b>Ap<sub>5</sub>A</b>		<b>Ap<sub>4</sub>A</b>		<b>Ap<sub>3</sub>A</b>		<b>Ap<sub>2</sub>A</b>
		<b>N</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>N</b>
50	-400	300 000	1,24	221 000	2,57	139 000	5,42	71 000	20,44	227 000
25	-400	201 000	1,13	148 000	2,85	135 000	8,09	155 000	25,01	182 000
100	-400	397 000	1,06	281 000	2,10	291 000	6,89	230 000	25,42	247 000
100	-400	440 000	0,95	347 000	2,37	342 000	7,38	241 000	26,18	260 000
100	-350	431 000	0,95	332 000	2,23	306 000	7,57	275 000	26,64	236 000
100	-300	367 000	0,97	291 000	2,12	275 000	7,19	249 000	25,25	199 000
100	-250	334 000	0,93	259 000	2,04	245 000	6,78	220 000	21,07	116 000

Bedingungen: Puffer Citronensäure pH 6,0 eingestellt mit 5 M-NaOH, Kapillare 40/47 cm, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min Puffer

### 3.3 Alkalische Puffersysteme

Für den alkalischen Pufferbereich wurde die effektive Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  der Analyten zur Charakterisierung des Migrationsverhaltens herangezogen. Diese wurde nach der Gleichung  $\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}}$  aus der scheinbaren Mobilität  $\mu_{\text{app}}$  der Analyten und der elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  bestimmt. Als Marker für den EOF wurde das beim Durchwandern des Probenlösungsmittels durch das Detektionsfenster entstehende UV-Signal herangezogen. Versuche mit Benzylalkohol oder Mesityloxid als Neutralmarker hatten das Zusammenfallen dieses UV-Signals mit dem EOF bestätigt.

#### 3.3.1 Borat-Puffer

**Tab. E-3.13** Effektive Mobilitäten (in  $\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des Puffer-pH-Wertes

pH	$\mu_{\text{EOF}}$	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A	AMP	ADP	ATP
8,25	0,531	-0,314	-0,319	-0,298	-0,311	-0,346	-0,304	-0,336	-0,336
8,50	0,497	-0,315	-0,320	-0,301	-0,306	-0,325	-0,306	-0,333	-0,333
8,75	0,470	-0,304	-0,308	-0,295	-0,298	-0,314	-0,301	-0,327	-0,324
9,00	0,441	-0,297	-0,303	-0,291	-0,291	-0,299	-0,297	-0,321	-0,319
9,25	0,418	-0,293	-0,298	-0,288	-0,286	-0,288	-0,295	-0,316	-0,314
9,50	0,399	-0,290	-0,296	-0,288	-0,283	-0,283	-0,294	-0,314	-0,311
9,75	0,382	-0,287	-0,293	-0,286	-0,279	-0,279	-0,293	-0,311	-0,308
10,00	0,369	-0,288	-0,294	-0,287	-0,280	-0,280	-0,295		

Bedingungen: Borsäure-Puffer 200 mmol/L, pH-Einstellung mit 5 M-NaOH, Kapillare 40/47 cm, Spannung +20 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min 0,1 M-NaOH / 3 min Puffer

**Tab. E-3.14** Trennleistungsparameter für Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A für die Trennungen in Tab. E-3.13

N Ap <sub>2</sub> A	N Ap <sub>3</sub> A	N Ap <sub>4</sub> A	N Ap <sub>5</sub> A	N Ap <sub>6</sub> A
170 000	135 000	152 000	147 000	205 000

Bedingungen: s. Tab. E-3.13

### 3.3.2 Carbonat-Puffer

Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte ausgehend von Natrium-, Kalium- oder Ammoniumcarbonat-Lösungen der jeweiligen Konzentration. Die zur Einstellung des pH-Wertes verwendete Base ist in den Tabellenlegenden angegeben.

#### 3.3.2.1 Diadenosindiphosphat bis Diadenosinhexaphosphat

**Tab. E-3.15** Effektive Mobilitäten (in  $\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) von  $\text{Ap}_2\text{A}$  bis  $\text{Ap}_6\text{A}$  und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des pH-Wertes im Natriumcarbonat-Puffer

pH	$\mu_{\text{EOF}}$	$\text{Ap}_2\text{A}$	$\text{Ap}_3\text{A}$	$\text{Ap}_4\text{A}$	$\text{Ap}_5\text{A}$	$\text{Ap}_6\text{A}$	AMP	ADP	ATP
9,0	0,485	-0,199	-0,261	-0,283	-0,285	-0,285	-0,246	-0,301	-0,305
9,5	0,484	-0,199	-0,261	-0,284	-0,290	-0,290	-0,246	-0,302	-0,314
10,0	0,468	-0,197	-0,258	-0,280	-0,287	-0,288	-0,243	-0,299	-0,315
10,5	0,444	-0,194	-0,252	-0,274	-0,282	-0,284	-0,239	-0,293	-0,311
11,0	0,425	-0,199	-0,253	-0,275	-0,282	-0,285	-0,242	-0,294	-0,313

Bedingungen: Puffer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mmol/L, pH-Einstellung mit  $\text{NaHCO}_3$  50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

**Tab. E-3.16** Auflösung und Trennleistungsparameter von  $\text{Ap}_5\text{A}$  bzw.  $\text{Ap}_6\text{A}$  in Abhängigkeit des pH-Wertes im Natriumcarbonat-Puffer

pH	$\text{Ap}_5\text{A}$				$\text{Ap}_6\text{A}$				R
	$t_m$ min	A mAU min	h mAU	N	$t_m$ min	A mAU min	h mAU	N	
9,0	18,57	0,522	4,55	145 200	18,57	0,522	4,55	145 100	0
9,5	19,17	0,573	3,96	97 200	19,17	0,573	3,96	97 200	0
10,0	20,65	0,535	4,37	157 700	20,78	0,150	1,81	348 300	0,63
10,5	22,94	0,505	3,70	156 400	23,27	0,156	1,47	266 700	1,36
11,0	26,05	0,559	3,22	123 000	26,51	0,183	1,36	215 700	1,49

Bedingungen: s. Tab. E-3.15

**Tab. E-3.17 Migrationszeiten, Trennleistungen und Auflösung für Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A bei Variation der Trennungsspannung im Natriumcarbonatpuffer**

U kV	Ap <sub>5</sub> A		Ap <sub>6</sub> A		R
	t <sub>m</sub> in min	N	t <sub>m</sub> in min	N	
+18	23,35	104 500	23,66	215 400	1,07
+23	17,38	116 200	17,60	232 000	1,07
+28	13,54	117 400	13,71	212 500	1,04

Bedingungen: Puffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mmol/L, pH 10,5 eingestellt mit NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/L, Kapillare 60/67 cm, Injektion 5 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

**Bedingungen bei der Aufnahme der Elektropherogramme in Abb. 3.29 des theoretischen Teils:**

Puffer 50 mmol/L-Natrium-, Kalium- und Ammoniumcarbonat, pH 10,5 eingestellt mit 5 M-NaOH, 5 M-KOH bzw. 25 % NH<sub>4</sub>OH, Kapillare 60/67 cm, Spannung +18 kV, Injektion 10 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

**Tab. E-3.18 Effektive Mobilitäten (in cm<sup>2</sup> kV<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A und AMP / ADP / ATP in Abhängigkeit des pH-Wertes im Ammoniumcarbonat-Puffer**

pH	μ <sub>EOF</sub>	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A	AMP	ADP	ATP
9,0	0,446	-0,210	-0,267	-0,289	-0,296	-0,301	-0,245	-0,294	-0,311
9,5	0,461	-0,205	-0,264	-0,286	-0,296	-0,302	-0,243	-0,291	-0,311
10,0	0,459	-0,201	-0,259	-0,280	-0,290	-0,296	-0,238	-0,285	-0,304
10,5	0,451	-0,196	-0,252	-0,273	-0,282	-0,288	-0,232	-0,277	-0,296

Bedingungen: Puffer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mmol/L, pH-Einstellung mit 25 % NH<sub>4</sub>OH, Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV, Injektion 10 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

**Tab. E-3.19** Trennleistungsparameter  $N$  für  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  in Abhängigkeit des pH-Wertes im Ammoniumcarbonat-Puffer

pH	$Ap_2A$	$Ap_3A$	$Ap_4A$	$Ap_5A$	$Ap_6A$
9,0	271 900	230 400	162 900	132 100	74 100
9,5	272 600	245 000	185 200	205 100	126 300
10,0	253 800	252 200	191 500	207 600	143 700
10,5	225 900	198 000	191 300	200 200	155 800

Bedingungen: s. Tab. E-3.18

### 3.3.2.2 Guanosin-Derivate

**Tab. E-3.20** Effektive Mobilitäten (in  $cm^2 kV^{-1} s^{-1}$ ) der Adenosin-Guanosin- bzw. Diguanosinpolyphosphate in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH	$\mu_{EOF}$	$Ap_2G$	$Ap_3G$	$Ap_4G$	$Ap_5G$	$Ap_6G$	$Gp_2G$	$Gp_6G$
9,0	0,444	-0,205	-0,259	-0,279	-0,285	-0,293	-0,209	-0,290
9,5	0,456	-0,212	-0,264	-0,283	-0,293	-0,299	-0,227	-0,301
10,0	0,461	-0,228	-0,274	-0,291	-0,298	-0,304	-0,259	-0,315
10,5	0,451	-0,242	-0,282	-0,295	-0,301	-0,304	-0,282	-0,323

Bedingungen: Puffer  $(NH_4)_2CO_3$  50 mmol/L, pH-Einstellung mit 25 %  $NH_4OH$ , Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV, Injektion 10 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

### 3.3.2.3 Diadenosinhepta- und -octaphosphat

**Bedingungen bei der Aufnahme der Elektropherogramme in Abb. 3.33 des theoretischen Teils:**

Puffer 50 bzw. 75 mmol/L-Ammoniumcarbonat, pH 9,5 eingestellt mit 25 %  $NH_4OH$ , Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV, Injektion 10 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

### 3.3.3 Validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate aus wässrigen Lösungen

#### 3.3.3.1 Bedingungen

Die validierte Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- P/ACE System 2050 mit P/ACE UV-Detektor, Filterwellenlänge 254 nm, Datenrate 5 Hz, *rise time* des Detektors 0,5 s, *detector range* 0,030
- Kapillare fused-silica 50  $\mu\text{m}$  ID, 60 cm effektive Länge, 67 cm Gesamtlänge, Apertur der Kapillarkartusche 100\*800  $\mu\text{m}$ , Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH 9,90 eingestellt mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; frischer Puffer nach jeweils 6 Läufen
- Trennungsspannung +20 kV
- Probeninjektion hydrodynamisch 10 s, danach Wasserinjektion 2 s, jeweils mit 0,5 psi Überdruck
- Probenvolumen 10  $\mu\text{L}$  in Kunststoff-Mikrovials, zur Vermeidung von Verdunstung mit ca. 10–15  $\mu\text{L}$  dünnflüssigem Paraffin überschichtet
- Spülen hydrodynamisch mit 20 psi Überdruck
- Konditionierung der Kapillare nach Einbau bzw. zu Beginn des Tages: 10 min 1 M-NaOH, danach 1 Lauf unter Trennbedingungen
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 3 min 0,1 M-NaOH, 5 min Puffer
- Spülen der Kapillare am Ende des Tages: 5 min Wasser, 5 min Stickstoff

#### 3.3.3.2 Interner Standard

Als interner Standard wurde kristallines  $\beta$ -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid in seiner oxidierten Form, kurz  $\text{NAD}^+$ , verwendet (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog-Nr. N-1511, Lot 129H7034).

Die Einwaage des internen Standards wurde um den angegebenen Wassergehalt und die Restlösemittel korrigiert.

Als Stammlösung wurde eine wässrige Lösung der Konzentration  $c = 752 \mu\text{g/mL}$  verwendet. Die Proben für die Kapillarelektrophorese wurden durch Mischen der entsprechenden  $\text{Ap}_3\text{A}$ -Lösungen mit der  $\text{NAD}^+$ -Stammlösung im Verhältnis 1+1 (V+V) hergestellt, d. h. die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration in den CE-Proben betrug 376  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.3.3.3 Bestimmte Dinukleotide

Als Dinukleotid wurde  $Ap_3A$  (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Katalog-Nr. D-1387) bestimmt. Alle anderen  $Ap_nA$  konnten zum Zeitpunkt der Validierung nicht in einer für exakte Wägungen ausreichenden Menge kommerziell erworben werden.

Die Einwaage des Dinukleotides wurde um den angegebenen Wassergehalt und die Restlösemittel korrigiert und auf den Gehalt an freier Säure ( $M_R$  756,4) zurückgerechnet.

Als Stammlösung wurde eine wässrige Lösung der Konzentration  $c = 10,0$  mg/mL verwendet. Alle bestimmten Konzentrationsstufen wurden durch Verdünnung aus dieser Stammlösung hergestellt. Die Proben für die Kapillarelektrophorese wurden durch Mischen der  $Ap_3A$ -Lösungen mit der  $NAD^+$ -Stammlösung im Verhältnis 1+1 (V+V) gewonnen. Alle nachfolgend angegebenen  $Ap_3A$ -Konzentrationen bezeichnen die finale Konzentration in der CE-Probe.

### 3.3.3.4 Kalibration

Die Kalibration erfolgte über einen Konzentrationsbereich von 2 bis 200  $\mu\text{g/mL}$  (entsprechend 2,6 bis 264,4  $\mu\text{mol/L}$ )  $Ap_3A$ . Dabei wurden folgende Konzentrationsstufen verwendet:

2,0	4,0	8,0	20,0	40,0	80,0	120,0	200,0	$\mu\text{g/mL}$ (freie Säure)
2,6	5,3	10,6	26,4	52,9	105,8	158,6	264,4	$\mu\text{mol/L}$

Jede Konzentrationsstufe wurde dabei dreimal vermessen. Die Auswertung erfolgte durch ungewichtete lineare Regression des Mittelwertes der Quotienten  $Q$  mit

$$Q = \frac{A_{\text{corr.}}(Ap_3A) \cdot c(IS) [\mu\text{g/mL}]}{A_{\text{corr.}}(IS)}$$

für jede Konzentrationsstufe als  $y$ -Wert und der  $Ap_3A$ -Konzentration in  $\mu\text{mol/L}$  als  $x$ -Wert. Dabei ergab sich folgende Regressionsgerade:

$$y = 0,9348 x - 0,2432; \quad r = 0,99974$$

Die experimentellen Daten der Kalibrationsläufe sind in Tab. E-3.21 bis Tab. E-3.24 zusammengefasst.

Tab. E-3.21 Experimentelle Daten der Kalibrationsläufe

<b>c Ap<sub>3</sub>A</b> <b>(x)</b>	<b>c</b> <b>IS</b>	<b>t<sub>m</sub></b> <b>EOF</b>	<b>t<sub>m</sub></b> <b>IS</b>	<b>μ<sub>eff</sub></b> <b>IS</b>	<b>A<sub>corr</sub></b> <b>IS</b>	<b>t<sub>m</sub></b> <b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>μ<sub>eff</sub></b> <b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>A<sub>corr</sub></b> <b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Quotient</b> <b>Q</b> <b>(y)</b>
μmol L <sup>-1</sup>	μg mL <sup>-1</sup>	min	min	cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	mAU cm	min	cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	mAU cm	
2,6	376,0	7,09	9,23	-0,1092	8,98895	15,78	-0,2599	0,04782	2,00019
2,6	376,0	7,15	9,33	-0,1098	8,85476	16,05	-0,2601	0,05548	2,35568
2,6	376,0	7,20	9,37	-0,1079	8,30594	16,16	-0,2582	0,04791	2,16865
5,3	376,0	7,16	9,34	-0,1089	9,42247	16,15	-0,2601	0,12824	5,11729
5,3	376,0	7,09	9,24	-0,1098	8,40774	15,81	-0,2604	0,11546	5,16323
5,3	376,0	7,18	9,36	-0,1086	8,51452	16,09	-0,2585	0,11750	5,18874
10,6	376,0	7,14	9,29	-0,1084	8,80699	15,96	-0,2590	0,21895	9,34780
10,6	376,0	7,08	9,22	-0,1097	9,26496	15,75	-0,2605	0,23923	9,70855
10,6	376,0	7,12	9,27	-0,1089	8,80813	15,87	-0,2594	0,23048	9,83848
26,4	376,0	7,12	9,24	-0,1077	8,97566	15,81	-0,2584	0,52866	22,1462
26,4	376,0	7,13	9,24	-0,1076	8,78417	15,85	-0,2586	0,53615	22,9493
26,4	376,0	7,13	9,28	-0,1085	8,98928	15,95	-0,2596	0,57576	24,0825
52,9	376,0	7,10	9,23	-0,1090	8,57557	15,80	-0,2599	1,02033	44,7368
52,9	376,0				keine Injektion				
52,9	376,0	7,13	9,28	-0,1090	8,25092	15,96	-0,2601	1,08736	49,5518
105,8	376,0	7,21	9,42	-0,1089	8,68874	16,40	-0,2603	2,20294	95,3307
105,8	376,0	7,12	9,26	-0,1090	9,13792	15,96	-0,2610	2,45458	100,999
105,8	376,0	7,16	9,34	-0,1088	7,53889	16,18	-0,2606	2,26820	113,126
158,6	376,0	7,12	9,29	-0,1100	8,72337	16,07	-0,2623	3,24281	139,773
158,6	376,0	7,15	9,30	-0,1085	8,98675	16,13	-0,2609	3,63203	151,962
158,6	376,0	7,12	9,29	-0,1100	7,72818	16,04	-0,2620	3,10431	151,034
264,4	376,0	7,10	9,22	-0,1081	9,15986	15,92	-0,2611	5,92881	243,370
264,4	376,0	7,12	9,31	-0,1103	8,64216	16,18	-0,2631	5,60149	243,708
264,4	376,0	7,11	9,27	-0,1094	8,64630	16,03	-0,2619	5,76605	250,747

Tab. E-3.22 Residuen der Kalibration

<b>c Ap<sub>3</sub>A in μmol L<sup>-1</sup></b>	<b>MW Quotient Q gefunden</b>	<b>Quotient Q berechnet</b>	<b>Residue in % (y<sub>MW</sub>/y<sup>^</sup> - 1) * 100 %</b>
<i>x</i>	<i>y<sub>MW</sub></i>	<i>y<sup>^</sup></i>	
2,64	2,175	2,229	-2,42
5,29	5,156	4,700	9,70
10,58	9,632	9,644	-0,12
26,44	23,06	24,47	-5,76
52,88	47,14	49,19	-4,11
105,76	103,2	98,63	4,63
158,65	147,6	148,1	-0,34
264,41	245,9	246,9	-0,41

Tab. E-3.23 Response Factors

<b>x</b>	<b>y<sub>MW</sub></b>	<b>Response Factor</b>
		<i>y<sub>MW</sub>/x</i>
2,64	2,175	0,824
5,29	5,156	0,975
10,58	9,632	0,910
26,44	23,06	0,872
52,88	47,14	0,891
105,76	103,2	0,976
158,65	147,6	0,930
264,41	245,9	0,930

Tab. E-3.24 Konstanz der Migrationszeiten und effektiven Mobilitäten

	<b>t<sub>m</sub> EOF</b> min	<b>t<sub>m</sub> IS</b> min	<b>μ<sub>eff</sub> IS</b> cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	<b>t<sub>m</sub> Ap<sub>3</sub>A</b> min	<b>μ<sub>eff</sub> Ap<sub>3</sub>A</b> cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
MW	7,13	9,29	-0,1090	16,00	-0,2603
SDV	0,03	0,05	7,53*10 <sup>-4</sup>	0,162	1,29*10 <sup>-3</sup>
relSDV	0,46 %	0,57 %	0,69 %	1,02 %	0,49 %

### 3.3.3.5 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit wurden fünf Konzentrationsstufen an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils sechsmal analysiert. Die Probenlösungen wurden dabei an jedem Tag neu aus der bereits für die Kalibration verwendeten Stocklösung der Konzentration  $c = 10,0 \text{ mg/mL}$  hergestellt.

Die experimentellen Daten sind in Tab. E-3.25 und Tab. E-3.26 zusammengefasst.

**Tab. E-3.25 Experimentelle Daten zur Bestimmung von Präzision und Richtigkeit**

<b>Sollwert <math>\text{Ap}_3\text{A}</math>-Konzentration</b>					
in $\mu\text{g/mL}$	2,00	4,00	20,00	100,0	160,0
in $\mu\text{mol/L}$	2,64	5,29	26,44	132,2	211,5
<b>Tag 1</b>	$n = 6$				
Minimum Quotient Q	1,9961	4,2444	22,687	115,26	187,00
Maximum Quotient Q	2,6467	4,8812	25,485	139,08	217,21
MW Quotient Q	2,2988	4,5814	23,869	125,26	203,71
SDV Quotient Q	0,2121	0,2710	1,145	8,24	12,88
relSDV Quotient Q	9,22 %	5,92 %	4,80 %	6,58 %	6,32 %
$c(\text{Ap}_3\text{A})$ berechnet (in $\mu\text{mol/L}$ )	2,72	5,16	25,79	134,25	218,17
Abweichung ist - soll	+2,84 %	-2,40 %	-2,45 %	+1,55 %	+3,14 %
<b>Tag 2</b>	$n = 6$				
Minimum Quotient Q	1,8969	4,3388	23,288	120,92	187,09
Maximum Quotient Q	2,3987	4,9523	25,596	145,15	194,05
MW Quotient Q	2,1657	4,5792	24,189	130,90	190,54
SDV Quotient Q	0,2103	0,2262	1,0173	10,062	2,32
relSDV Quotient Q	9,71 %	4,94 %	4,21 %	7,69 %	1,22 %
$c(\text{Ap}_3\text{A})$ berechnet (in $\mu\text{mol/L}$ )	2,58	5,16	26,14	140,29	204,09
Abweichung ist - soll	-2,54 %	-2,45 %	-1,15 %	+6,12 %	-3,52 %

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

<b>Sollwert Ap<sub>3</sub>A-Konzentration</b>					
in µg/mL	2,00	4,00	20,00	100,0	160,0
in µmol/L	2,64	5,29	26,44	132,2	211,5
<b>Tag 3</b>	<i>n</i> = 6				
Minimum Quotient Q	2,0402	3,9833	22,376	113,34	190,33
Maximum Quotient Q	2,3446	5,1930	26,037	120,07	196,27
MW Quotient Q	2,1622	4,6108	24,122	116,36	192,87
SDV Quotient Q	0,1218	0,4183	1,333	3,59	2,1118
relSDV Quotient Q	5,63 %	9,07 %	5,53 %	3,09 %	1,09 %
c(Ap <sub>3</sub> A) berechnet (in µmol/L)	2,57	5,19	26,06	124,74	206,58
Abweichung ist - soll	-2,68 %	-1,81 %	-1,43 %	-5,65 %	-2,34 %
<b>Tag 1–3</b>	<i>n</i> = 18				
MW Quotient Q	2,2545	4,5807	23,975	127,14	199,32
SDV Quotient Q	0,2089	0,2414	1,048	8,97	11,83
relSDV Quotient Q	9,27 %	5,27 %	4,37 %	6,91 %	5,94 %
c(Ap <sub>3</sub> A) berechnet (in µmol/L)	2,67	5,16	25,91	136,27	213,48
Abweichung ist - soll	+1,05 %	-2,42 %	-2,02 %	+3,07 %	+0,92 %

Tab. E-3.26 Konstanz der Migrationszeiten und effektiven Mobilitäten

	$t_m$ EOF	$t_m$ IS	$\mu_{eff}$ IS	$t_m$ Ap <sub>3</sub> A	$\mu_{eff}$ Ap <sub>3</sub> A
	min	min	cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	min	cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
<b>Tag 1</b>	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 30
Minimum	6,96	9,07	-0,1125	15,30	-0,2631
Maximum	7,22	9,46	-0,1068	16,49	-0,2587
MW	7,12	9,29	-0,1099	15,99	-0,2610
SDV	0,06	0,09	1,107*10 <sup>-3</sup>	0,28	1,078*10 <sup>-3</sup>
relSDV	0,91 %	1,01 %	1,01 %	1,74 %	0,41 %

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

	$t_m$ EOF min	$t_m$ IS min	$\mu_{\text{eff}}$ IS $\text{cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$t_m$ Ap <sub>3</sub> A min	$\mu_{\text{eff}}$ Ap <sub>3</sub> A $\text{cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ s}^{-1}$
<b>Tag 2</b>	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$
Minimum	6,77	8,73	-0,1121	14,30	-0,2628
Maximum	7,41	9,86	-0,1063	17,67	-0,2558
MW	7,20	9,42	-0,1095	16,32	-0,2598
SDV	0,14	0,23	$1,425 \cdot 10^{-3}$	0,66	$2,334 \cdot 10^{-3}$
relSDV	1,94 %	2,47 %	1,30 %	4,06 %	0,90 %
<b>Tag 3</b>	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$	$n = 30$
Minimum	6,86	8,85	-0,1121	14,60	-0,2620
Maximum	7,31	9,64	-0,1077	16,93	-0,2572
MW	7,14	9,32	-0,1099	16,02	-0,2610
SDV	0,13	0,23	$1,121 \cdot 10^{-3}$	0,70	$1,078 \cdot 10^{-3}$
relSDV	1,87 %	2,42 %	1,02 %	4,35 %	0,45 %
<b>Tag 1–3</b>	$n = 90$	$n = 90$	$n = 90$	$n = 90$	$n = 90$
MW	7,15	9,34	-0,1098	16,11	-0,2603
SDV	0,12	0,19	$1,229 \cdot 10^{-3}$	0,57	$1,703 \cdot 10^{-3}$
relSDV	1,65 %	2,07 %	1,12 %	3,51 %	0,65 %

### 3.4 Einsatz von Magnesium-Ionen als Komplexbildner

#### 3.4.1 Carbonatpuffer

**Tab. E-3.27 Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf die effektive Mobilität im Ammoniumcarbonat-Puffer pH 9,5**

$c Mg^{2+}$ $\mu mol L^{-1}$	$\mu_{EOF}$	$\mu_{eff}$ in $cm^2 kV^{-1} s^{-1}$						
		Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A	Ap <sub>7</sub> A	Ap <sub>8</sub> A
0	0,464	-0,201	-0,259	-0,280	-0,286	-0,291	-0,291	-0,297
effektive Mobilitäten ohne $Mg^{2+}$ -Zusatz = 100 %								
1	102,6 %	99,9 %	99,9 %	100,1 %	100,4 %	100,8 %	100,6 %	100,4 %
2,5	101,0 %	100,2 %	100,2 %	100,4 %	100,6 %	100,9 %	100,9 %	100,6 %
5	100,2 %	99,9 %	100,0 %	100,0 %	100,1 %	99,9 %	100,3 %	100,3 %
10	100,3 %	100,5 %	100,4 %	100,2 %	99,9 %	99,5 %	100,1 %	100,3 %
15	100,2 %	100,3 %	100,3 %	99,8 %	99,2 %	98,6 %	99,6 %	100,0 %
20	99,4 %	99,8 %	99,7 %	99,1 %	98,2 %	97,6 %	98,8 %	99,4 %
25	99,8 %	100,5 %	100,4 %	99,3 %	97,7 %	97,0 %	98,8 %	99,6 %

Bedingungen: Puffer  $(NH_4)_2CO_3$  50 mmol/L, pH 9,5 eingestellt mit 25 %  $NH_4OH$ , Kapillare 60/67 cm, Spannung +20 kV, Injektion 10 s, Spülen zwischen den Läufen 3 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer; Eintauchen der Kapillare in separates Wasservial vor jedem Injektionsvorgang

**Tab. E-3.28 Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf die Auflösung**

$c Mg^{2+}$ $\mu mol L^{-1}$	$R$			
	Ap <sub>4</sub> A / Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>5</sub> A / Ap <sub>6</sub> A	Ap <sub>6</sub> A / Ap <sub>7</sub> A	Ap <sub>7</sub> A / Ap <sub>8</sub> A
0	3,32	1,90	0	1,91
1,0	3,97	2,30	0	1,62
2,5	3,93	2,34	0,23	2,52
5,0	3,59	1,91	0,66	2,72
10	2,80	1,50	1,00	3,12
15	2,29	1,48	1,58	3,49
20	1,87	1,34	2,00	3,81
25	0,82	1,23	2,81	4,06

Bedingungen: s. Tab. E-3.27

## 3.4.2 Citratpuffer

Tab. E-3.29 Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Konzentration auf die scheinbare Mobilität

$c Mg^{2+}$ mmol L <sup>-1</sup>	$\mu_{app}$ in cm <sup>2</sup> kV <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>						
	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A	Ap <sub>7</sub> A	Ap <sub>8</sub> A
0	n. b.	n. b.	n. b.	-0,282	-0,288	-0,288	-0,290
0,01	n. b.	n. b.	n. b.	-0,277	-0,283	-0,283	-0,286
0,02	n. b.	n. b.	n. b.	-0,278	-0,284	-0,284	-0,287
0,05	n. b.	n. b.	n. b.	-0,277	-0,283	-0,283	-0,287
0,10	n. b.	n. b.	n. b.	-0,281	-0,283	-0,285	-0,290
0,25	-0,199	-0,257	-0,269	-0,278	-0,280	-0,283	-0,289
0,50	-0,200	-0,258	-0,276	-0,273	-0,275	-0,282	-0,289
1,0	-0,199	-0,256	-0,267	-0,264	-0,269	-0,281	-0,289
1,5	-0,196	-0,254	-0,264	-0,259	-0,266	-0,279	-0,287
2,0	-0,199	-0,257	-0,263	-0,258	-0,268	-0,283	-0,291
3,0	-0,200	-0,256	-0,256	-0,248	-0,263	-0,279	-0,286
4,0	-0,200	-0,253	-0,248	-0,243	-0,261	-0,277	-0,283
5,0	-0,197	-0,248	-0,234	-0,234	-0,253	-0,268	-0,274
6,0	-0,197	-0,245	-0,229	-0,229	-0,250	-0,267	-0,269
7,0	-0,192	-0,237	-0,217	-0,226	-0,248	-0,263	-0,265
8,0	-0,197	-0,239	-0,216	-0,223	-0,246	-0,259	-0,261
9,0	-0,196	-0,235	-0,209	-0,219	-0,242	-0,252	-0,255
10,0	-0,196	-0,232	-0,205	-0,216	-0,239	-0,248	-0,252
10,5	-0,195	-0,230	-0,202	-0,214	-0,236	-0,246	-0,248

Bedingungen: Puffer Citronensäure 50 mmol/L, pH 5,25 eingestellt mit 5 M-NaOH, Kapillare 20/27 cm, Spannung -11,5 kV, Injektion 2 s, Spülen zwischen den Läufen 2 min Puffer; Eintauchen der Kapillare in separates Wasservial vor jedem Injektionsvorgang

### 3.5 Versuche zur Empfindlichkeitserhöhung

Die Versuche zum *large volume sample stacking* wurden unter anderen Bedingungen durchgeführt als in Kapitel 1.4.4 des experimentellen Teils beschrieben:

- P/ACE System MDQ mit DAD-Detektor, Wellenlänge 254 nm, Einstellung *high sensitivity, peak width* 16–25
- Kapillare fused-silica 50  $\mu\text{m}$  ID, 50 cm effektive Länge, 60 cm Gesamtlänge, Apertur der Kapillarkartusche 100\*800  $\mu\text{m}$ , Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH 9,50 eingestellt mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$
- Trennungsspannung +17,9 kV
- Probeninjektion hydrodynamisch
- Probenvolumen 50  $\mu\text{L}$  in Kunststoff-Mikrovials mit 100  $\mu\text{L}$  Fassungsvermögen
- Spülen hydrodynamisch mit 20 psi Überdruck
- Konditionierung der Kapillare nach Einbau bzw. zu Beginn des Tages: 10 min 1 M-NaOH
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 3 min 0,1 M-NaOH, 5 min Puffer
- Spülen der Kapillare am Ende des Tages: 5 min Wasser, 5 min Stickstoff

**Zusätzliche Bedingungen bei der Aufnahme der Elektropherogramme in Abb. 3.41 A des theoretischen Teils:**

Probeninjektion 10 s \* 0,5 psi

Trennleistungen:

<b><i>N Ap<sub>2</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>3</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>4</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>5</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>6</sub>A</i></b>
197 800	202 900	139 300	182 300	104 000

**Zusätzliche Bedingungen bei der Aufnahme des Elektropherogramms in Abb.****3.41 B des theoretischen Teils:**

- Probeninjektion 3,25 min mit 4 psi (entspricht mehr als einem vollen Kapillarvolumen)
- Stacking 3,35 min mit -17,9 kV (erreichter Strom ca. 97–99 % des Wertes der anschließenden Elektrolyse), Inlet = Waste, Outlet = Trennpuffer
- anschließend normale Elektrophorese mit +17,9 kV

Trennleistungen:

<b><i>N Ap<sub>2</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>3</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>4</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>5</sub>A</i></b>	<b><i>N Ap<sub>6</sub>A</i></b>
136 100	99 900	49 700	84 000	54 400

---

## 4 Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in humanen Thrombozyten

### 4.1 Isolierung der Dinukleotide aus der Probenmatrix

#### 4.1.1 Gewinnung der Blutplättchen

Um eine Aktivierung der Blutplättchen weitestgehend zu vermeiden, wurden zur Isolierung der Thrombozyten aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien ausschließlich Plastikgefäße und weitlumige Plastik-Pasteurpipetten verwendet. Außerdem wurde versucht, den Scherstress beim Dekantieren und Pipettieren durch langsames Arbeiten so gering wie möglich zu halten. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

##### 4.1.1.1 Thrombozytenkonzentrate

Verwendet wurden Thrombozytenkonzentrate aus der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Münster, die für eine Transfusion wegen Ablauf der Haltbarkeitsdauer nicht mehr verwendet werden konnten. Diese Konzentrate enthielten  $2-4 \cdot 10^{11}$  Thrombozyten in etwa 225 mL stabilisiertem Plasma.

Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte dabei in folgenden Schritten:

- Thrombozytenkonzentrat auf Zentrifugengefäße verteilen
- Zentrifugieren bei 2500 g für 10 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen
- (vorsichtiges) Resuspendieren der Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % (m/V)), Zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen;  
Vorgang wiederholen
- Poolen der einzelnen Thrombozytenpellets und Einfrieren bei -30 °C für mind. 12 h

#### 4.1.1.2 *Buffy-Coats*

Verwendet wurden ca. 24 h alte *Buffy-Coats* aus der Blutspendezentrale des Deutschen Roten Kreuzes in Münster nach Abschluss der Untersuchungen auf Krankheitserreger.

Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte dabei in folgenden Schritten:

- *Buffy-Coat* (ca. 40 mL) auf zwei 25-mL-Falcon<sup>®</sup>-Vials verteilen
- Zentrifugieren bei 2000 g für 2 min / 20 °C, Überstand mit Pipette abnehmen
- zum Bodensatz je Falcon<sup>®</sup>-Vial 10 mL PBS-Puffer (PBS = *phosphate buffered saline*, Standardrezeptur) geben, Zentrifugieren bei 2000 g für 2 min / 20 °C, Überstand mit Pipette abnehmen
- Überstände vereinigen und zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen
- (vorsichtiges) Resuspendieren der Thrombozyten in EDTA-PBS-Puffer (112 mg Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O + 3 mL Wasser, PBS-Puffer ad 100 mL), Zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen; Vorgang wiederholen
- Einfrieren des Thrombozytenpellets bei -30 °C für mind. 12 h

#### 4.1.1.3 **Humanes Vollblut**

Für die Durchführung dieser Untersuchungen standen Vollblutproben von freiwilligen Probanden aus Münster und Berlin zur Verfügung. Soweit nicht anders angegeben betrug das Volumen einer Vollblutprobe 20 mL.

Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte dabei in folgenden Schritten:

- Abnahme des Blutes in EDTA- oder Heparin-Monovetten<sup>®</sup>
- Zentrifugieren der Monovetten bei 200 g für 10 min / 20 °C, Überstand mit Pipette abnehmen; Vorgang wiederholen
- Überstände vereinigen und zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen
- (vorsichtiges) Resuspendieren der Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % (*m/V*)), Zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 20 °C, Überstand abdekantieren und verwerfen; Vorgang wiederholen
- Einfrieren des Thrombozytenpellets bei -30 °C für mind. 12 h

### 4.1.2 Freisetzung der Zellbestandteile und Proteinfällung

Alle hier beschriebenen Vorgänge wurden zur Vermeidung eines enzymatischen Abbaus oder einer Zersetzung der Dinukleotide auf Eis durchgeführt.

- Thrombozytenpellet mit 1 mL Wasser (bei Aufarbeitung von *Buffy-Coats* oder Thrombozytenkonzentraten evtl. mehr) versetzen, auftauen lassen und mit Eppendorf-Pipette gründlich (!) resuspendieren
- Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  eisgekühlter Perchlorsäure 70 % je mL Thrombozyten-Suspension (Endkonzentration ca. 1 mol/L), vortexen
- Zentrifugieren bei 2500 g für 5 min / 4 °C
- Überstand abnehmen, mit ca. 250  $\mu\text{L}$  eisgekühlter 5 M-KOH je 100  $\mu\text{L}$  Perchlorsäurezusatz versetzen, vortexen, pH-Wert überprüfen ( $\geq 8$ ), sonst noch 5 M-KOH zugeben
- 30–40 min bei 4 °C im Kühlschrank stehen lassen
- Zentrifugieren bei 4000 g für 5 min / 4°C
- Überstand abnehmen, Volumen bestimmen
- 220  $\mu\text{L}$  5,5-molarer Ammoniumacetat-Lösung je mL Probenvolumen + weitere 45  $\mu\text{L}$  für späteren Zusatz von ca. 200  $\mu\text{L}$  Säure / Base bei pH-Einstellung zugeben (finale Ammoniumacetat-Konzentration 1,0 mol/L)
- pH-Wert mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  bzw. verd. Essigsäure auf 9,4 - 9,6 einstellen (sollten deutlich mehr als 200  $\mu\text{L}$  Säure bzw. Base zur pH-Einstellung verbraucht worden sein, nochmals 0,2  $\mu\text{L}$  5,5-molare Ammoniumacetat-Lösung je  $\mu\text{L}$  Mehrverbrauch zugeben, um die finale Ammoniumacetat-Konzentration bei 1,0 mol/L zu halten)
- bis zur Chromatographie einfrieren

### 4.1.3 Selektive Aufkonzentrierung der Dinukleotide

Säule:	Kationenaustauscher BioRex 70, derivatisiert mit <i>m</i> -Aminophenylboronsäure nach Literatur <sup>61</sup> Dimension des Säulenbetts 5 * 40 mm
Eluenten:	A) Ammoniumacetat, $c = 1,0$ mol/L, pH 9,5 B) HCl, $c = 1$ mmol/L
Fluss:	0,5 mL/min
Probenschleife:	2,5 mL Edelstahl
Detektion:	UV 254 nm; Leitfähigkeit

#### Durchführung

- Säule mit Eluent A äquilibrieren
- Probe injizieren (max. Injektionsvolumen 1,5–2 mL, sonst auf mehrere Läufe verteilen)
- Warten bis UV-Absorption wieder +/- Null (ca. 20–25 min)
- Elution der Analyten mit Eluent B
- UV-aktive Fraktion auffangen
- Säule nach Gebrauch gründlich mit Wasser sowie einer 0,05%igen Na-Azid-Lösung spülen und bei 4 °C lagern

#### Herstellung der 1 mol/L-Ammoniumacetat-Lösung pH 9,5

77,1 g Ammoniumacetat werden in 800 mL Wasser gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 9,5 mit konz. Ammoniak wird mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

### 4.1.4 Entsalzung und Trocknung

Säule:	LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 4 * 250 mm
Eluenten:	A) TEAA, $c = 40$ mmol/L, pH 6,5 B) Acetonitril
Fluss:	0,75 mL/min
Probenschleife:	5 mL PEEK
Detektion:	UV 254 nm; Leitfähigkeit

### Durchführung

- Säule 20–30 min mit Eluent A äquilibrieren
- Eluat der Affinitätschromatographie (Kap. 4.1.3) mit 1 mol/L-TEAA pH 6,5 auf eine finale TEAA-Konzentration von mindestens 40 mmol/L bringen und pH-Wert auf 6,5 einstellen
- Probe injizieren (max. Injektionsvolumen 3–4 mL, sonst auf mehrere Injektionen verteilen)
- nach Injektion der gesamten Probe warten bis die Leitfähigkeit wieder auf den Normalwert von etwa 2200  $\mu\text{S}$  gesunken ist
- Elution der Analyten mit 30 % Eluent B
- UV-aktive Fraktion auffangen in Eppendorf-Gefäßen (max. 1 mL/Gefäß)
- Säule nach jeder Injektion 5 min mit 100 % Eluent B spülen
- Eluat über Nacht in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockne einengen; falls weißer Salzrückstand sichtbar, nochmals mit ca. 500  $\mu\text{L}$  Wasser aufnehmen und erneut zur Trockne einengen

### Herstellung der 1 mol/L-Triethylammoniumacetat (TEAA)-Lösung pH 6,5

Unter starkem Rühren werden 70 mL TEA und 30 mL Eisessig zu 200 mL Wasser gegeben. Nach Erkalten der Lösung wird der pH-Wert mit Eisessig bzw. TEA auf 6,5 eingestellt und mit Wasser auf 500 mL aufgefüllt.

### Herstellung der 40 mmol/L-Triethylammoniumacetat (TEAA)-Lösung pH 6,5

40 mL 1 mol/L-TEAA pH 6,5 werden mit bidestilliertem Wasser zu einem Liter verdünnt.

## 4.2 Untersuchung von Thrombozytenkonzentraten und *Buffy-Coats*

### 4.2.1 Kapillarelektrophoretische Bedingungen

- P/ACE System 2050 mit P/ACE UV-Detektor, Filterwellenlänge 254 nm, Datenrate 5 Hz, *rise time* des Detektors 0,5 s, *detector range* 0,030; bei Aufnahme der Online-DAD-Spektren P/ACE System 5510 mit P/ACE DAD-Detektor
- Kapillare fused-silica 50  $\mu\text{m}$  ID, 60 cm effektive Länge, 67 cm Gesamtlänge, Apertur der Kapillarkartusche 100\*800  $\mu\text{m}$ , Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH eingestellt mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$
- Trennungsspannung +20 kV
- Probeninjektion hydrodynamisch 10 s, danach Wasserinjektion 2 s, jeweils mit 0,5 psi Überdruck
- Probenvolumen 8–10  $\mu\text{L}$  in Kunststoff-Mikrovials, zur Vermeidung von Verdunstung mit ca. 10–15  $\mu\text{L}$  dünnflüssigem Paraffin überschichtet
- Spülen hydrodynamisch mit 20 psi Überdruck
- Konditionierung der Kapillare nach Einbau bzw. zu Beginn des Tages: 10 min 1 M-NaOH, danach 1 Lauf unter Trennbedingungen
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 3 min 0,1 M-NaOH, 5 min Puffer
- Spülen der Kapillare am Ende des Tages: 5 min Wasser, 5 min Stickstoff

## 4.2.2 Bedingungen für MALDI-TOF-Massenspektrometrie

- Matrix: 5 % 3-Hydroxypicolinsäure in Wasser bzw. Acetonitril/Wasser 1+1 (V+V)
- Probenvorbereitung: 0,5 µL Probenlösung + 0,5 µL Matrix auf die Probenplatte pipettieren und mischen, einige wenige Körnchen Kationenaustauscher in der H<sup>+</sup>-Form dazugeben und im Kaltluftstrom trocknen, anschließend Kationenaustauscher im Kaltluftstrom entfernen
- Anregung der Analyten durch einen Stickstoff-Laser (Anregungswellenlänge 337 nm, Pulsdauer 3 ns)
- Aufnahme der Spektren im Positiv-Ionen-Modus unter Einsatz des Reflektors; zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden mehrere Spektren akkumuliert
- Kalibration des Massenspektrometers durch ein Gemisch der Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A als externer Standard

## 4.3 Bestimmung aus humanem Vollblut

### 4.3.1 Interner Standard

#### 4.3.1.1 NAD<sup>+</sup>

**Tab. E-4.1 Korrigierte Peakflächen für die Wiederfindung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A aus wässriger Lösung bei Verwendung von NAD<sup>+</sup> als internem Standard**

	NAD <sup>+</sup>	Abbau 1	Abbau 2	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
Ref.	8,184	< LOD	< LOD	1,783	2,844	3,386	2,264	2,033
WF 1	11,868	0,371	0,661	3,892	5,224	5,877	3,743	2,984
WF 2	9,966	0,406	0,670	3,388	5,169	5,842	3,804	3,231
WF 3	11,110	0,397	0,791	3,764	5,848	6,636	4,352	3,568

CE-Bedingungen: pH 9,90, sonst wie in Kap. 4.2.1 beschrieben

Proben: Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A jeweils ca. 6 nmol, NAD<sup>+</sup> 20 µg, wässrige Lösung  
 Probenvolumen 20 µL bei Wiederfindung (WF) 1–3, 50 µL bei Referenz

Ablauf: Perchlorsäurefällung, KClO<sub>4</sub>-Fällung, Affinitätschromatographie, Entsalzung wie in den Kapiteln 4.1.2 bis 4.1.4 beschrieben  
 Zugabe von NAD<sup>+</sup> unmittelbar vor der Affinitätschromatographie

### 4.3.1.2 $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A

#### Synthese

Eine Mischung aus 400  $\mu$ L Chloracetaldehyd-Lösung 50 % (entsprechend etwa 8 mmol Chloracetaldehyd) und 20 mL Wasser wurde mit Natronlauge auf pH 4,5 eingestellt. Nach Zugabe von 2 mg (entsprechend 3  $\mu$ mol) Ap<sub>2</sub>A wurde das Reaktionsgemisch in einem Dreihalskolben 16 Stunden im Wasserbad bei 50 °C gerührt.

In regelmäßigen Abständen wurden mit einer Eppendorfpipette ca. 20  $\mu$ L des Reaktionsgemisches entnommen und direkt kapillarelektrophoretisch untersucht (Bedingungen wie in Kap. 4.2.1, pH 9,90).

#### Aufreinigung

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1,25 mL 1 M-Triethylammoniumacetat-Lösung pH 6,5 versetzt und wie in Kap. 4.1.4 beschrieben mittels RP-HPLC entsalzt. Abweichend von den dort angegebenen Bedingungen wurde eine HPLC-Säule mit den Abmessungen 250\*7 mm bei einem Fluss von 1,5 mL/min verwendet. Die Injektionsvolumina betragen ca. 3 mL (5-mL-Probenschleife). Die UV-aktiven Fraktionen wurden in Eppendorf-Gefäßen in Aliquots zu 1 mL aufgefangen (insgesamt 55 Stück) und in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockne eingengt. Der Rückstand war von braun-roter, leicht öliger Konsistenz.

#### Identitäts- und Reinheitsprüfung

Zur Identitäts- und Reinheitsprüfung wurde ein Synthese-Aliquot in 20  $\mu$ L Wasser gelöst und mittels MALDI-TOF-MS und Kapillarelektrophorese untersucht.

Das MALDI-TOF-Massenspektrum zeigte nur auf  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A zurückzuführende Signale, nämlich  $m/z$  725 ( $[M+H]^+$ ),  $m/z$  1449 ( $[2M+H]^+$ ) sowie die entsprechenden Natriumaddukte im Abstand von 22 Masseneinheiten.

Das Elektropherogramm ist in Abb. 4.14 des theoretischen Teils dargestellt (pH 9,9, sonstige Bedingungen wie in Kap. 4.2.1). Im Migrationszeitbereich der Mono- und Dinukleotide konnten keine Neben- oder Abbauprodukte detektiert werden; auch war keine Verunreinigung mit dem Edukt Ap<sub>2</sub>A nachweisbar. Die einzige detektierbare Verunreinigung migrierte kurz vor  $\epsilon$ -Ap<sub>2</sub>A, war von diesem gut abgetrennt und betrug nur wenige Flächen-%.

Wiederfindung**Tab. E-4.2** Korrigierte Peakflächen für die Wiederfindung von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A aus wässriger Lösung bei Verwendung von ε-Ap<sub>2</sub>A als internem Standard

	ε-Ap <sub>2</sub> A	Abbau 1	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
Ref.	1,860	0,096	0,997	2,340	2,521	1,313	1,659
WF 1	3,612	0,639	2,039	4,764	5,067	2,556	3,019
WF 2	3,799	0,508	2,177	5,090	5,345	2,683	3,121
WF 3	3,833	0,462	2,129	4,965	5,261	2,689	3,223

CE-Bedingungen: pH 9,90, sonst wie in Kap. 4.2.1 beschrieben

Proben: Ap<sub>2</sub>A–Ap<sub>6</sub>A jeweils ca. 6 nmol, ε-Ap<sub>2</sub>A, wässrige Lösung  
 Probenvolumen 20 µL bei Wiederfindung (WF) 1–3, 50 µL bei Referenz

Ablauf: Perchlorsäurefällung, KClO<sub>4</sub>-Fällung, Affinitätschromatographie, Entsalzung wie in den Kapiteln 4.1.2 bis 4.1.4 beschrieben  
 Zugabe von ε-Ap<sub>2</sub>A vor der Perchlorsäurefällung

Gehaltseinstellung

30 Synthese-Aliquots wurden in insgesamt 1300 µL Wasser aufgenommen. Nach Abzentrifugieren des unlöslichen Niederschlags wurde eine klare, rötlich-braune Lösung erhalten.

Zur Gehaltsbestimmung wurde wie folgt verfahren:

- 20 µL ε-Ap<sub>2</sub>A-Lösung im Eppendorf-Gefäß mit Stickstoff zur Trockne abblasen
- Rückstand in 20 µL NAD<sup>+</sup>-Lösung,  $c = 500 \mu\text{g/mL}$ , aufnehmen
- Kapillarelektrophorese bei pH 9,90 (restliche Bedingungen wie in Kap. 4.2.1 beschrieben)
- Berechnung des Gehaltes als Ap<sub>2</sub>A (in µmol/L) nach der Formel in Kap. 3.3.3 des theoretischen Teils

Die ε-Ap<sub>2</sub>A-Lösung wurde durch Verdünnen mit Wasser auf einen Gehalt von 227 µmol/L (berechnet als Ap<sub>2</sub>A) eingestellt und in dieser Form für die Bestimmung der Dinukleosidpolyphosphate in Humanthrombozyten verwendet.

## 4.3.2 Validierung

### 4.3.2.1 Selektivität

#### Affinitätschromatographie

Zur Bestimmung der Selektivität der Affinitätschromatographie wurden die in Abb. 4.11 des theoretischen Teils angegebenen Substanzen bzw. Substanzgemische, gelöst in 1 mol/L-Ammoniumacetat pH 9,5, nach dem in Kap. 4.1.3 beschriebenen Verfahren chromatographiert.

#### Kapillarelektrophorese

Bedingungen s. Kap. 4.2.1

### 4.3.2.2 Arbeitsbereich, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als Ausgangsmaterial dienten aus insgesamt 300 mL Vollblut gewonnene Thrombozyten. Unmittelbar nach dem Auftauen des Pellets und der Resuspendierung in Wasser wurden Aliquots entsprechend der Thrombozytenmenge aus 20 mL Vollblut entnommen und mit 30  $\mu$ L Dinukleosidpolyphosphat-Lösung (s.u.) bzw. 30  $\mu$ L Wasser für den Leerwert versetzt. Für jede Konzentrationsstufe wurden drei Aliquots separat aufgearbeitet und analysiert. Zur Vermeidung enzymatischer Hydrolyse wurden die Resuspendierung und die Aliquotierung unter Eiskühlung vorgenommen. Unmittelbar im Anschluß erfolgten die Perchlorsäurefällung und die weitere Probenaufarbeitung wie in den Kapiteln 4.1.2 bis 4.1.4 beschrieben.

Die zur Aufstockung der Plättchenproben eingesetzten Dinukleosidpolyphosphat-Lösungen enthielten  $Ap_2A$  bis  $Ap_6A$  in drei verschiedenen Konzentrationsstufen; zusätzlich wurde ein Leerwert ohne weitere Zugabe von Standardsubstanzen bestimmt. Die jeweils zugesetzten Mengen an Dinukleotiden wurden mit der in Kap. 3.3.3 beschriebenen Methode quantifiziert. Dazu wurden 30  $\mu$ L Standardlösung im Stickstoffstrom trockengeblasen, mit 20  $\mu$ L einer  $NAD^+$ -Lösung der Konzentration 500  $\mu$ g/mL aufgenommen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 des theoretischen Teils zusammengefasst.

Der interne Standard wurde erst unmittelbar vor der Affinitätschromatographie der Probenlösung hinzugefügt. Dazu wurden zu jeder Probe 20  $\mu$ L einer  $\epsilon$ - $Ap_2A$ -Lösung der Konzentration 227  $\mu$ mol/L, also 4,54 nmol  $\epsilon$ - $Ap_2A$  (jeweils berechnet als  $Ap_2A$ , vgl. Kap. 4.3.1.2) pipettiert.

Nach vollständiger Probenaufarbeitung wurde jede Probe mittels Kapillarelektrophorese unter den in Kap. 4.2.1 beschriebenen Bedingungen bei pH 9,80 und pH 10,35 vermessen und das Verhältnis der korrigierten Peakflächen von Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A zur korrigierten Peakfläche des internen Standards bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. E-4.4 und Tab. E-4.5 zusammengestellt. Für die weiteren Berechnungen wurden bei pH 9,80 die Daten für Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A und bei pH 10,35 die Daten für Ap<sub>2</sub>A und Ap<sub>6</sub>A verwendet. Aus den Mittelwerten jeder Konzentrationsstufe wurde mittels ungewichteter linearer Regression eine Kalibrationsgerade für jedes Dinukleotid berechnet. Die Steigung der Regressionsgeraden diente zur Bestimmung der Menge an Dinukleotiden in den späteren Blutproben; der y-Achsenabschnitt bleibt bei dem hier angewendeten Standardadditionsverfahren unberücksichtigt. Der Quotient aus y-Achsenabschnitt und Steigung lieferte die Menge an Dinukleotid in der Leerprobe. Die resultierenden Kalibrationsgeraden, die prozentualen Residuen und die Präzision der Messwerte für jede Konzentrationsstufe sind in Tab. 4.4 des theoretischen Teils zusammengefasst.

Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A können bei pH 10,35 ebenfalls selektiv bestimmt werden. Ein Vergleich der bei diesem pH-Wert in der Leerprobe bestimmten Dinukleotidmengen mit dem Ergebnis bei pH 9,80 ist in Tab. E-4.3 dargestellt.

**Tab. E-4.3 Vergleich der in der Leerprobe bei pH 9,80 und 10,35 bestimmten Dinukleotidmengen**

	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>
	nmol	nmol	nmol
pH 9,80	1,99	2,04	0,78
pH 10,35	1,94	1,94	0,76

**Tab. E-4.4 Experimentelle Daten der Kalibrationsläufe bei pH 9,80**  
(Werte zur Berechnung der Kalibrationsgeraden grau hinterlegt)

<i>Stufe</i>	$A_{\text{corr}} \text{Ap}_2\text{A} / A_{\text{corr}} \text{IS}$	$A_{\text{corr}} \text{Ap}_3\text{A} / A_{\text{corr}} \text{IS}$	$A_{\text{corr}} \text{Ap}_4\text{A} / A_{\text{corr}} \text{IS}$	$A_{\text{corr}} \text{Ap}_5\text{A} / A_{\text{corr}} \text{IS}$	$A_{\text{corr}} \text{Ap}_6\text{A} / A_{\text{corr}} \text{IS}$
<b>0</b>	0,04750	0,29576	0,26701	0,07781	0,03246
	0,03817	0,26853	0,24286	0,07079	0,02940
nicht auswertbar					
MW	0,04284	0,28214	0,25493	0,07430	0,03093
SDV	0,00660	0,01926	0,01708	0,00496	0,00216
relSDV	15,4 %	6,8 %	6,7 %	6,7 %	7,0 %
<b>1</b>	0,15728	0,33530	0,32117	0,12394	0,07058
	0,15333	0,33967	0,32124	0,12204	0,07240
	0,13001	0,29275	0,27970	0,11693	0,06565
MW	0,14688	0,32257	0,30737	0,12097	0,06954
SD	0,01474	0,02592	0,02396	0,00363	0,00349
relSDV	10,0 %	8,0 %	7,8 %	3,0 %	5,0 %
<b>2</b>	0,29772	0,46720	0,46266	0,24694	0,12949
	0,31442	0,49133	0,49739	0,28340	0,15498
nicht auswertbar					
MW	0,30607	0,47926	0,48002	0,26517	0,14223
SDV	0,01181	0,01706	0,02456	0,02579	0,01802
relSDV	3,9 %	3,6 %	5,1 %	9,7 %	12,7 %
<b>3</b>	1,14325	1,25564	1,29981	0,83681	0,42388
	1,13277	1,21936	1,27398	0,88918	0,47600
	1,10281	1,19974	1,20611	0,76340	0,36066
MW	1,12628	1,22491	1,25997	0,82980	0,42018
SDV	0,02099	0,02836	0,04840	0,06318	0,05776
relSDV	1,9 %	2,3 %	3,8 %	7,6 %	13,7 %

**Tab. E-4.5 Experimentelle Daten der Kalibrationsläufe bei pH 10,35**  
(Werte zur Berechnung der Kalibrationsgeraden grau hinterlegt)

<i>Stufe</i>	$A_{\text{corr}} \text{ Ap}_2\text{A} / A_{\text{corr}} \text{ IS}$	$A_{\text{corr}} \text{ Ap}_3\text{A} / A_{\text{corr}} \text{ IS}$	$A_{\text{corr}} \text{ Ap}_4\text{A} / A_{\text{corr}} \text{ IS}$	$A_{\text{corr}} \text{ Ap}_5\text{A} / A_{\text{corr}} \text{ IS}$	$A_{\text{corr}} \text{ Ap}_6\text{A} / A_{\text{corr}} \text{ IS}$
<b>0</b>	0,03374	0,27514	0,23495	0,07633	0,01435
	0,03369	0,27242	0,22867	0,07244	0,01294
	nicht auswertbar				
MW	0,03372	0,27378	0,23181	0,07439	0,01364
SDV	0,00003	0,00192	0,00444	0,00275	0,00099
relSDV	0,1 %	0,7 %	1,9 %	3,7 %	7,3 %
<b>1</b>	0,10555	0,32425	0,30332	0,12438	0,04809
	0,10231	0,32768	0,31808	0,11550	0,04829
	0,09117	0,28004	0,26698	0,12006	0,04127
MW	0,09968	0,31066	0,29613	0,11998	0,04589
SD	0,00755	0,02657	0,02630	0,00444	0,00400
relSDV	7,6 %	8,6 %	8,9 %	3,7 %	8,7 %
<b>2</b>	0,24996	0,44131	0,43418	0,23014	0,10839
	nicht auswertbar				
	0,27436	0,46581	0,47353	0,27911	0,13336
MW	0,26216	0,45356	0,45385	0,25462	0,12088
SDV	0,01725	0,01733	0,02782	0,03463	0,01766
relSDV	6,6 %	3,8 %	6,1 %	13,6 %	14,6 %
<b>3</b>	1,12379	1,23815	1,30363	0,85043	0,40510
	1,06738	1,17435	1,24485	0,85888	0,44696
	1,06161	1,16160	1,19698	0,74076	0,33366
MW	1,08426	1,19136	1,24849	0,81669	0,39524
SDV	0,03435	0,04101	0,05342	0,06589	0,05729
relSDV	3,2 %	3,4 %	4,3 %	8,1 %	14,5 %

### 4.3.2.3 Präzision

Die Präzision wurde untersucht durch die getrennte Aufarbeitung und Bestimmung des Dinukleotidgehaltes von fünf Aliquots einer aus Vollblut erhaltenen Plättchenprobe; jedes Aliquot entsprach dabei den Thrombozyten aus 20 mL Blut. Die Ergebnisse sind in Tab. E-4.6 dargestellt.

**Tab. E-4.6 Präzision der Bestimmung der  $Ap_nA$  in Thrombozyten**

Aliquot	$Ap_2A$ pmol	$Ap_3A$ pmol	$Ap_4A$ pmol	$Ap_5A$ pmol	$Ap_6A$ pmol
1	251	1715	1827	704	336
2	226	1754	1753	560	245
3	237	1848	1831	701	271
4	245	1971	1957	669	271
5	210	1999	2154	749	296
MW	234	1857	1904	677	284
SDV	16,2	126,6	157,8	71,3	34,1
relSDV	6,9 %	6,8 %	8,3 %	10,5 %	12,0 %

### 4.3.2.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde ermittelt durch Vergleich der korrigierten Peakflächen vor und nach der Probenaufarbeitung. Um mögliche Fehler durch geringfügig verschiedene Injektionsvolumina auszuschließen, wurden die entsprechenden Proben (30  $\mu$ L der in der Kalibration zum Aufstocken verwendeten Diadenosinpolyphosphat-Lösungen bzw. die fertig aufgearbeiteten Kalibrationsproben) nach der Vakuumtrocknung in einer  $NAD^+$ -Lösung aufgenommen. Das enthaltene  $NAD^+$  diente als zweiter interner Standard, auf den die korrigierten Peakflächen der Substanzen bezogen wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 des theoretischen Teils zusammengefasst.

### 4.3.2.5 Robustheit

#### Abbau der Dinukleosidpolyphosphate in der Plättchensuspension

Zwei Aliquots der zur Kalibrierung verwendeten aufgetauten und resuspendierten Plättchenprobe wurden erst nach 60-minütigem Stehen im Eisbad mit Perchlorsäure versetzt und weiter aufgearbeitet. Anschließend wurde der Dinukleotidgehalt mit den sofort nach Resuspendierung und Aliquotierung mit Perchlorsäure behandelten Proben verglichen.

**Tab. E-4.7 Dinukleotidgehalt bei sofortiger Perchlorsäurefällung bzw. bei Perchlorsäurefällung nach 60-minütigem Stehen im Eisbad**

<b>Perchlorsäurefällung</b>	<b>Ap<sub>2</sub>A</b> pmol	<b>Ap<sub>3</sub>A</b> pmol	<b>Ap<sub>4</sub>A</b> pmol	<b>Ap<sub>5</sub>A</b> pmol	<b>Ap<sub>6</sub>A</b> pmol
sofort	176	1990	2040	776	310
60 min 0 °C (MW, <i>n</i> = 2)	161	1430	1760	599	231

#### Stabilität der Migrationszeiten

Die Migrationszeiten der Analyten sind in Abb. 4.15 sowie Tab. 4.7 des theoretischen Teils zusammengefasst.

#### Systemeignungstest

Die Zusammensetzung der Testmischung für den Systemeignungstest ist in Tab. E-4.8 wiedergegeben. Die Testmischung wurde bei pH 9,80 und pH 10,35 hydrodynamisch jeweils 10 s, gefolgt von 2 s Wasser, injiziert ( $p = 0,5$  psi). Als Indikator für die korrekte Einstellung des pH-Wertes diente bei pH 9,80 die Trennung von ADP, Ap<sub>4</sub>G und Ap<sub>5</sub>A, bei pH 10,35 die Trennung von ADP, Ap<sub>3</sub>G und Ap<sub>5</sub>A. Entsprechende Elektropherogramme sind in Abb. 4.16 des theoretischen Teils gezeigt.

**Tab. E-4.8 Zusammensetzung der Probenlösung für den Systemeignungstest**

<b>Ap<sub>2</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>A</b>	<b>Ap<sub>3</sub>G</b>	<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	<b>Ap<sub>4</sub>G</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	<b>Ap<sub>6</sub>A</b>	<b>AMP</b>	<b>ADP</b>	<b>ATP</b>
μmol L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>						
50	50	15	50	15	50	50	30	30	30

### 4.3.3 Untersuchung von Probandenblutproben

Tab. E-4.9 Dinukleotidgehalt der untersuchten Probandenproben

Proband	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>3</sub> G	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>4</sub> G	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
	pmol pH 10,35	pmol pH 9,80	pmol pH 9,80	pmol pH 9,80	pmol pH 10,35	pmol pH 9,80	pmol pH 10,35
1	389	3444	902	3401	1081	1484	493
2	208	1146	418	1194	337	635	233
3	278	1713	464	1938	600	985	345
4	194	1870	522	2273	626	1138	416
5	123	965	280	1035	330	527	223
6	174	1574	439	1819	484	855	315
7	201	1845	576	1957	677	951	356
8	265	1470	353	1721	573	884	532
9	244	2933	949	3632	1186	1849	748
10	194	1394	423	2028	658	1068	537
11	416	1423	483	1830	1337	1036	1018
12	73	584	178	949	448	472	285
13	277	812	267	1239	366	677	452
14	144	1803	558	2373	632	1218	742
15	184	1056	418	1604	406	858	400
16	335	1029	428	1723	473	648	453
17	463	1201	470	1433	419	737	283
18	258	1880	669	2627	591	1242	557
19	150	1089	349	1520	366	783	378
20	145	1841	489	2020	611	969	560
21	176	1990	482	2040	610	658	310

Angegeben ist jeweils der Absolutgehalt einer aus 20 mL Vollblut gewonnenen Thrombozytenprobe.

Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwertes, Vertrauensintervall des Mittelwertes sowie Median sind in Tab. 4.8 des theoretischen Teils angegeben.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Add-Ins *Analyse-it General V. 1.62* für Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

### 4.3.4 Vergleich von Normo- und Hypertonikerproben

**Tab. E-4.10 Dinukleotidgehalt der untersuchten Probandenproben**

(H = Hypertoniker, N = Normotoniker; Ap<sub>6</sub>A bei Normotoniker unter LOQ)

Proband / Aliquot	Ap <sub>2</sub> A	Ap <sub>3</sub> A	Ap <sub>3</sub> G	Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>4</sub> G	Ap <sub>5</sub> A	Ap <sub>6</sub> A
	pmol pH 10,35	pmol pH 9,80	pmol pH 9,80	pmol pH 9,80	pmol pH 10,35	pmol pH 9,80	pmol pH 10,35
N / 1	251	1715	480	1827	400	704	163
N / 2	226	1754	441	1753	458	560	145
N / 3	237	1848	460	1831	537	701	222
N / 4	244	1971	501	1957	511	669	155
N / 5	210	1999	513	2154	549	749	205
MW	234	1857	479	1904	491	676	(178)
SD	16,2	126,6	29,5	157,8	62,0	71,3	33,5
SEM	7,3	56,6	13,2	70,6	27,2	31,9	15,0
H / 1	331	1359	353	1431	319	593	246
H / 2	200	1592	428	1842	424	784	263
H / 3	236	1653	439	1887	488	766	292
H / 4	181	1298	344	1323	350	456	157
H / 5	148	1200	306	1396	368	532	210
MW	219	1420	374	1576	390	626	234
SD	70,2	194,0	57,0	266,6	66,9	144,3	52,0
SEM	31,4	86,8	25,5	119,2	29,9	64,6	23,3

Angegeben ist jeweils der Absolutgehalt eines den Thrombozyten aus aus 20 mL Vollblut entsprechenden Aliquots.

Mittelwerte und Varianzen wurde mit Hilfe eines *F*- bzw. *t*-Testes auf einem Signifikanzniveau von  $P = 99\%$  (zweiseitiger Test) untersucht. Dabei konnte für kein Dinukleotid ein signifikanter Unterschied der Varianzen, für Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>3</sub>G jedoch ein signifikant unterschiedlicher Gehalt in den Proben aus Normo- bzw. Hypertoniker-Blut festgestellt werden.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Add-Ins *Analyse-it General V. 1.62* für Microsoft Excel 2000 durchgeführt.



## 5 Versuche zur CE/MS-Kopplung

### 5.1 Kapillarelektrophoretische Bedingungen

- Kapillarelektrophorese-System HP<sup>3D</sup> mit DAD-Detektor, Wellenlänge 254 nm, Betrieb des Systems im CE/MS-Modus
- Kapillare fused-silica 50 µm ID, ca. 25 cm zum UV-Detektionsfenster, ca. 78 cm Gesamtlänge bis zum Kapillarende im ESI-Interface, Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH 9,50 eingestellt mit 25 % NH<sub>4</sub>OH
- Trennungsspannung +20 kV, Stromstärke auf 50 µA begrenzt
- Probeninjektion hydrodynamisch 15 s, danach Wasserinjektion 5s, jeweils mit 50 mbar Überdruck
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 2 min Puffer

Als Proben dienten wässrige Lösungen jeweils eines Dinukleotides aus der Reihe Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>8</sub>A mit einer Konzentration von etwa 2 mmol/L sowie eine Mischung von Ap<sub>2</sub>A, Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>7</sub>A, Konzentration ebenfalls etwa 2 mmol/L je Dinukleotid (Ap<sub>7</sub>A ca. 400 µmol/L).

### 5.2 Massenspektrometrische Bedingungen

- Iontrap-Quadrupol-Massenspektrometer LCQ<sup>®</sup> mit Elektrospray-Interface
- Detektion im Negativ-Ionen-Modus, Full-scan,  $m/z = 200-1200$
- *Sheath liquid*: Methanol / Wasser / konz. Ammoniak 50+49+1 (V+V+V)
- *Sheath flow*: 3,90 µL/min
- *Sheath gas* (N<sub>2</sub>): 17,4 arbitrary units
- ESI-Spannung: 3,8 kV
- Temperatur der Einlasskapillare: 60 °C

Kapillarelektrophoresegerät und Massenspektrometer waren für die CE/MS-Kopplung mit einem Erdungskabel verbunden, um den Stromkreis für die Kapillarelektrophorese zu schließen und Potenzialdifferenzen zwischen den beiden Geräten zu vermeiden.



## 6 Versuche zur Fluoreszenzderivatisierung

### 6.1 Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion

- P/ACE System 2100 mit P/ACE LIF-Detektor, *PMT Gain* 1000
- Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$  325 nm (HeCd-Laser, 20 mW Ausgangsleistung), Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}}$  405 nm (Filter, Halbwertsbreite 10 nm)
- Kapillare fused-silica 50  $\mu\text{m}$  ID, 60 cm effektive Länge, 67 cm Gesamtlänge, LIF-Kartusche, Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH 9,90 eingestellt mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$
- Trennungsspannung +20 kV
- Probeninjektion hydrodynamisch 10 s, danach Wasserinjektion 2 s, jeweils mit 0,5 psi Überdruck
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 3 min 0,1 M-NaOH, 5 min Puffer

Als Probenlösung wurde eine wässrige Lösung von  $\epsilon\text{-Ap}_2\text{A}$ ,  $c \approx 230 \mu\text{mol/L}$  (berechnet als  $\text{Ap}_2\text{A}$ ) verwendet.

### 6.2 ARGOS 250B-Fluoreszenzdetektor

- Kapillarelektrophorese-System  $\text{HP}^{3\text{D}}$  mit DAD-Detektor (Wellenlänge 254 nm) und über A/D-Wandler angeschlossenem ARGOS 250B-Fluoreszenzdetektor
- Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$  265 nm (Xenon-Lampe / Monochromator), Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} \geq 320 \text{ nm}$  (*cut-off*-Filter)  
*Gain*-Spannung des Photomultipliers 700 V
- Kapillare fused-silica 50  $\mu\text{m}$  ID, 38 cm Gesamtlänge (ca. 18 cm zur Fluoreszenzdetektionseinheit und 30 cm zum UV-Detektionsfenster), Kapillartemperatur 20 °C
- Laufpuffer Ammoniumcarbonat 50 mmol/L, pH 9,90 eingestellt mit 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$
- Trennungsspannung +10 kV
- Probeninjektion hydrodynamisch 7 s mit 50 mbar Überdruck
- Spülen zwischen den einzelnen Läufen: 2 min 0,1 M-NaOH / 5 min Puffer

Als Probenlösung wurde eine wässrige Lösung von  $\epsilon\text{-Ap}_2\text{A}$ ,  $c \approx 80 \mu\text{mol/L}$  (berechnet als  $\text{Ap}_2\text{A}$ ), die außerdem noch 170  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NAD}^+$  enthielt, verwendet.



### **III. Literaturverzeichnis**



- 
- [1] A.G. McLennan, *Ap<sub>4</sub>A and other dinucleoside polyphosphates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- [2] E. Rapaport, P.C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 (1976) 3984-3988.
- [3] H. Flodgaard, H. Klenow, *Biochem. J.*, 208 (1983) 737-742.
- [4] J. L uthje, A. Ogilvie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115 (1983) 253-260.
- [5] H. Schl uter, E. Offers, G. Br uggemann, M. Van der Giet, M. Tepel, E. Nordhoff, M. Karas, C. Spieker, H. Witzel, W. Zidek, *Nature*, 367 (1994) 186-188.
- [6] J. Jankowski, M. Tepel, M. Van der Giet, I.M. Tente, L. Henning, R. Junker, W. Zidek, H. Schl uter, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 23926-23931.
- [7] J. Luo, J. Jankowski, M. Knobloch, M. Van der Giet, K. Gardanis, T. Russ, U. Vahlensieck, J. Neumann, W. Schmitz, M. Tepel, M.C. Deng, W. Zidek, H. Schl uter, *FASEB J.*, 13 (1999) 695-705.
- [8] J. Jankowski, J. Hagemann, M. Tepel, M. Van der Giet, N. Stephan, L. Henning, H. Gouni-Berthold, A. Sachinidis, W. Zidek, H. Schl uter, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 8904-8909.
- [9] H. Schl uter, I. Gro , J. Bachmann, R. Kaufmann, M. Van der Giet, M. Tepel, J.-R. Nofer, G. Assmann, M. Karas, J. Jankowski, W. Zidek, *J. Clin. Invest.*, 101 (1998) 682-688.
- [10] J. Luo, J. Jankowski, M. Tepel, M. Van der Giet, W. Zidek, H. Schl uter, *Hypertension*, 34 (1999) 872-875.
- [11] H. Schl uter, J. Jankowski, M. Van der Giet, M. Tepel, W. Zidek, *Nieren Hochdruck*, 29 (2000) 303-309.
- [12] J. Jankowski, W. Potthoff, M. Van der Giet, M. Tepel, W. Zidek, H. Schl uter, *Anal. Biochem.*, 269 (1999) 72-78.
- [13] C.H.V. Hoyle, R.H. Hilderman, J.J. Pinter, H. Schl uter, B.F. King, *Drug Dev. Res.*, 52 (2001) 260-273.
- [14] P. Hollah, M. Hausberg, M. Kosch, M. Barenbrock, M. Letzel, E. Schlatter, K.-H. Rahn, *J. Hypertens.*, 19 (2001) 237-245.
- [15] A. Ogilvie, P. Jakob, *Anal. Biochem.*, 134 (1983) 382-392.
- [16] K. Iwata, S. Haruki, T. Kimura, *J. Chromatogr. B*, 667 (1995) 339-343.
- [17] S.E. Geldart, P.R. Brown, *J. Chromatogr. A*, 828 (1998) 317-336.

- [18] N.H. Kolodny, E. Kisteneff, C. Redfield, E. Rapaport, *FEBS Lett.*, 107 (1979) 121-124.
- [19] E. Holler, B. Holmquist, B.L. Vallee, K. Taneja, P. Zamecnik, *Biochemistry*, 22 (1983) 4924-4933.
- [20] R.B. Westkaemper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144 (1987) 922-929.
- [21] K.H. Mayo, O.M. Mvele, R.N. Puri, *FEBS Lett.*, 265 (1990) 97-100.
- [22] N.V.C. Ralston, C.D. Hunt, *Biochim. Biophys. Acta*, 1527 (2001) 20-30.
- [23] J. Saevels, A.Z. Pérez, A.S. Jaumà, A. Van Schepdael, J. Hoogmartens, *Chromatographia*, 47 (1998) 225-229.
- [24] X. Cahours, P. Morin, M. Dreux, *Chromatographia*, 49 (1999) 379-384.
- [25] H. Schlüter, *Bioforum*, (2000) 684-685.
- [26] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer, Berlin, 1993.
- [27] H. Engelhardt, W. Beck, S. Schmitt, *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg, Braunschweig, 1994.
- [28] R. Medda, A. Padiglia, I. Messina, G. Floris, M. Castagnola, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2412-2416.
- [29] T. Wang, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 215-225.
- [30] K. O'Neill, X. Shao, Z. Zhao, A. Malik, M.L. Lee, *Anal. Biochem.*, 222 (1994) 185-189.
- [31] M. Huang, S. Liu, B.K. Murray, M.L. Lee, *Anal. Biochem.*, 207 (1992) 231-235.
- [32] S. Heitmeier, *Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, 1997.
- [33] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 169 (1997) 1.
- [34] S.V. Ermakov, M.Y. Zhukov, L. Capelli, P.G. Righetti, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2957.
- [35] S.V. Ermakov, M.Y. Zhukov, L. Capelli, P.G. Righetti, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4034.
- [36] R. Takigiku, R.E. Schneider, *J. Chromatogr.*, 559 (1991) 247-256.
- [37] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1992.

- [38] A.F. Hollemann, E. Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, De Gruyter, Berlin - New York, 1985.
- [39] G. Jander, K.F. Jahr, Maßanalyse, De Gruyter, Berlin - New York, 1989.
- [40] S. Hjertén, *J. Chromatogr.*, 347 (1985) 191-198.
- [41] G. Schulte, Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1998.
- [42] M. Nakatani, A. Shibukawa, T. Nakagawa, *Electrophoresis*, 16 (1995) 1451-1456.
- [43] G. Schomburg, in N.A. Guzman (Editor), *Capillary electrophoresis technology*, Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1993, p. 311-355.
- [44] S.E. Geldart, P.R. Brown, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 67-73.
- [45] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, De Gruyter, Berlin - New York, 1990.
- [46] A.P. McKeown, P.N. Shaw, D.A. Barret, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1119-1126.
- [47] P. Schmitt-Kopplin, A.V. Garmash, A.V. Kudryavtsev, F. Menzinger, I.V. Perminova, N. Hertkorn, D. Freitag, V.S. Petrosyan, A. Kettrup, *Electrophoresis*, 22 (2001) 77-87.
- [48] N. Ikuta, Y. Yamada, T. Hirokawa, *Electrophoresis*, 21 (2000) 360-366.
- [49] M.M. Taqui Kahn, A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 3037-3041.
- [50] H. Sigel, *Chem. Soc. Rev.*, 22 (1993) 255.
- [51] X. Cahours, P. Morin, M. Dreux, *Chromatographia*, 48 (1998) 739-744.
- [52] K. Kawamura, *J. Chromatogr. A*, 802 (1998) 167-177.
- [53] X. Cahours, P. Morin, M. Dreux, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 22 (1999) 2389-2401.
- [54] E. Holler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120 (1984) 1037-1043.
- [55] N.H. Kolodny, L.J. Collins, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 14571-14575.
- [56] G. Hempel, *Electrophoresis*, 21 (2000) 691-698.
- [57] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2768-2779.
- [58] R.-L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1046-1050.
- [59] P.R. Brown, S.E. Geldart, *J. Microcolumn Sep.*, 10 (1998) 65-73.
- [60] S.E. Geldart, P.R. Brown, *Am. Lab.*, 29 (1997) 48-51.
- [61] L.D. Barnes, A.K. Robinson, C.H. Mumford, P.N. Garrison, *Anal. Biochem.*, 144 (1985) 296-304.

- [62] H. Schlüter, persönliche Mitteilung, 2001.
- [63] Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [64] Food and Drug Administration, (Draft) Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.
- [65] ICH-Guideline Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures (Definitions and Terminology), 1994.
- [66] ICH Guideline Q2B: Validation of Analytical Procedures (Methodology), 1996.
- [67] H. Meier, Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000.
- [68] M. Mazereeuw, A.J.P. Hofte, U.R. Tjaden, J. Van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 981-986.
- [69] A. Zamfir, J. Peter-Katalinic, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2448-2457.
- [70] R.E. Milofksy, E.S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 153-157.
- [71] H.C. Tseng, R. Dadoo, R.N. Zare, *Anal. Biochem.*, 222 (1994) 55-58.
- [72] P. Rotilán, A. Ramos, J. Pintor, M. Torres, M.T. Miras-Portugal, *FEBS Lett.*, 280 (1991) 371-374.

# Lebenslauf

## Martin Gerhard Knobloch

geboren 20.05.1972 in Lampertheim / Hessen  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Eltern Dr. rer. nat. Joachim Knobloch und Frau Rita, geb. Steinhauser

## Schulbildung

08/1978 bis 07/1982 Grundschule Lampertheim  
08/1982 bis 06/1991 Gymnasium Denzlingen  
18.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

## Zivildienst

07/1991 bis 09/1992 Seniorenzentrum „Grüner Weg“, Denzlingen

## Hochschulausbildung

10/1992 – 03/1997 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau  
01.09.1994 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
17.03.1997 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
05/1997 – 10/1997 Pharmaziepraktikum in der Mocho-Apotheke, München  
11/1997 – 04/1998 Pharmaziepraktikum bei der Gödecke AG, Freiburg  
06.07.1998 Approbation als Apotheker  
seit 08/98 Promotionsstudiengang Pharmazie an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität (WWU) Münster  
Anfertigung der Dissertation am Institut für Pharmazeutische  
und Medizinische Chemie unter der Leitung von  
Prof. Dr. G. Blaschke

## Berufliche Tätigkeiten

08/1998 – 01/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische  
und Medizinische Chemie der WWU Münster  
seit 02/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am selben Institut