

# Elektrochemisch assistierte Injektion in Kopplung mit Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie

– Neue Möglichkeiten für elektrochemische  
Untersuchungen von Biomolekülen –

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
Rebekka Scholz aus Stendal  
im Jahr 2015

Die vorgelegte Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 2008 bis November 2015 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Frank-Michael Matysik.

Das Promotionsgesuch wurde am 18. September 2015 eingereicht.

Das Kolloquium fand am 19. November 2015 statt.

Dem Prüfungsausschuss saß Prof. Dr. Arno Pfitzner vor. Erster Gutachter war Prof. Dr. Frank-Michael Matysik, zweiter Gutachter war PD Dr. Hans-Heiner Gorris, dritte Prüferin war PD Dr. Miriam Breunig.



# Elektrochemisch assistierte Injektion in Kopplung mit Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie

– Neue Möglichkeiten für elektrochemische  
Untersuchungen von Biomolekülen –

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
vorgelegt von  
Rebekka Scholz



Für Oskar und Anton,  
auch wenn die beiden noch gar nicht richtig wissen,  
was eine Widmung überhaupt ist.

## *Danksagung*

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank-Michael Matysik für die Möglichkeit, das interessante Forschungsfeld der Elektrochemie mit Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie vereinen zu können, und im Rahmen einer Dissertation die Anwendbarkeit in der Bioanalytik zeigen zu können.

Sie haben einmal zu mir gesagt, dass eine Promotion mit Kind etwas anderes sein wird und die Arbeitsweise verändern wird. Für die Unterstützung, die mir in den Zeiten meiner familiären Vergrößerung zuteil kam, danke ich aufrichtig. Mir ist bewusst, dass dies keine Selbstverständlichkeit ist.

Ebenso danke ich den Mitgliedern des gesamten Arbeitskreises sowie ehemaligen Kolleginnen und Kollegen und den Institutsmitgliedern für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Unterstützung über den gesamten Zeitraum. Im Besonderen gilt mein Dank Claudia Niegel, Dr. Heike Mader, Dr. Peter Palatzky, Gisela Emmert, Katrin Uhlmann, Dr. Preety Vatsyayan und Nicole Guber für die sehr gute Zusammenarbeit und gewonnene Freundschaft.

Die fachlichen Kompetenzen von Peter Fuchs und Johann Birner aus der Elektronikwerkstatt sowie Josef Kiermaier aus der Zentralanalytik halfen mir in den Jahren der Zusammenarbeit.

Mein größter Dank ist an meine Familie gerichtet. Eure Motivation und unabdingbare Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Promotionszeit ist unbezahltbar und unbeschreiblich.



## *Inhaltsverzeichnis*

<b>1. Kapitel: Theoretischer Hintergrund</b>	<b>1</b>
1.1 Elektrochemie	1
1.1.1 Cyclovoltammetrie	2
1.1.2 Elektrochemisch assistierte Injektion	4
1.2 Kapillarelektrophorese	7
1.2.1 Trennprinzip	7
1.2.2 Nicht-wässrige Kapillarelektrophorese	9
1.3 Massenspektrometrie	11
1.3.1 Elektrospray-Ionisation	13
1.3.2 Flugzeitmassenspektrometer	15
1.4 Kopplung von Trenntechniken mit Massenspektrometrie	17
1.4.1 Flüssigchromatographie–Massenspektrometrie	17
1.4.2 Kapillarelektrophorese–Massenspektrometrie	18
1.5 Elektrochemie–Massenspektrometrie	22
1.5.1 Verbindung von Elektrochemie, Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie	23
1.5.2 Kopplung von elektrochemisch assistierter Injektion, Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie	23
1.6 Modellsysteme und Analyten	26
1.6.1 Ferrocen und seine Derivate	26
1.6.2 Oxidativer Stress und seine Wirkung auf das Nukleosid Guanosin	27
1.6.3 Das Antioxidans Rutin	29
<b>2. Kapitel: Motivation und Ziel der Arbeit</b>	<b>33</b>
<b>3. Kapitel: Publizierte Fachartikel als Erstautorin</b>	<b>35</b>
<b>4. Kapitel: Experimenteller Teil</b>	<b>37</b>
4.1 Chemikalien und Materialien	37
4.2 Geräte	39
4.3 Software	40
4.4 Methoden	41
4.4.1 Cyclovoltammetrische Messungen	41
4.4.2 Elektrochemisches Fließzell-Experiment	41
4.4.3 Elektrochemisch assistierte Injektion: Manuelle Injektionstechnik	43
4.4.4 Elektrochemisch assistierte Injektion: Automatische EAI-Zelle	45
4.4.5 CE-Methodenentwicklung	46

Einfluss der Trennspannung	46
Injektionszeiten	48
EOF-Marker	48
4.4.6 MS-Methodenentwicklung	49
Kalibrierung des Massenspektrometers	49
Parameter des ESI-Interfaces	50
Parameter der Ionenoptiken	53
<b>5. Kapitel: Trennung neutraler Analyten: Ferrocen und seine Derivate als Modellanalyten</b>	<b>55</b>
5.1 Trennung und Detektion mit EAI-CE-MS	55
5.2 Besonderheit im Protonierungsverhalten	60
5.3 Zusammenfassung	62
<b>6. Kapitel: Simulation des oxidativen Stresses von Guanosin</b>	<b>63</b>
6.1 Cyclovoltammetrische Messungen	63
6.2 Elektrochemische Fließzell-Experimente	65
6.3 Oxidation und Trennung mittels EAI-CE-MS	68
6.4 Variation der Oxidationsspannung	71
6.5 pH-Abhängigkeit der Oxidation von Guanosin	73
6.5.1 Messungen unter sauren pH-Bedingungen	73
6.5.2 Messungen unter physiologischem pH-Wert	74
6.6 Ein besonderes Oxidationsprodukt: 8-Oxoguanosin	76
6.6.1 Konzentrationsbestimmung	76
6.6.2 pH-Abhängigkeit	77
6.7 Vor- und Nachteile der Oxidation von Guanosin mittels EAI-CE-MS – ein Vergleich mit anderen publizierten Methoden	80
6.8 Zusammenfassung	82
<b>7. Kapitel: Oxidationsstudien zum Naturstoff Rutin</b>	<b>83</b>
7.1 Cyclovoltammetrische Messungen	83
7.2 Bestimmung der Oxidationsprodukte mit der elektrochemischen Durchflusszelle	86
7.3 EAI-CE-MS	88
7.3.1 Potentialabhängigkeit der Produktintensitäten	90
7.3.2 Einfluss der Oxidationszeit	91
7.4 Vergleich zweier Elektrodenmaterialien	93
7.5 Identifizierung der Oxidationsprodukte: Ein Vergleich mit anderen Methoden	97
7.6 Zusammenfassung	101

<b>8. Kapitel: Zusammenfassung der Forschungsschwerpunkte</b>	<b>102</b>
<b>9. Appendix</b>	<b>104</b>
9.1    Quellenverzeichnis	105
9.2    Abkürzungsverzeichnis	111
9.3    Curriculum Vitae	113
9.4    Publikationen und Präsentationen	115

# 1. Kapitel

## Theoretischer Hintergrund

### 1.1. Elektrochemie

Eine der wichtigen Säulen der Analytischen Chemie stellt die Elektrochemie dar. Mit der Verleihung des Chemie-Nobelpreises 1959 an Jaroslav Heyrovský für „seine Entdeckung und Entwicklung der polarographischen Methode der Analyse“ [1] wurde die Entwicklung der Elektroanalytischen Chemie in großem Ausmaß vorangebracht.

Trotz der Vielzahl an elektrochemischen Methoden kann eine einfache Systematisierung vorgenommen werden. Man unterscheidet zwei grundsätzliche Methoden. Zum einen finden elektroanalytische Phänomene in der Volumenphase statt. Sie beruhen auf der Wanderung von Teilchen im elektrischen Feld, wie sie bei der Elektrophorese und der Konduktometrie auftreten. Zum anderen basieren elektroanalytische Methoden auf Phänomenen an der Grenzfläche zwischen Elektrolyt(-Lösung) und Elektrodenoberfläche. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten des elektrochemischen Vorganges: Potentiometrische sowie potentiostatische Messungen. [2]

Potentiometrische Messungen erfolgen „stromlos“, was durch den Gebrauch eines hochohmigen Voltmeters erreicht wird. Dies verhindert eine Elektrolyse, womit kein Stoffumsatz zu verzeichnen ist. Die Potentiometrie stellt ein quantitatives elektroanalytisches Verfahren dar, das die Konzentrationsabhängigkeit des Elektrodenpotentials einer Indikatorelektrode als analytisches Signal nutzt. Sie wird vorrangig mit ionensensitiven Elektroden durchgeführt, wobei potentiometrische Messungen vor allem in der pH-Messtechnik mit Glaselektrode als Indikatorelektrode angewendet werden. [2-4]

Diesen entgegen stehen potentiostatische Methoden, bei denen aufgrund eines Stromflusses ein Stoffumsatz erzielt wird. Diese elektroanalytischen Verfahren auf Grundlage der Verfolgung von

Strom- und Spannungsverläufen während einer elektrochemischen Reaktion sind sehr umfangreich. Allgemein werden sie unter dem Begriff der Voltammetrie zusammengefasst und ermöglichen sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse einer Probe. Die Messgröße in der Voltammetrie stellt dabei der Faraday-Strom dar. In einer elektrochemischen Zelle fließt er an der Arbeitselektrode aufgrund von Oxidations- bzw. Reduktionsvorgängen des Analyten in der Lösung. Durch das Auftreten eines Kapazitätsstroms, der aus Auf- und Umladung der elektrischen Doppelschicht der Elektrode resultiert, ohne dass Ladungen über die Phasengrenze an der Elektrode übertragen werden, wird der Faraday-Strom verfälscht. Ziel elektrochemischer Methoden ist es daher, das Verhältnis von Faraday-Strom zu Kapazitätsstrom so groß wie möglich zu halten, wie es beispielsweise bei der Square-Wave-Voltammetrie und der Differential-Puls-Polarographie Anwendung findet. Weitere oftmals in der Elektroanalytik genutzte Verfahren, die auf voltammetrischen Methoden basieren, sind Amperometrie und Coulometrie. Der am häufigsten genutzte experimentelle Aufbau einer elektrochemischen Zelle besteht aus einem Drei-Elektroden-Arrangement mit Arbeits- (bzw. Indikator-), Referenz- und Gegenelektrode. Dieser Aufbau wird in Kapitel 1.1.2. mit Bezug zur elektrochemisch assistierten Injektion näher erläutert. [2-5]

### 1.1.1. Cyclovoltammetrie

Für die Untersuchung der Reversibilität von Elektrodenreaktionen sowie zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen kann eine besondere Form der voltammetrischen Methoden genutzt werden. Bei der Cyclovoltammetrie wird an der Arbeitselektrode, die in einen ruhenden Elektrolyten eintaucht, eine Dreiecksspannung angelegt (Abbildung 1).

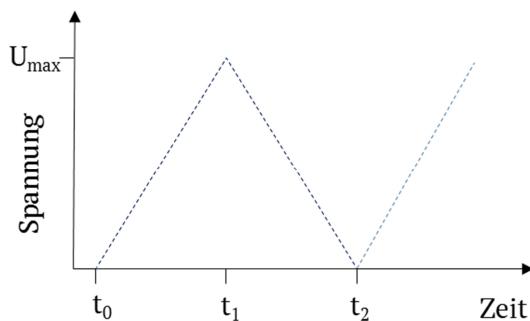


Abb. 1. Schematische Darstellung der in der Cyclovoltammetrie verwendeten Wellenform der Spannung an der Arbeitselektrode.

Zunächst erfolgt eine Potentialsteigerung in anodischer Richtung ( $t_0$  zu  $t_1$ ) und anschließend in kathodischer Richtung ( $t_1$  zu  $t_2$ ) oder umgekehrt. Diese Abfolge kann mehrere Male wiederholt werden.

In der Cyclovoltammetrie spielt der Massentransport der elektroaktiven Spezies zur Elektrode, an der die Oxidation oder Reduktion erfolgt, eine große Rolle. Sie erfolgt ausschließlich über Diffusion. Um zum einen Migrationsströmungen zu unterdrücken und zum anderen die Leitfähigkeit der Lösung während des cyclovoltammetrischen Prozesses aufrecht zu erhalten, wird ein Leitelektrolyt zugesetzt, wobei sich unter anderem Ammoniumsalze sehr bewährt haben [6].

Man erhält mit dem Cyclovoltammogramm eine Strom-Spannungskurve (Abbildung 2), welche für Makroelektroden (Durchmesser  $> \mu\text{m}$ -Bereich) einen typischen Hystereseverlauf zeigt. Zunächst steigt die Kurve gemäß eines typischen Polarogramms an, bis sie die anodische Stufe erreicht. Statt sich nun bei weiterer Spannungserhöhung auf einem plateauähnlichen Niveau einzupegeln, sinkt der Strom wieder ab. Ursache für dieses Verhalten ist die Abscheidung des Analyten nahe der Elektrodenoberfläche. Die Diffusion in der Lösung ist zu gering, um die Konzentration aufrechtzuerhalten. Zum Zeitpunkt  $t_1$  wird das Potential umgekehrt. Das Potential ist jedoch immer noch positiv genug, so dass weiter ein anodischer Strom fließt. Erst bei weiterer Reduzierung des Potentials findet eine Reduktion zum Ausgangsprodukt statt, was durch die kathodische Stufe angezeigt wird.

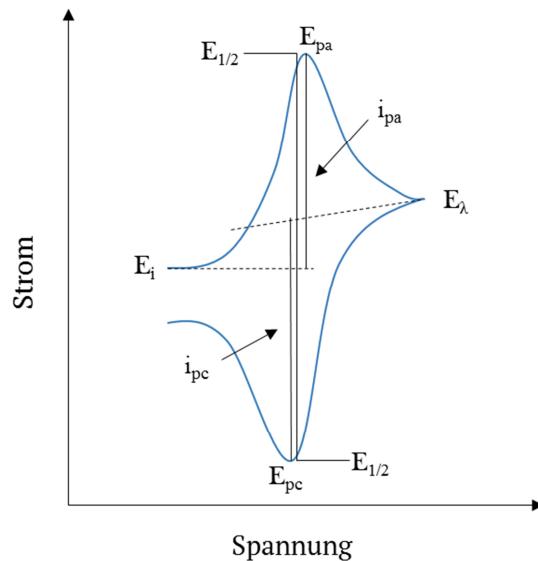


Abb. 2. Cyclovoltammogramm eines idealisierten Systems für einen reversiblen Ladungstransfer.  $E_{pc}$ : kathodisches Spitzenpotential,  $E_{pa}$ : anodisches Spitzenpotential,  $E_i$ : Startpotential,  $E_\lambda$ : Umkehrpotential,  $E_{1/2}$ : Halbstufenpotential,  $i_{pa}$ : anodischer Spitzenstrom,  $i_{pc}$ : kathodischer Spitzenstrom. Abbildung adaptiert aus [7].

Geht man von einer schnell ablaufenden, reversiblen Elektrodenreaktion aus, bei der die Gleichgewichtskonzentrationen von Reaktant und Produkt an der Elektrodenoberfläche erhalten

bleiben, so besitzen anodischer und kathodischer Spaltenstrom die gleiche Größe. Für die Spaltenpotentiale gilt

$$E_{pa} - E_{pc} = \frac{2,22 \text{ RT}}{nF} = \frac{57,0}{n} \text{ (mV)} \quad \text{bei } 25 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad (\text{Gleichung 1})$$

wobei  $E_{pa}$  und  $E_{pc}$  die jeweiligen Potentiale sind, bei denen der anodische bzw. kathodische Spaltenstrom gemessen wird. Diese sind abhängig von der Anzahl der Elektronen  $n$  in der Halbzellenreaktion. Das Halbstufenpotential  $E_{1/2}$  liegt genau zwischen den beiden Peakpotentialen. Liegt eine irreversible Reaktion vor, so sind die kathodische und anodische Stufe verzerrt und treten weiter voneinander entfernt auf. Bei extremer Irreversibilität, also sehr langsamer Oxidation bzw. Reduktion, kann kein entsprechender Peak mehr nachgewiesen werden. Zusätzliche Peaks in einem Cyclovoltammogramm geben Hinweise auf einzelne Redoxformen und Zwischenprodukte oder deuten auf Assoziations- bzw. Dissoziationsgleichgewichte hin. [2-7]

### 1.1.2. Elektrochemisch assistierte Injektion

Die elektrochemisch assistierte Injektion (EAI) ist eine Möglichkeit, Elektrochemie und Kapillarelektrophorese miteinander zu verbinden. Erstmals wurde das Konzept von Matysik [8] im Jahr 2003 beschrieben. Das Prinzip der elektrochemisch assistierten Injektion stellt die elektrochemische Probenmodifikation während des Injektionsschrittes in ein Kapillarfließsystem dar. Auf eine Probenvorbereitung mittels Derivatisierung des Analyten im Voraus kann somit verzichtet werden. Weitere Vorteile ergeben sich, wenn EAI in Verbindung mit der Kapillarelektrophorese (CE) betrachtet wird. EAI ermöglicht es, Neutralanalyten nach Bildung ionischer Spezies mittels CE zu trennen. Voraussetzung ist dabei natürlich, dass die neutralen Analyten eine Redoxaktivität aufweisen und möglichst geladene Oxidations- bzw. Reduktionsprodukte bilden. Des Weiteren können mechanistische Studien von elektrochemischen Reaktionen durchgeführt werden, wobei das Migrationsverhalten von unbekannten Produkten mit der leistungsstarken Kapillarelektrophorese analysiert und zur Identifizierung genutzt werden kann. Für die Detektion können alle bekannten Möglichkeiten in Kopplung zur CE genutzt werden. Erste Experimente wurden mittels UV/Vis-Detektion realisiert [8]. Eine Erweiterung mit massenspektrometrischer Detektion soll im Rahmen dieser Dissertation verwirklicht werden.

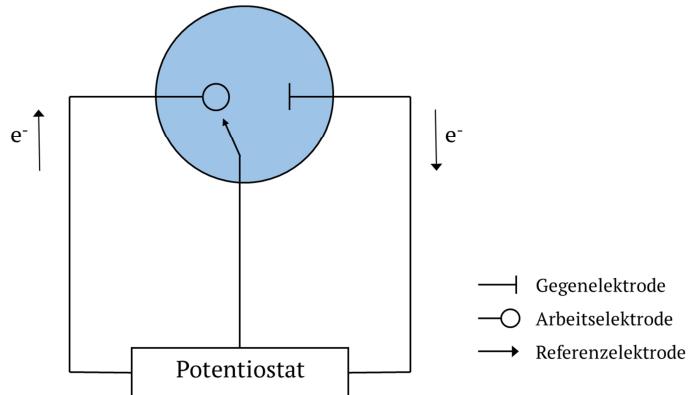


Abb. 3. Stromkreis der Drei-Elektroden-Anordnung. Abbildung adaptiert aus [3].

EAI wird in einer speziellen Injektionszelle durchgeführt. Der Aufbau der elektrochemischen Zelle besteht aus einer Drei-Elektroden-Anordnung (Abbildung 3) aus einer Arbeitselektrode, einer (Quasi-)Referenzelektrode und einer Gegenelektrode. Vorteil dieser Drei-Elektrodenanordnung gegenüber einer Zwei-Elektrodenanordnung (nur aus Arbeits- und Referenzelektrode bestehend) ist, dass im Falle hoher Ströme sowie in schlecht leitenden Elektrolyten, wie beispielsweise aprotischen Lösungsmitteln, die angelegte Spannung nicht mehr mit der Sollspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode übereinstimmt. Das Arbeitselektrodenpotential  $E(t)$  verringert sich um den Ohm'schen Spannungsabfall gegenüber der vorgegebenen Zellspannung  $E_{zsp}(t)$  aufgrund des Widerstands  $R$  des Elektrolyten der Lösung (Gleichung 2).

$$E(t) = E_{zsp}(t) - I(t) \cdot R \quad (\text{Gleichung 2})$$

Das Auftreten hoher Ströme kann zudem die Referenzelektrode zerstören. Beide Einflüsse lassen sich durch einen Drei-Elektrodenaufbau weitgehend vermeiden. Hierbei wird der Strom über die Arbeits- und eine zusätzliche Gegenelektrode geführt, während die Referenzelektrode wegen ihrer hohen Impedanz nahezu stromlos bleibt. Zur Minimierung des verbleibenden nicht kompensierbaren Ohm'schen Spannungsabfalls wird die Referenzelektrode möglichst nahe an der Arbeitselektrode positioniert. [6]

Die Besonderheit im schematischen Aufbau der EAI-Zelle (Abbildung 4) findet sich in der experimentellen Anordnung der Quarzkapillare dicht über einer Disk-Arbeitselektrode, wobei eine elektrochemische Dünnschichtzellen-Konfiguration mit einem festen Kapillar-Elektroden-Abstand von  $50 \pm 10 \mu\text{m}$  gebildet wird. Die Injektionszelle enthält die Probenlösung. Die Injektion in das Kapillarfließsystem erfolgt hydrodynamisch außerhalb des Hochspannungsfeldes der CE. Deshalb kann das Potential der Arbeitselektrode ohne Probleme eingestellt werden. Erste Untersuchungen

wurden in der nachfolgend skizzierten Form der EAI-Zelle mit einem Modellsystem aus Ferrocen und dessen Derivaten durchgeführt [9]. Die weitere Forschung im bioanalytischen Feld bedingt jedoch bedeutend kleinere Probenvolumina, so dass im Arbeitskreis an der Weiterentwicklung und Miniaturisierung der EAI-Zelle gearbeitet wurde [10,11]. Die daraus resultierende vollautomatische EAI-Zelle wird in Kapitel 4.4.4. näher erläutert.

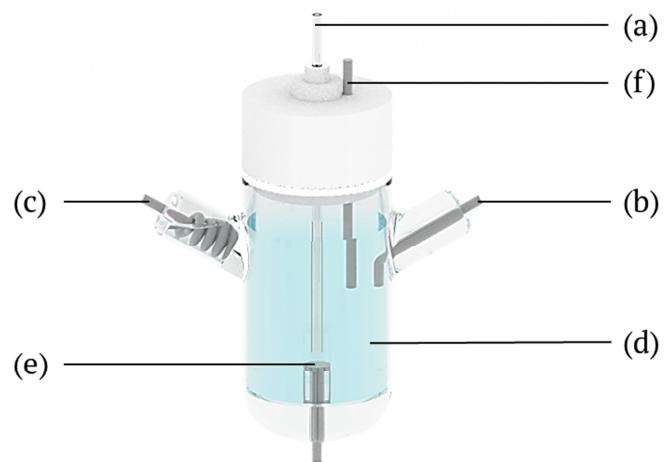


Abb. 4. Schematische Darstellung der Zellkonfiguration der EAI-Zelle: (a) Quarzkapillare, (b) Gegenelektrode, (c) Quasi-Referenzelektrode, (d) Probenlösung, (e) Arbeitselektrode und (f) Hochspannungselektrode für die Kapillarelektrophorese.

## 1.2. Kapillarelektrophorese

Für die Aufklärung komplexer Proben ist es unabdingbar, analytische Trennverfahren in den Prozess einzubinden. Dabei spielen chromatographische Methoden, wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC) eine wichtige Rolle. Diese kommen jedoch an ihre Grenzen, wenn polare und geladene Analyten, aber auch Biopolymere, schnell und effizient analysiert werden sollen. Dafür eignen sich elektrophoretische Trenntechniken hervorragend.

### 1.2.1. Trennprinzip

Im Gegensatz zur Chromatographie, bei der die Trennung auf Gleichgewichtseinstellungen zwischen stationärer und mobiler Phase beruht, basiert die elektrophoretische Trennung auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von geladenen Analyten unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Diese Wanderungsgeschwindigkeit  $u_{ep}$  ist direkt proportional zur elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{ep}$  und der angelegten Feldstärke  $E$ .

$$u_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (\text{Gleichung 3})$$

Nur aufgrund des Vorliegens unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten sind Trennungen möglich. Dabei ist  $\mu_{ep}$  sowohl lösungsmittel- als auch stoffspezifisch.

$$\mu_{ep} = \frac{z}{6\pi\eta r} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Die Nettoladung  $z$  des ionischen Analyten ist dabei die Ladung abzüglich des Ladungsanteils der umgebenden, starren Doppelschicht der Kapillarwand. Eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit ist zum einen zur Viskosität  $\eta$  des Elektrolyten sowie zum Stokes'schen Radius  $r$  des Analyten in der Umgebung des Elektrolyten gegeben [12].

Des Weiteren nimmt der elektroosmotische Fluss (EOF) starken Einfluss auf den elektrophoretischen Prozess. Er trägt passiv zum Transport der Analyten in ihren Zonen bei, nimmt jedoch keinen Einfluss auf deren Trennung. Er basiert auf der Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht der Silanolgruppen einer Quarzkapillare. Ab einem pH-Wert von 3 sind diese Silanolgruppen vorrangig negativ geladen, was zu einer starren anionischen Schicht an der Kapillarwand führt. Daraus resultiert eine bewegliche, kationische Schicht aus Ionen des

Hintergrundelektrolyten. Eine Neutralisierung erfolgt nicht vollständig. Da ein Kationenüberschuss vorliegt, findet im elektrischen Feld eine Nettowanderung zur Kathode statt, was als EOF bezeichnet wird. Er zeichnet sich durch ein sehr flaches, stempelförmiges Profil aus und unterscheidet sich damit wesentlich vom parabolischen Hagen-Poiseuille-Strömungsprofil hydrodynamischer Flüsse.

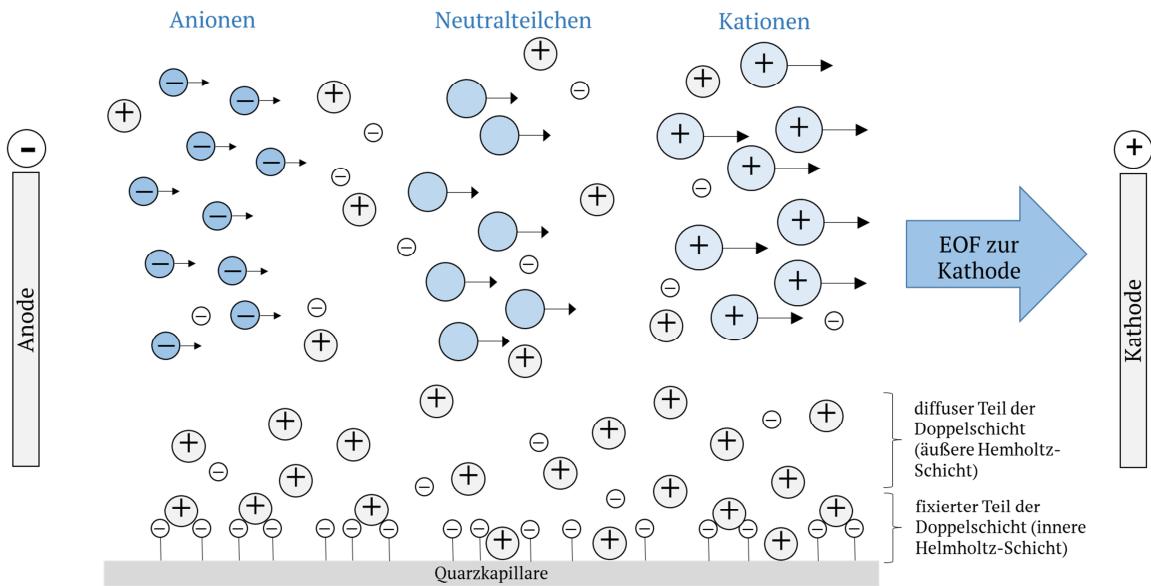


Abb. 5. Schematische Darstellung der kapillarelektrophoretischen Trennung. Die Größe der Pfeile symbolisiert die Nettogeschwindigkeit des Analyten. Grafik angelehnt an [3].

Der EOF ist zum einen stark pH-abhängig, da er mit dem Dissoziationsgrad der Silanolgruppen an der Kapillaroberfläche wächst. Zum anderen liegt eine Abhängigkeit von der Ionenstärke des Elektrolyten vor. Wird eine Modifizierung der Oberfläche zum Beispiel durch Zusatz von Detergenzien durchgeführt, lässt sich der EOF sogar umkehren. Wenn die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Anionen niedriger als die des EOF ist, werden diese entgegen ihrer Vorzugsrichtung zur Kathode transportiert. Der EOF ermöglicht somit die Trennung von Kationen und Anionen in einer einzigen analytischen Messung.

Die übliche Reihenfolge der Analyten, die den Detektor auf kathodischer Seite passieren, ist folgende: Kationische Spezies migrieren am schnellsten, mit dem EOF zusammen wandern darauffolgend Neutralanalyten, die nicht aufgetrennt werden können. Als letztes werden negativ geladene Analyten den Detektor passieren [13-15]. Eine Trennung neutral geladener Analyten ist mittels Kapillarelektrophorese nicht möglich. Durch den Zusatz von mizellenbildenden Tensiden, wie beispielsweise Natriumdodecylsulfat, kann diese Trennung realisiert werden. Diese Methode wird als Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) bezeichnet. Durch die Ausbildung negativ

geladener Mizellen entsteht eine pseudostationäre Phase. Somit verteilen sich neutrale Moleküle entsprechend ihrer Hydrophobie zwischen Mizelle und Elektrolyt. Nachteilig ist jedoch, dass die relativ hohe Konzentration an Tensiden die Kompatibilität von MEKC mit massenspektrometrischer Detektion (MS) einschränkt, da Tenside empfindlich den Prozess der Elektrospray-Bildung (ESI) von Analyten stören können [16]. Ein Konzept, welches die Kompatibilität von CE und MS-Detektion nicht negativ beeinflusst, ist die elektrochemisch assistierte Injektion. Redoxaktive Neutralanalyten können während des Injektionsvorganges in geladene Spezies überführt und dann mittels CE getrennt werden. Eine weiterführende Beschreibung des EAI-CE-MS-Aufbaus erfolgt in Kapitel 1.5.2.

Allgemein lassen sich für die Kapillarelektrophorese im Vergleich zur HPLC sowohl Vor- als auch Nachteile formulieren. Die CE besticht dabei durch eine hohe Trenneffizienz, einem geringeren Lösungsmittelverbrauch und einem generell einfacheren instrumentellen Aufbau sowie kürzeren Analysezeiten. Nachteilig sind hingegen die schlechte Reproduzierbarkeit und Kontrolle des EOF und die Nichtverwirklichung der Maßstabsvergrößerung für präparative Zwecke. Diese kurze Zusammenfassung verdeutlicht, dass sich beide Trennprinzipien gut ergänzen können und jeweils an den Punkten ihre Vorteile geltend machen, an denen die andere Trenntechnik an ihre Grenzen stößt.

### 1.2.2. Nicht-wässrige Kapillarelektrophorese

Die nicht-wässrige Kapillarelektrophorese (*nonaqueous capillary electrophoresis*, NACE) stellt eine Besonderheit dar, da zumeist rein wässrige Elektrolytlösungen für die kapillarelektrophoretische Trennung genutzt werden. Organische Lösungsmittel können zur Modifizierung des EOF zugegeben werden [17].

Werden jedoch geeignete Puffersysteme verwendet, kann eine Trennung auch in rein organischen Lösungsmitteln realisiert werden. Die ersten Versuche wurden dazu 1984 von Waldbroehl und Jorgenson [18] durchgeführt. Die Verwendung organischer Lösungsmittel ist vor allem bei Löslichkeitsproblemen von Analyten im wässrigen Milieu vorteilhaft. Des Weiteren können sich Vorzüge in Bezug auf physikochemische Eigenschaften wie Viskosität  $\eta$  und Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , sowie Einflüsse auf die Solvatisierung der Analyten und deren Säure-Base-Verhalten ergeben. Diese Eigenschaften können sich entscheidend auf die elektrophoretische Mobilität des Analyten auswirken (vgl. Gleichung 4). Durch eine Mischung verschiedener Lösungsmittel kann eine Optimierung von Auflösung, Selektivität und Analysenzeit erreicht werden [19]. Nicht-wässrige Lösungsmittel, die für NACE geeignet sind, zeichnen sich durch gute Lösungseigenschaften für Analyten und

Puffersubstanzen aus. Zudem sollten sie chemisch stabil sein, eine niedrige Viskosität, eine hohe Dielektrizitätskonstante sowie einen geringen Dampfdruck vorweisen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Acetonitril und Methanol sowie Mischungen beider die am häufigsten eingesetzten Lösungsmittel in der NACE [20], zumal sie kommerziell in hoher Reinheit erhältlich sind.

Als Detektionsverfahren bieten sich UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie, amperometrische Methoden und ESI-MS-Detektion an. Die UV-Detektion stellt dabei das wichtigste Verfahren dar. Aufgrund der geringeren Leitfähigkeit organischer Lösungsmittel können Kapillaren mit größerem Innendurchmesser verwendet werden. Eine starke Aufheizung durch Joule'sche Wärmeentwicklung findet nicht statt. Die Empfindlichkeit der UV-Detektion wird somit ohne Verlust an Trenneffizienz durch Vergrößerung der Detektionsschichtdicke erhöht [21]. Bei amperometrischen Methoden kann der größere Potentialbereich (trockener) nicht-wässriger Lösungsmittel ausgenutzt werden. Wasser besitzt einen Potentialbereich von etwa -1 bis +1,5 V, bevor es zur Elektrolyse kommt. Im Vergleich dazu kann man bei Verwendung von Acetonitril einen Bereich von -3 bis +3 V abdecken.

Diesen Aspekt kann man zudem bei der elektrochemisch assistierten Injektion nutzen und Redoxprozesse in einem bedeutend größeren Potentialbereich untersuchen [8]. Für die Kopplung von NACE und ESI-MS sprechen die geringe Oberflächenspannung und die leichte Verdampfbarkeit organischer Lösungsmittel, so dass eine Ionisierung im Elektrospray deutlich begünstigt wird und eine Verbesserung der Detektionsgrenzen auftritt [22]. Die hauptsächliche Motivation der Verwendung nicht-wässriger Lösungsmittel in der CE-MS-Kopplung stellen jedoch trennmethodische Aspekte dar, wie systematische Untersuchungen von NACE-MS gezeigt haben. Dabei verdeutlichte sich jedoch auch, dass die Empfindlichkeitsvorteile von Methanol oder Acetonitril als Lösungsmittel gegenüber wässrigen Systemen nur sehr gering sind. Es wurde hervorgehoben, dass NACE-MS eine sehr vielseitige Methode darstellt, die mit ihren Möglichkeiten des organischen Lösungsmittelleinsatzes sehr erfolgreich zur kapillarelektrophoretischen Trennung bei analytischen Problemen beitragen kann [23].

### 1.3. Massenspektrometrie

Das Grundprinzip der Massenspektrometers vereint die Erzeugung von Ionen aus organischen oder anorganischen Stoffen, deren Trennung nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) sowie abschließend eine qualitative und quantitative Erfassung mit Hilfe eines Detektionssystems [24]. Die Massenspektrometrie stellt dabei eine destruktive Detektionsmethode dar, was bedeutet, dass der Analyt vollständig verbraucht wird und keine Rückgewinnung möglich ist.

Um eine Einschätzung der Leistungsfähigkeit von Massenspektrometern vornehmen zu können, werden die drei Leistungsdaten Empfindlichkeit, Nachweisgrenze und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis näher betrachtet.

Die Empfindlichkeit steht in Abhängigkeit zur Ionisierungseffizienz und der Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle. Allgemeinhin definiert sich die Empfindlichkeit bei der MS-Detektion als elektrische Ladung einer bestimmten Ionenspezies, die den Detektor pro Masse des eingesetzten Analyten erreicht. [25]

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) ist die geringste Menge an Analyt, die notwendig ist, um ein Signal zu erzeugen, das sich vom Hintergrundrauschen abhebt. Normaler Weise wird dafür ein Signal, dass mindestens dem dreifachen Rauschen entspricht, als Grundlage genommen. Die Nachweisgrenze gilt dabei nur für einen Analyten, der einem bestimmten analytischen Protokoll unterworfen ist. [25]

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise*, S/N) definiert die Unsicherheit einer Intensitätsmessung. Dabei wird das Verhältnis zwischen Intensität eines Signals relativ zum Rauschen quantifiziert, womit man ein quantitatives Maß für die Qualität des Signals erhält. Rauschen kann in elektronisches Rauschen, was durch die Elektronik des Gerätes verursacht werden kann, und in chemisches Rauschen, basierend auf chemischen Verunreinigungen, unterteilt werden. Es tritt nicht nur zwischen, sondern auch auf den Signalen auf. Da Rauschen statistisch auftritt, führen eine verlängerte Datenaufzeichnung und anschließende Summierung bzw. Mittelung der Spektren zu einer Reduktion des Rauschens. [25]

Ebenso spielen Parameter wie Massenauflösung, Massengenauigkeit, Massenbereich und Messrate eine wichtige Rolle. Die Massenauflösung definiert sich als minimaler Massenunterschied, den zwei Ionen aufweisen müssen, um noch in zwei Signalen getrennt voneinander detektiert werden zu

können. Das Verhältnis einer Masse  $m$  zum Massenunterschied  $\Delta m$  der nächsten, noch getrennt erscheinenden Masse gibt das Auflösungsvermögen  $R$  wieder (Gleichung 5). [25]

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Wie genau eine Masse eines Analyten bzw. Teilchens bestimmt werden kann, definiert die Massengenauigkeit. Der analysierbare Massenbereich eines Massenspektrometers wird durch den linearen dynamischen Bereich gekennzeichnet, in dem die Signalintensität direkt proportional zur Konzentration des Analyten ist. Die Messrate gibt die Anzahl der Messungen in einem festen Zeitintervall an. [26]

Der allgemeine Aufbau eines jeden Massenspektrometers beinhaltet eine Ionenquelle, einen Massenanalysator und einen Detektor. Die Arbeitsweise erfolgt unter Hochvakuum-Bedingungen. Man unterscheidet verschiedene Arten von Massenspektrometern, was vor allem auf unterschiedliche Analysatoren zurückzuführen ist.

In der Ionenquelle erfolgt die Ionisierung des Analyten. Dabei ist die Wahl der Methode natürlich abhängig von der Art der zu analysierenden Substanz. Es spielt eine entscheidende Rolle, wie schonend dieser Vorgang erfolgen soll. Bei sogenannten harten Ionisationstechniken, wie der Elektronenstoßionisation (EI) tritt eine starke Fragmentierung des Analyten auf. Der Molekülpeak ist oftmals nicht zu detektieren. Sanftere Methoden der Ionisation stellen die chemische Ionisation (CI) und die Elektrospray-Ionisation (ESI) dar. Nichtverdampfbare Proben werden mit Hilfe von Desorptionsmechanismen in die Gasphase überführt. Dazu gehören Methoden wie Fast-Atom-Bombardement (FAB) und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation (MALDI). Die Ionisation durch induktiv gekoppeltes Plasma (*inductively coupled plasma*, ICP) findet vor allem in der Elementanalytik im anorganischen Bereich Anwendung. Findet eine Kopplung eines Trennsystems mit Massenspektrometrie statt, so werden die Ionisationstechniken EI und CI bei Kopplung mit Gaschromatografie (GC) genutzt, während für die Kopplung von MS zu Trenntechniken, die auf flüssigen Matrices beruhen, wie CE und LC, mit ESI oder MALDI verwirklicht wird. [27,28]

Sektorfeld-Massenspektrometer werden heute eher selten angewendet. Ihre Funktionsweise begründet sich in der Ablenkung von Ionen in statistischen magnetischen oder zusätzlich elektrischen Feldern. In Quadrupol-Massenspektrometern erfolgt eine Beschleunigung der Ionen in einem elektrischen Feld, anschließend werden diese Ionen durch vier parallel verlaufende Stab-Elektroden, die einem Wechselfeld unterworfen sind, geleitet, wobei eine Selektierung nach dem Masse-zu-

Ladungsverhältnis auftritt. Nur Ionen mit einem definierten  $m/z$  erreichen den Detektor. Eine weitere Möglichkeit stellen Ionenfallen-Massenspektrometer dar. Dabei werden zuvor erzeugte Ionen durch elektromagnetische Felder in einem 2D- bzw. 3D-Quadrupolfeld gehalten. Durch Manipulation treten definierte Ionen aus und können detektiert werden. Im Speziellen unterscheidet man Quadrupol-Ionenfallen, lineare Fallen, Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-MS (FT-ICR) sowie Orbitrap. Ein weiterer Typ ist das Flugzeit-Massenspektrometer (*Time-of-Flight*, Tof). Während der praktischen Arbeit im Rahmen dieser Dissertation wurden alle Messungen fast ausschließlich mit einem Tof-MS durchgeführt, für das eine detailliertere theoretische Betrachtung in Kapitel 1.3.2. erfolgt. [27,28]

### 1.3.1. Elektrospray-Ionisation

ESI ist das bekannteste Verfahren unter den Atmosphärendruck-Methoden. Es eignet sich gut für große Moleküle, die leicht Ladung(en) annehmen, wie beispielsweise Nukleinsäuren und Proteine, was den massenspektrometrischen Zugang zur Bioanalytik darstellt [29]. Ebenso ist ESI eine gute Ionisationsmethode für kleine polare Moleküle, ionische Metallkomplexe sowie lösliche anorganische Analyten. Die Überführung von Ionen in die Gasphase beginnt bei ESI aus der kondensierten Phase bei Atmosphärendruck. Das Hochvakuum wird erst schrittweise erreicht, was die besonders schonende Ionisation ermöglicht. Bei großen Analyten kommt es meist zum Auftreten von Mehrfachladungen, wodurch der resultierende Massenbereich den meisten Massenanalysatoren zugänglich wird. Voraussetzung ist jedoch ein kontinuierlicher Fluss aus dem Umgebungsdruck in den Hochvakumbereich, was ein leistungsstarkes differentiell gepumptes System erfordert. [30]

Eine ESI-Quelle ist dabei nach folgendem Prinzip aufgebaut. Die Probenlösung wird, beispielsweise mittels Spritzenpumpe, über eine Sprühkapillare in die Sprühkammer eingebracht. Es findet eine Expansion des versprühten Aerosols in einen gegengerichteten heißen Stickstoff-Strom (*Dry Gas*) statt, der zudem als Wärmequelle dient und damit die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützt. Eine Transferkapillare verbindet die Sprühkammer, welche unter Atmosphärendruck steht, mit der ersten Pumpstufe. Anschließend gelangt ein Teil des Analyten über beide Skimmer in den Hochvakumbereich. Erst hier ist die Desolvatisierung der Ionen vollständig abgeschlossen. Im Massenanalysator erfolgen nun die Fokussierung der Ionen sowie eine abschließende Detektion. [27] Abbildung 6 (Kapitel 1.3.2.) zeigt diesen Aufbau bezogen auf ein ESI-Tof-MS, wie es im Rahmen dieser Dissertation Anwendung findet.

Ein vertiefter Blick soll daher auf die Erzeugung der desolvatisierten Ionen geworfen werden. Die Ionenerzeugung kann dabei in drei Stufen zusammengefasst werden. Zunächst wird ein elektrisch geladenes Spray erzeugt. Anschließend erfolgt die Reduktion der Tröpfchengröße, so dass letztendlich eine vollständige Freisetzung desolvatisierter Ionen stattfinden kann. Die Sprühkapillare besitzt ein Potential von 3-4 kV relativ zu einer etwa 1 cm entfernten zylindrischen Gegenelektrode. Dies führt zu einer Ausbildung eines elektrischen Feldes, so dass eine Ladungstrennung in der Elektrolytlösung stattfindet. Dabei verformt sich der Meniskus zum sogenannten Taylor-Konus, wenn die kritische Feldstärke erreicht wird [31,32].

Von der Spitze des Konus emittiert ein sehr feiner Flüssigkeitsstrahl zur Gegenelektrode. Dieser Strahl bildet sich dabei am Punkt der höchsten Ladungsdichte aus. Eine Stabilität des Strahls liegt jedoch nicht über einen längeren Zeitraum vor. Dies resultiert in einem Zerfall in geladene Tröpfchen, die aufgrund der Coulomb-Abstoßung sehr schnell auseinander driften, womit sich ein geladenes Spray ausbildet, das Elektrospray.

Aufgrund der Ladungsauf trennung im Elektrospray kann die Ionisation sowohl im positiven Modus (Detektion von Kationen) als auch im negativen Modus (Detektion von Anionen) erfolgen. Die geladenen Tröpfchen besitzen einen großen Überschuss an Anionen bzw. Kationen, was wiederum unter Einfluss des elektrischen Feldes zur Deformation und letztendlichen Abstoßung weiterer kleinerer Tröpfchen führt.

Inwieweit elektrochemische Prozesse Einfluss auf die Ionisation im Elektrospray haben, wurde von namenhaften Forschern in einem Übersichtsartikel diskutiert [33]. Die Meinungen darüber, in welchem Ausmaß Elektrochemie dabei Einfluss auf die Bildung von Ionen oder Atomen nehmen kann, gehen weit auseinander. Allgemein kann jedoch festgestellt werden, dass elektrolytische Vorgänge im Elektrospray die Ionisation einer Vielzahl von Analyten nicht beeinflusst haben. Van Berkel – als Befürworter des Einflusses elektrochemischer Prozesse im Elektrospray – führt dies interesserweise auf „gut Glück“ und „Abweichungen in den Anwendungen“ zurück. Das typische Produkt einer stattfindenden Elektrolyse sind Eisen(II)-Kationen ( $Fe^{2+}$ ), welche aus der Korrosion einer Edelstahlkapillare als Sprühkapillare hervorgehen. Ein Konzentrationsanstieg von  $Fe^{2+}$  kann jedoch nicht detektiert werden, vor allem nicht, wenn Bedingungen vorliegen, die für die Analytik von intakten organischen Molekülen gewählt werden [34,35]. Betrachtet man nun den elektrochemischen Charakter der typischen Analyten von ESI-MS, oftmals Biomoleküle wie Peptide, Proteine oder Oligonukleotide [36], so werden diese unter sehr viel milderden Bedingungen oxidiert bzw. reduziert als beispielsweise die Bauteile der Sprühkammer, wie die Sprühkapillare, oder Lösungsmittel, wodurch

eine direkte Beeinflussung durch elektrochemische Prozesse quasi nicht stattfindet. Erweitert man jedoch den Bereich möglicher Analyten auf Metalle, Metall-Ligand-Komplexe [37,38], Organometalle, leitende Polymere und viele organische Stoffe und Arzneimittel mit niedrigen molaren Massen [39-42], so steigt der Einfluss elektrochemischer Vorgänge während der Elektrospray-Bildung deutlich an.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Beeinflussung der Analyten durch elektrochemische Prozesse während der Elektrospray-Bildung zunimmt, wenn aprotische Lösungsmittel vorliegen, die Sprühkapillare aus Edelstahl und nicht etwa aus einer Quarzglaskapillare (*Fused Silica*-Kapillare) besteht, oder ein niedriger Flüssigkeitsfluss in die Sprühkammer erfolgt, der die Reaktionszeit dadurch entscheidend verlängern kann [27,33].

### 1.3.2. Flugzeit-Massenspektrometer

Die Funktionsweise eines Flugzeit-Massenspektrometers beruht auf einem einfachen System: Während ihres Fluges entlang einer feldfreien Driftstrecke von bekannter Länge dispergieren Ionen mit unterschiedlichem  $m/z$ . Das bedeutet, dass schwere Ionen später den Detektor erreichen als leichtere Ionen. Voraussetzung ist dabei, dass diese Ionen einer gepulsten Ionenquelle entstammen. Dies wird erreicht, indem Ionenpakete aus einem kontinuierlichen Strahl gepulst ausgeworfen werden oder eine direkt gepulste Ionisationsmethode zugrunde liegt. Der Einsatz eines Tof-MS birgt vielerlei Vorteile. Zum einen steht ein quasi unbegrenzter  $m/z$ -Bereich zur Verfügung. Zudem wird in einigen wenigen Zehntelsekunden vom Ionisationsereignis ein vollständiges Massenspektrum erhalten. Es liegt eine hohe Empfindlichkeit von Tof-Analysatoren aufgrund ihrer guten Transmission der Ionen vor. Der instrumentelle Aufbau ist vergleichsweise einfach. Es kann eine exakte Massenbestimmung erreicht werden und es besteht zudem die Möglichkeit zu Tandem-MS-Experimenten.

Der Aufbau eines Tof-MS ist in Abbildung 6 skizziert. Die Ionisation erfolgt in der Sprühkammer (hier mittels ESI, siehe Kapitel 1.3.1.). Über die Transferkapillare werden die Ionen schließlich in den Massenanalysator eingebracht. Die Besonderheit besteht in der Verwendung eines Reflektors, das aus ringförmigen Elektroden mit zunehmendem Elektrodenpotential aufgebaut ist. Dadurch wird ein einfaches retardierendes Feld erzeugt, in welches Ionen eindringen, bis sie ihre kinetische Energie verlieren. Anschließend erfolgt der Auswurf aus dem Reflektor. Somit kann eine Flugzeitkorrektur stattfinden, was zu einer Fokussierung der Ionen führt, die in einem räumlichen Gebiet die Ionenquelle verlassen. Die Auswertung erfolgt durch das Auftreffen der geladenen Spezies auf einen

Mikrokanalplatten-Detektor (*micro channel plate, MCP*), was zu einer Multiplikation der Elektronen führt [43]. FT-ICR- und Orbitrap-Massenspektrometer hingegen messen Ströme, die aus den sich zwischen Detektorplatten bewegenden Ionenpaketen resultieren. Dabei werden Ionen nicht vom Detektor absorbiert, was eine mehrmalige Verwendung der Probe ermöglicht und zu der hohen Messgenauigkeit von Orbitrap- und FT-ICR-Geräten führt. Weitere in der Massenspektrometrie auftretende Detektoren sind beispielsweise Photomultiplier und Faraday-Auffänger. [3,27]

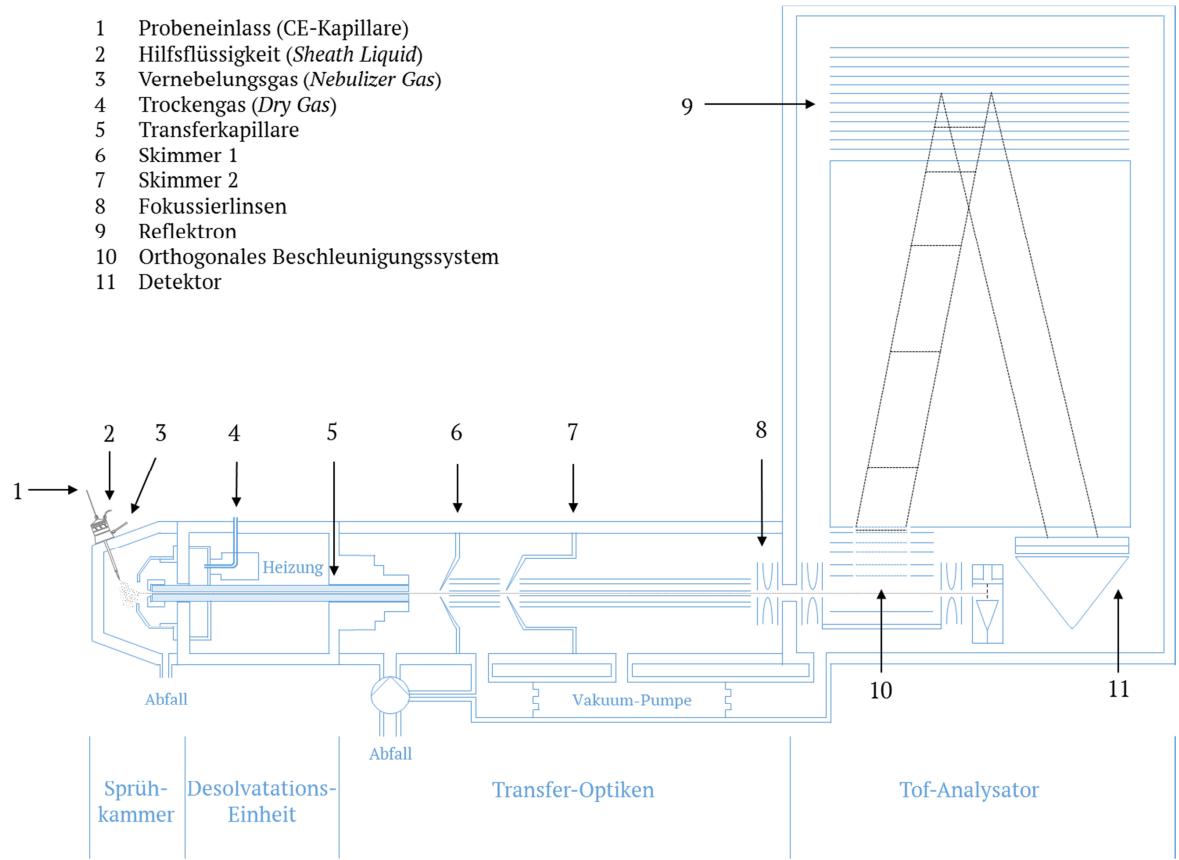


Abb. 6. Schematische Darstellung eines Flugzeit-Massenspektrometers mit ESI-Quelle. Grafik adaptiert aus: micrOTOF User Manual (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland).

## 1.4. Kopplung von Trenntechniken mit Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie stellt eine leistungsstarke qualitative sowie quantitative Detektionsmethode dar. Vor allem in der Analytik von biologischen Proben liegt der Vorteil in der Selektivität bezüglich Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen. Dennoch stellt die Massenspektrometrie keine fehlerfreie Methode dar, die ohne Kompromisse funktioniert und als „Allzweckwaffe“ in der modernen Analytik fungiert. Ein entscheidender Faktor, der die quantitative Leistung eines massenspektrometrischen Detektors beeinflusst, ist die Ionensuppression [44]. Dabei können Signale einzelner Analyten reduziert oder unterdrückt werden. Zum einen führen Probenmatrices, mehrere verschiedene Analytmoleküle, die gleichzeitig die ESI-Quelle erreichen, sowie Verbindungen, die sich nicht ursprünglich in der Probe befunden haben, aber durch Kontamination [45] während der Probenvorbereitung eingebracht wurden, zu Diskriminierung im ESI-Prozess [46]. Dieser Effekt tritt hauptsächlich während der frühen Phase der Elektrospray-Bildung auf. Mehrere Faktoren begünstigen die Ionensuppression, beispielsweise hohe Konzentrationen der Analyten und die Basizität des Lösungsmittels. Ebenso unterdrücken Moleküle mit hoher Masse Moleküle mit kleiner Masse, oder unpolare Analyten unterdrücken möglicherweise polare Moleküle [47].

Eine Möglichkeit, den Effekt der Ionensuppression zu reduzieren, ist die Verbindung von Massenspektrometrie mit Trennmethoden. Dabei spielt die Kombination von HPLC und MS eine herausragende Rolle. Eine weitere wichtige Trenntechnik zur Kopplung mit der Massenspektrometrie stellt die Kapillarelektrophorese dar. Mit beiden Trennmethoden soll erreicht werden, dass interessierende Analyten nicht im gleichen Zeitfenster die ESI-Quelle passieren und somit keine Ionensuppression diesbezüglich auftreten kann. Des Weiteren eluiert bzw. migriert der Analyt in einer (im Interesse des Analytikers möglichst schmalen) Bande, was zu einer ersten Fokussierung des Analyten führt. Zudem werden bedeutend geringere Konzentrationen benötigt, um eine Detektion zu ermöglichen, womit eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit realisiert wird. [48]

### 1.4.1. Flüssigchromatographie–Massenspektrometrie

Der prinzipielle Aufbau eines Flüssigchromatographie–Massenspektrometrie-Systems (LC–MS) besteht aus einem Autosampler, dem (HP)LC-System, der Ionisationsquelle als Verbindung zwischen LC und MS, und dem Massenspektrometer als Detektionseinheit [49]. Für die Verbindung von LC und MS gibt es einige Einschränkungen bezüglich Fließgeschwindigkeit und Zusammensetzung der mobilen Phase. Typische Umkehrphasen-HPLC-Systeme (*reversed phase*, RP-HPLC) gekoppelt mit MS benötigen als mobile Phase typischerweise eine Kombination aus Wasser mit Methanol oder

Acetonitril. Zudem sollten Zusätze der mobilen Phase verdampfbar sein, so dass hauptsächlich Ammoniumacetat, Essigsäure und Ameisensäure zugesetzt werden [50,51].

Es können verschiedene Arten der Ionisation als Schnittstelle zwischen HPLC und Massenspektrometer genutzt werden. Zwei weitere Methoden neben der Elektrospray-Ionisation sind die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) sowie die Photoionisation unter Atmosphärendruck (*atmospheric pressure photoionization*, APPI). Die Verbindung zwischen HPLC und MS erfolgt in diesen Fällen über ein API-Interface (*atmospheric pressure ionization*), was die einzige Methode darstellt, sanfte Ionisationsmethoden zu nutzen und somit den Zugang zur Analytik biologischer Proben zu erhalten [52]. Der Anwendungsbereich in der Bioanalytik erstreckt sich dabei über Metabolismus-Studien [53,54], Arzneimittel-Screening [55], Forschungsfelder der Proteomik [56,57] sowie Anwendungen in Toxikologie und Forensik [58]. Die essentiellen Stärken eines LC-MS-Systems liegen dabei in der Spezifität, die vor allem auch durch Tandem-MS-Experimente erreicht werden kann, in der großen Bandbreite der Anwendungsfelder und deren gute Praktikabilität, in der schnellen und flexiblen Entwicklung neuer Untersuchungsansätze, sowie der Detektionsart Tof-MS, die fähig ist, parallel Massenspuren aufzuzeichnen. Dadurch wird es dem Anwender ermöglicht, viele Informationen aus einem einzigen LC-MS-Lauf zu extrahieren [59].

Dennoch ist die Analysemethode LC-MS in der Routine-Analytik nicht ohne Einschränkungen zu sehen. Zum einen spielt die Wahl des internen Standards eine entscheidende Rolle. Werden anstelle von isotopenmarkierten Derivaten des Zielanalyten homologe Moleküle, die dem Zielanalyt strukturell sehr ähnlich sind, eingesetzt, kann es zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit und Linearität der Ergebnisse kommen. Grund dafür ist die eingangs erwähnte Ionensuppression, die bei koeluiierenden Analyten auftritt. Nur eine effiziente Probenaufbereitung und Vorfraktionierung minimiert den Effekt der Ionensuppression. Die Trennmethode Flüssigchromatographie stößt neben ihren zahlreichen Vorteilen jedoch an ihre Grenzen, wenn geladene Analyten aufgetrennt werden sollen. Hierfür bietet sich vor allem eine weitere Trennmethode an: die Kapillarelektrophorese [60,61].

#### 1.4.2. Kapillarelektrophorese–Massenspektrometrie

Mit der Verbindung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie (CE-MS) ergibt sich die Möglichkeit, chemische Verbindungen sehr schnell und mit hoher Trenneffizienz zu trennen und mittels MS online eine Identifizierung basierend auf der molekularen Masse zu realisieren [62]. CE-MS hat sich als Analysentechnik für eine große Bandbreite an analytischen Problemen bewährt –

von kleinen Analyten, anorganischen Ionen bis hin zu biologisch wichtigen Makromolekülen, wie Aminosäuren, Proteingemischen, einzelnen biologischen Zellen und Oligonukleotiden [63] sowie verschiedensten Pharmazeutika [64]. Die Kapillarelektrophorese wurde mit zahlreichen Typen von Massenspektrometern gekoppelt, wie beispielsweise Magnet-Sektorfeld-MS, Quadrupol-MS, Ion-Trap-MS, FT-ICR-MS und Tof-MS. Verschiedene Ionisationsarten wurden erprobt, wobei die Ionisation mittels Electrospray einen Durchbruch für die Routine-Analytik geschaffen hat [65]. CE-MS ergänzt dabei, und ersetzt auch in einigen Fällen, klassische Trenntechniken, wie LC-MS. Es ist jedoch hervorzuheben, dass sich eine CE-MS-Kopplung deutlich von einer LC-MS-Kopplung unterscheidet.

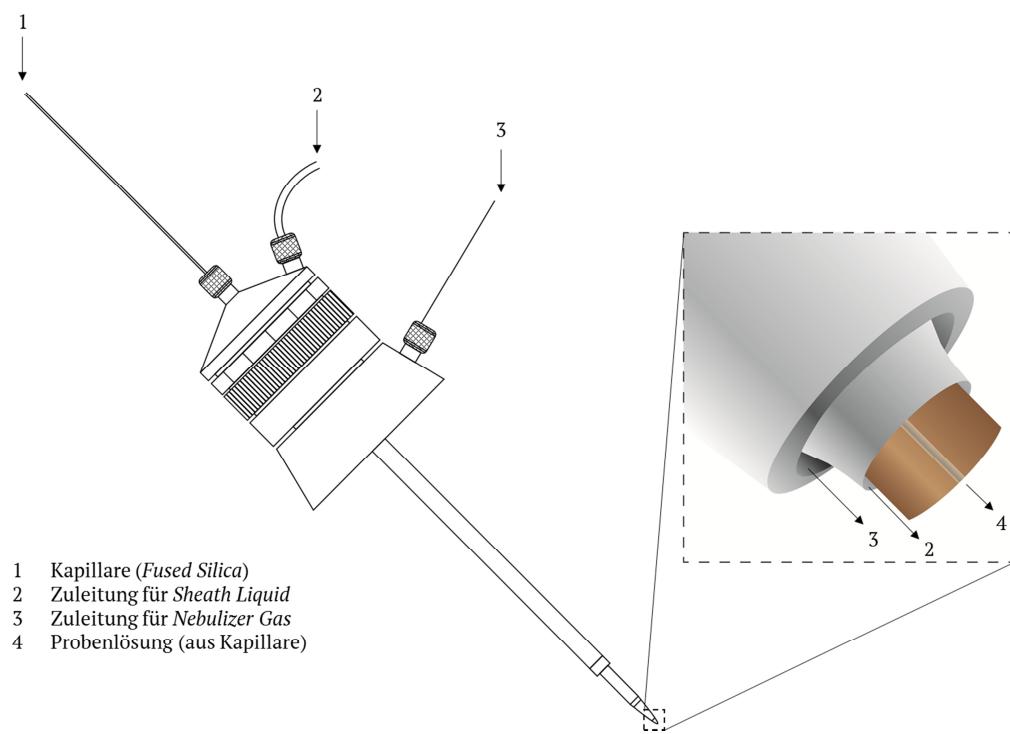


Abb. 7. *Sheath Liquid*-Interface für die Verbindung von CE und ESI-MS. Zeichnung ist an das Original-Interface (Agilent, Sprayer Kit (G1607A)) angelehnt.

Für die Verbindung von CE und ESI-MS wird, aufgrund der sehr geringen Flussraten (übliche Flussraten sind 200 nl/min!) am Kapillarausgang, ein spezielles Interface benötigt. Dabei haben sich zwei Arten bewährt. Zum einen gibt es eine sogenannte *Sheath-Flow*-Konfiguration (Abbildung 7). Diese zeichnet sich durch einen zusätzlichen Zufluss an Lösungsmittel, der *Sheath Liquid*, aus, was die niedrigen Flussraten der CE auf ein für ESI passendes Niveau bringt. Oftmals gibt es eine dritte Edelstahlkapillare, durch welche ein kontinuierlicher Gasfluss geleitet wird. Dieses *Nebulizer Gas* (oder auch *Sheath Gas*) unterstützt die Stabilisierung des Taylor-Konus und beschleunigt dabei die Verdampfung der Lösungsmittelmoleküle. Neben der verhältnismäßig einfachen Fertigung, der

Beständigkeit und der simplen Handhabung des Einsetzens der CE-Kapillare hat das *Sheath-Flow*-Interface den großen Vorteil, dass die Zusammensetzung der gesprühten Flüssigkeit unabhängig vom Trennpuffer der CE gestaltet werden kann [27,63]. Somit ist es beispielsweise möglich, die CE-Trennung in rein wässriger Lösung zu realisieren, was bei Nachempfindung physiologischer Bedingungen vor allem in der Bioanalytik von großem Vorteil sein kann [66]. Der Nachteil, den die Verwendung eines *Sheath-Flow*-Interfaces mit sich bringt, ist die niedrigere Sensitivität der Detektion, bedingt durch den großen Verdünnungseffekt.

Mit CE und ESI sind zwei separate Stromkreise vorhanden, die sich bei Verbindung beider Techniken nicht beeinflussen dürfen. Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau einer CE-MS-Kopplung und verdeutlicht die Separation der beiden Stromkreisläufe. Für die Kopplung von CE und MS wurde das Puffergefäß an einem Ende der Kapillare entfernt und eine direkte Verbindung mittels ESI-Interface zum Massenspektrometer hergestellt. Die Besonderheit liegt darin, dass sich CE-Stromkreis und ESI-Stromkreis an der Spitze des ESI-Interfaces treffen. Durch eine Erdung des ESI-Interfaces wird die Kopplung von CE und ESI-MS ohne störende Interferenzen ermöglicht. Ein geschlossener elektrischer Stromkreis an der Sprayer-Spitze des Interfaces wird durch die *Sheath Liquid*, die die Spitze umgibt, realisiert. Abhängig davon, ob die Ionisation mittels Electrospray im positiven (oder im negativen) Modus stattfindet, verwendet man eine negative (bzw. positive) Hochspannung direkt am ESI-Interface.

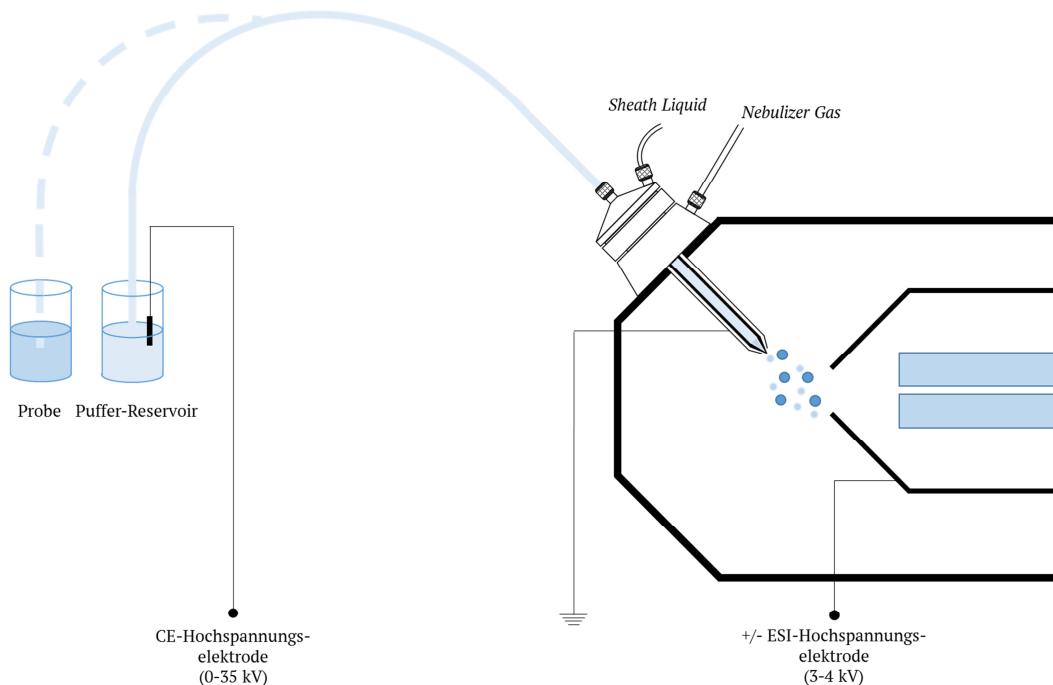


Abb. 8. Schematische Darstellung der beiden Stromkreise bei CE-ESI-MS.

Eine weitere Möglichkeit, CE mit ESI-MS zu verbinden, ist es, *sheathless* zu arbeiten. Hierbei ist die elektrische Verbindung zum Kapillarenden der CE-Kapillare durch den direkten Kontakt zwischen Metall und Flüssigkeitsfilm an oder in der unmittelbaren Nähe des Kapillarendes gegeben. Es sind eine Vielzahl von Interfaces entwickelt worden [67]. Da kein Verdünnungseffekt wie bei *Sheath Liquid*-Interfaces auftritt, besticht diese Technik durch eine sehr hohe Sensitivität. Die Limitierung von *Sheathless*-Interfaces liegt darin, dass lediglich CE-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von maximal 25  $\mu\text{m}$  verwendet werden können. Ein weiteres Problem aufgrund des Designs des Interfaces stellt die Blasenbildung durch Wasserzersetzung in der CE-Kapillare infolge von Redoxreaktionen an der Elektrode dar. Durch diese Limitierungen ist es nicht allzu verwunderlich, dass in der Mehrzahl an Publikationen CE-MS betreffend die *Sheath Liquid*-Variante gewählt wird. Mit einer angepassten Optimierung bezüglich der Parameter *Sheath Liquid*-Zusammensetzung, Fließgeschwindigkeit und *Nebulizer Gas*-Einstellungen kann eine robuste Methode mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse entwickelt werden. [68]

Neben dem besonderen instrumentellen Aufbau spielt die Wahl des Hintergrundeletrolyten für den CE-Puffer eine wesentliche Rolle. Zunächst muss er leicht verdampfbar sein, um möglichst keinen negativen Einfluss auf die Electrospray-Bildung auszuüben. Dies schließt typische Trennpuffer wie Borat- und Phosphatpuffer aus. Eine sehr gute Alternative sind stattdessen Elektrolytlösungen basierend auf Acetat- und Formiat-Zusätzen [69].

## 1.5. Elektrochemie-Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Detektion von Produkten und Intermediaten elektrochemischer Reaktionen kann eine direkte Kopplung von Elektrochemie und MS (EC-MS) genutzt werden. Damit wird der große Vorteil der hohen Informationsdichte massenspektrometrischer Detektion gegenüber elektrochemischer Detektion genutzt. Mit der Veröffentlichung von Bruckenstein und Gadde [70], in der sie über die Kopplung einer porösen Elektrode mit einem Gaseinlass-System eines Massenspektrometers berichten, wurde der Startschuss für eine vielversprechende Analysentechnik gegeben.

Es gibt zwei grundlegende Möglichkeiten, elektrolytische Reaktionen mittels Massenspektrometrie zu untersuchen. Mit der Erkenntnis, dass die Kapillarspitze des ESI-Sprayers Redoxreaktionen induzieren kann, entwickelte sich das ESI-Interface selbst zur elektrochemischen Zelle [71]. Der große Vorteil ist dabei der einfache instrumentelle Aufbau, der ohne technischen Zusatz auskommt. Nachteilig ist jedoch, dass die Elektrospray-Quelle keine definierte und kontrollierbare Elektrochemie aufweist, wie es bei einer elektrochemischen Durchflusszelle der Fall ist. Diese stellt die zweite Möglichkeit dar, elektrochemische Reaktionen online massenspektrometrisch zu analysieren. Die Kopplung einer elektrochemischen Durchflusszelle mit verschiedenen Ionisationstechniken des MS ist dabei vielfach realisiert worden [72]. Die direkte Verbindung zur Elektrospray-Ionisation birgt jedoch einige Herausforderungen. Aufgrund der Hochspannung, die für die Erzeugung des Elektrosprays benötigt wird, muss eine Entkopplung des Potentials der elektrochemischen Durchflusszelle erreicht werden, beispielsweise mittels Erdung. Ein weiteres Problem stellt die Wahl des Elektrolyten dar. Die in der Elektrochemie üblicherweise relativ hohen Konzentrationen oftmals nicht verdampfbarer elektrolytischer Zusätze stören den ESI-Prozess empfindlich und können zu Ionensuppression führen. Der Ersatz der meist in der Elektrochemie verwendeten Alkalosalze durch beispielsweise Lithiumtriflate zeigte dabei einen sehr viel geringeren Einfluss auf die Elektrospray-Bildung und Signalintensität der Analyten [73]. Ebenso zeigten sich Ammoniumacetat und -formiat als sehr gute alternative Elektrolyte.

Eine besondere Anwendung von EC-(ESI-)MS besteht in der Simulation von biologischen Redoxprozessen. Es wird somit die oxidierende (bzw. reduzierende) Wirkung von Enzymen nachempfunden und mit den Vorzügen der sanften Ionisation durch Elektrospray kombiniert [74]. Allgemeinhin wird deutlich, welch großes Potential eine EC-MS-Kopplung vor allem in der pharmazeutischen Forschung aufweist, da eine schnelle und technisch simple Abschätzung der Stabilität potentieller Wirkstoffe gegenüber Redoxprozessen ermittelt werden kann.

### 1.5.1. Verbindung von Elektrochemie, Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie

Betrachtet man die vielversprechenden Ergebnisse aus EC-MS-Kopplungen, so treten zwei grundlegende Fragestellungen auf:

- Kann eine Ionensuppression bei gleichzeitiger Detektion verschiedener Redoxprodukte ausgeschlossen werden?
- Wie können weitere Informationen über den Analyten gewonnen werden, wie etwa Aussagen über Polarität oder Säure-Base-Verhalten?

Die Antworten dazu liefert die Implementierung eines Trennsystems, wie der Flüssigchromatographie oder der Kapillarelektrophorese. Eine Kopplung von EC-MS mit LC kann dabei auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: Einmal kann ein (komplexes) Gemisch chromatographisch getrennt werden, wobei im Anschluss eine Oxidation/Reduktion von Einzelsubstanzen erfolgt. Massenspektrometrisch werden dann alle Oxidations- bzw. Reduktionsprodukte der Einzelverbindung erfasst [75]. Eine Ionensuppression wird dahingehend minimiert, dass komplexe Proben zuvor in Einzelsubstanzen separiert wurden. Sie kann jedoch nicht in Bezug auf die gebildeten Redoxprodukte ausgeschlossen werden. Die zweite Möglichkeit, LC mit EC-MS zu verbinden, ist die Eingliederung eines Trennsystems nach der elektrochemischen Konvertierung. Dies führt zu einem Mehrgewinn an Informationen über die verschiedenen Redoxprodukte [76].

In Hinblick auf das große Feld der Metabolismus-Simulationen von pharmazeutischen Wirkstoffen spielt nicht nur die Nachahmung des Phase I-Metabolismus, initiiert durch Oxidation durch die Familie der Cytochrom P450-Enzyme, eine Rolle, sondern ebenso Konjugationsreaktionen des Phase II-Metabolismus. Lohmann und Karst [77] zeigten einen Versuchsaufbau, mit dem eine sich an die Oxidation von Toremifen, einem Östrogen-Antagonisten, anschließende reaktive Umsetzung mit Glutathion in Anwesenheit des Enzyms Glutathion-*S*-Transferase realisiert werden konnte. Somit besteht die Möglichkeit, im Labormaßstab den vollständigen Metabolismus von Pharmazeutika zu simulieren.

### 1.5.2. Kopplung von elektrochemisch assistierter Injektion, Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie

So groß die Vorteile der LC-MS-Kopplung mit Elektrochemie erscheinen, so schnell stößt sie an ihre Grenzen, wenn geladene Produktspezies chromatographisch getrennt werden müssen. Geladene

Analyten lassen sich dagegen hervorragend kapillarelektrophoretisch separieren, wobei positive, negative und neutrale Spezies in einem einzigen Lauf detektiert werden können. Um Redoxstudien mit einem CE-MS-Aufbau durchführen zu können, wurde der 2003 von Matysik [8] entwickelte Ansatz der elektrochemisch assistierten Injektion weiterentwickelt [9], womit der Beginn für die direkte Verbindung zweier leistungsstarker Techniken mit der Elektrochemie markiert wurde. Es besteht nun die Möglichkeit, wichtige Informationen über Analyten, die während der EAI gebildet werden, aufgrund ihrer unterschiedlichen elektromigrativen Eigenschaften zu erhalten und Aussagen über Ladungszustand und Säure-Base-Verhalten bei verschiedenen pH-Werten zu treffen.

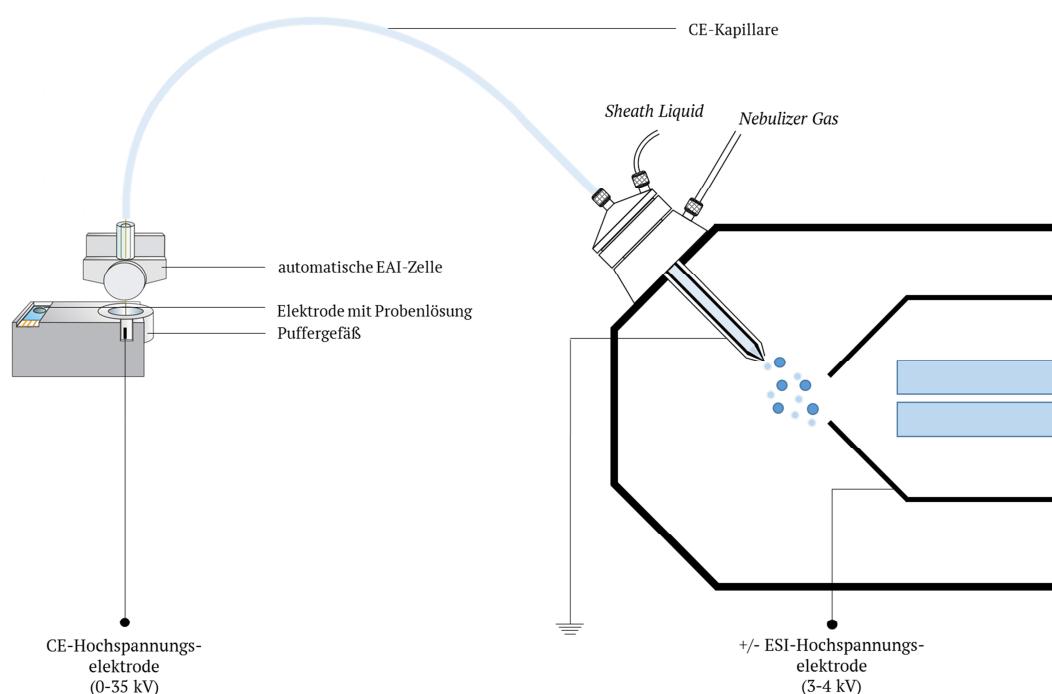


Abb. 9. Schematische Darstellung des EAI-CE-MS-Aufbaus. Gezeigt wird die Version der automatischen EAI-Zelle, deren genauer Aufbau in Kapitel 4.4.4. diskutiert wird.

Ein weiterer Vorteil umfasst die Sensitivitätserhöhung bei massenspektrometrischer Detektion von Analyten, die an sich eine niedrige Ionisierungseffizienz während des Elektrospray-Ionisationsprozesses aufweisen [78]. Eine wichtige Anwendung der Verbindung von EAI-CE-MS ist die Simulation biologischer Redoxvorgänge, wie bei Oxidationsstudien des Nukleosids Guanosin [66] oder zyklischen Nukleotiden [79] gezeigt werden konnte. Die Möglichkeit unter physiologischen Bedingungen, d. h. völlig frei von organischen Lösungsmitteln, zu arbeiten, zeigt sich gerade in diesem Zusammenhang gegenüber der LC als großer Vorteil.

Als Fazit lässt sich formulieren: EAI-CE-MS besitzt ein großes bioanalytisches Potential für oxidative/ reduktive Metabolismus-Studien von Pharmazeutika sowie der Aufklärung elektrochemischer Prozesse in biologischen Zellen.

## 1.6. Modellsysteme und Analyten

### 1.6.1. Ferrocen und seine Derivate

Aufgrund seiner Redoxeigenschaften ist Ferrocen hervorragend für EAI-CE-MS-Studien geeignet. Bei einem Redoxpotential  $E^\circ$  von etwa 500 mV wird in einem einfachen Ein-Elektronen-Transfer das einfach positiv geladene Ferrocenyl-Ion gebildet. Neben Ferrocen (**Fc**) werden drei verschiedene Ferrocenderivate untersucht: Ferrocenmethanol (**FcMeOH**), Decamethylferrocen (**FcMe<sub>10</sub>**) sowie Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (**OmPyFc**) (Abbildung 10).

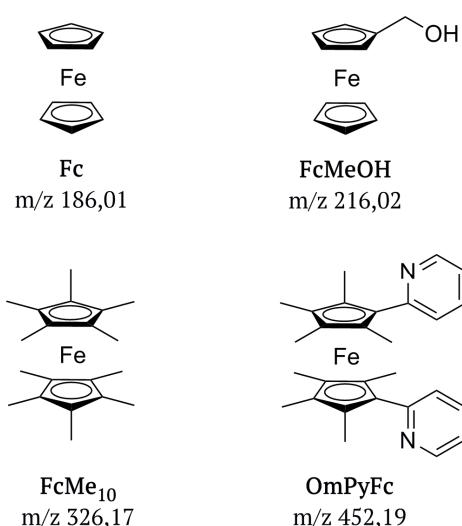


Abb. 10. Ferrocen und drei Derivate als Modellsystem für EAI-CE-MS-Experimente

Alle vier Substanzen haben den Vorteil, eine sehr gute Löslichkeit in Acetonitril zu besitzen. Somit kann eine kapillarelektrophoretische Trennung in einem rein organischen Lösungsmittel durchgeführt werden [19,20]. Mit **FcMe<sub>10</sub>** und **OmPyFc** sind zwei Analyten vertreten, die sich zusätzlich durch besondere Eigenschaften auszeichnen. Decamethylferrocen ist eine Verbindung, welche zunächst keine Ladung trägt. Sie wird jedoch auch ohne den direkten Einfluss der EAI relativ leicht in Gegenwart von Luftsauerstoff oxidiert, was auf das niedrige Redoxpotential ( $E^\circ = 1$  mV in Acetonitril, [80]) zurückzuführen ist. Bashkin und Kinlen [81] beschrieben bereits die besondere Stabilität des Decamethylferrocenyl-Ions. Das Ferrocenderivat **OmPyFc** zeichnet sich durch ein besonderes Protonierungsverhalten aus. Ein Pyridylsubstituent liegt unter den gegebenen Bedingungen einfach protoniert vor [82].

### 1.6.2. Oxidativer Stress und seine Wirkung auf das Nukleosid Guanosin

Das wohl bekannteste Biomolekül unserer Zeit ist Desoxyribonukleinsäure (DNA), das als Träger der Erbinformation sowohl individuell als auch gesellschaftlich eine hohe Relevanz besitzt. Um Anfälligkeitkeiten der DNA gegenüber Photosensibilisierung, Röntgenstrahlung und oxidierenden Reagenzien zu erklären, müssen die Komponenten der DNA bekannt sein und deren Eigenschaften und Verhalten analysiert werden.

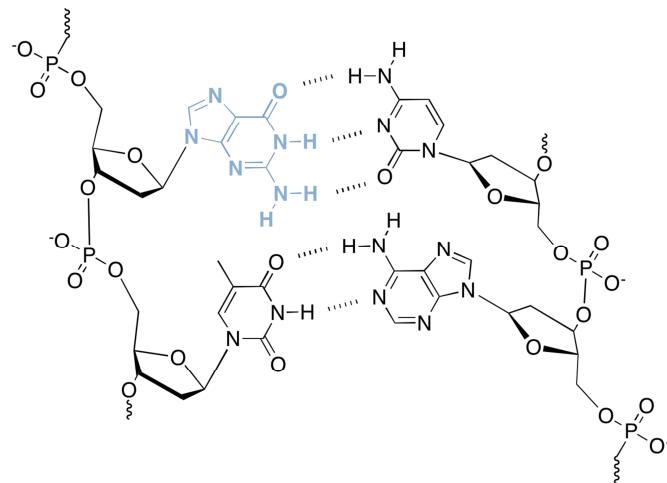


Abb. 11. Ausschnitt einer DNA-Sequenz mit zwei Basenpaaren (Guanin mit Cytosin sowie Thymin mit Adenin). Guanin ist blau gekennzeichnet.

Die DNA ist ein Bio-Polymer aus Nukleotiden, welche wiederum aus drei Bestandteilen zusammengesetzt sind. Vier unterschiedliche heterozyklische Basen sind mit dem Zucker 2'-Desoxy-D-Ribose verknüpft, der einen Phosphatrest trägt. Die beiden Basen Adenin und Guanin sind bipyklische Purin-Basen, Cytosin und Thymin hingegen monozyklische Pyrimidin-Basen. Eine oxidative Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder reaktive Stickstoffspezies (RNS) [83] wird entweder am Zucker-Rückgrat induziert, was zu Strangbrüchen führt, oder durch oxidativen Angriff auf eine der vier Basen erzeugt, was Basen-Fehlpaarungen, Basen-Addukte, abasische Positionen und DNA-Crosslinks generieren kann. Eine kumulierte Produktion von ROS bzw. RNS durch endogene und/ oder exogene Einflüsse wird als oxidativer Stress bezeichnet. Er tritt allgemeinhin besonders in Krebszellen auf, die eine veränderte Redox-Regulation des zellulären Signalweges aufweisen.

Die Bildung reaktiver Spezies kann auf vielfältige Weise erfolgen, wie (i) durch Bestrahlung mit UV-Licht, Röntgen- und Gammastrahlen, (ii) als Produkte metallkatalysierter Reaktionen (wie beispielsweise der Fenton-Reaktion), (iii) als Umweltgifte, (iv) durch Neutrophile oder Makrophagen

im Laufe von Entzündungsreaktionen im Körper [84], (v) als Nebenprodukte der mitochondrial-katalysierten Elektronen-Transport-Reaktionen [85] sowie weiterer Mechanismen. Obwohl reaktive Sauerstoffspezies in hoher Konzentration eine schädigende Wirkung aufweisen, indem sie Zellstrukturen wie beispielsweise Lipide, Membranen, Proteine und Nukleinsäuren, angreifen und zerstören, besitzen sie ein „zweites Gesicht“ und haben eine positive Wirkung auf physiologische Prozesse. So beeinflussen sie zahlreiche zelluläre Signalwege, sind in die Zellantwort gegen infektiöse Mittel involviert und stimulieren Mitogene zu einer (nicht spezifischen) Immunantwort. [86]

Eine menschliche Zelle ist circa  $1,5 \cdot 10^5$  oxidativen Angriffen pro Tag ausgesetzt [87]. Biologische Systeme sind jedoch in der Lage, defekte DNA-Sequenzen enzymatisch zu reparieren. Wird diese Reparatur gestört oder findet sie nur unzureichend statt, resultiert dies in Apoptose, Mutagenese [88] und/ oder Karzinogenese sowie Zell-Alterung [89].

Die Guanin-Oxidation spielt dabei eine besondere Rolle. So besitzt Guanosin das niedrigste Redoxpotential ( $E = 650$  mV; pH 9,25) aller Nukleoside und stellt damit ein bevorzugtes Ziel oxidativer Angriffe dar. Das in geschädigter DNA am häufigsten auftretende Oxidationsprodukt ist 8-Oxoguanosin (**8-Oxo-Gs**), wodurch es als „Marker“ für die Detektion oxidativen Stresses in DNA verwendet wird. Der Analyt zeichnet sich durch eine Keto-Enol-Tautomerie aus, wodurch in der Fachliteratur verschiedene Bezeichnungen zu finden sind. **8-Oxo-Gs** spielt eine wichtige Rolle während der Guanosin-Oxidation. Es wird sehr leicht gebildet, besitzt selbst eine mutagene und karzinogene Wirkung und stellt zudem ein Vorprodukt für weitere Oxidationsprodukte dar. Zum heutigen Wissensstand sind mehr als 100 Oxidationsprodukte des Guanosins bekannt, als wichtigste Vertreter sind dabei 2-Amino-Imidazolon [90], Guanidinohydantoin [91] sowie Spiroiminodihydantoin [92] zu nennen.

Eine weitere Eigenschaft des Guanosins, die gerade mit Blick auf die Kapillarelektrophorese sehr wichtig ist, wird durch das Protolyse-Verhalten in wässriger Lösung wiedergegeben. Guanosin besitzt zwei  $pK_s$ -Werte ( $pK_{s1} = 2,20$ ;  $pK_{s2} = 9,50$ ) [93], wodurch je nach pH-Wert drei unterschiedliche Ladungszustände generiert werden können.

Der Einfluss oxidativen Stresses ist jedoch nicht nur auf die Modifikation von DNA beschränkt, sondern auch weiterer Zellbestandteile. So sind mehrfach ungesättigte Fettsäure-Reste von Phospholipiden ein sehr sensitives Ziel für oxidative Angriffe durch ROS. Der schädigende Prozess der sogenannten Lipid-Peroxidation spielt bei der Entstehung von Arteriosklerose [94], Krebs und zahlreichen Entzündungsreaktionen [95] eine tragende Rolle. Des Weiteren ist eine Oxidation von

Proteinen mit Zellalterung und daraus resultierenden Erkrankungen verbunden. Eine Anhäufung oxiderter Proteine in lebenden Systemen kann zu einem permanenten Anstieg von ROS bzw. RNS führen. Ebenso wird eine Abnahme der antioxidativen Kapazität von Organismen beobachtet. Die Folge der Protein-Oxidation sind inter- und intra-Protein-Cross-Links. Gerade Cystein und Methionin sind für Angriffe durch ROS sehr anfällig [96,97]. Daraus resultiert jedoch ein positiver Nebeneffekt: Es wird vermutet, dass Methionin-Reste als Antioxidantien zum Zellschutz beitragen und Zellen vor weiteren oxidativen Schädigungen schützen [98].

### 1.6.3. Rutin als Antioxidans

Der Effekt von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wird durch die Wirkung nicht-enzymatischer Antioxidantien ebenso wie durch antioxidative Enzyme ausgeglichen [84]. Sehr effiziente enzymatische Antioxidantien sind beispielsweise Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase [99]. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherol (Vitamin E), Carotenoide, Schwefel-Antioxidantien (wie Glutathion, Thioredoxin und  $\alpha$ -Liponsäure), natürliche Flavonoide, Melatonin und weitere Verbindungen [100]. Je nach Hydrophilie des Antioxidans wirkt es in hydrophober Umgebung, wie Tocopherol, oder in hydrophiler Umgebung, wie Ascorbinsäure mit Dioxid(1-).  $\alpha$ -Liponsäure als Coenzym ist sowohl wasser- als auch fettlöslich und arbeitet damit sowohl im (hydrophoben) zellulären Membrangewebe als auch im (hydrophilen) Cytosol. Einige Antioxidantien besitzen die Fähigkeit, andere antioxidativ wirkende Verbindungen zu regenerieren. Dieser Prozess wird als antioxidatives Netzwerk bezeichnet und durch die Redoxpotentiale der jeweiligen Redoxpartner gesteuert. Tocopherol als auch Ascorbinsäure gehören zu diesen Antioxidantien [101].

Polyphenolische Verbindungen, deren wichtigste Gruppe Flavonoide darstellen, kommen oftmals natürlich vor und spielen als Nahrungsbestandteil eine wichtige Rolle in der Ernährung des Menschen. Das stetig wachsende Interesse an Polyphenolen und Flavonoiden im Speziellen ist vor allem auf die antioxidativen Eigenschaften und ihren möglichen Einfluss auf die menschliche Gesundheit zurückzuführen [102,103]. So werden Flavonoide zur Behandlung und Prävention kanzerogener [104] oder kardiovaskulärer Erkrankungen [105], Arthritis [106] und pathologischen Funktionsstörungen eingesetzt.

Die antioxidative Wirkung von Polyphenolen basiert zum einen auf der Interferenz bei der Oxidation von Lipiden durch freie Radikale. Durch eine schnelle Übertragung eines Wasserstoffatoms

auf Radikale wird deren oxidativer Angriff verhindert. Das entstandene Phenoxy-Radikal stellt ein relativ stabiles Radikal dar, was auf das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des Polyphenols zurückzuführen ist. Es agiert zudem als „Radikalfänger“ und reagiert mit weiteren freien Radikalen. Andererseits basiert die antioxidative Wirkung auf der Funktion eines Chelators, der redoxaktive Metallionen bindet. Dabei spielen Anzahl und Position der Hydroxylgruppen eine entscheidende Rolle [84]. Ein weiterer neuer Ansatz – die Rolle von Flavonoiden als Modulatoren der Zellantwort – wird ebenso in der Wissenschaft diskutiert und untersucht [107,108].

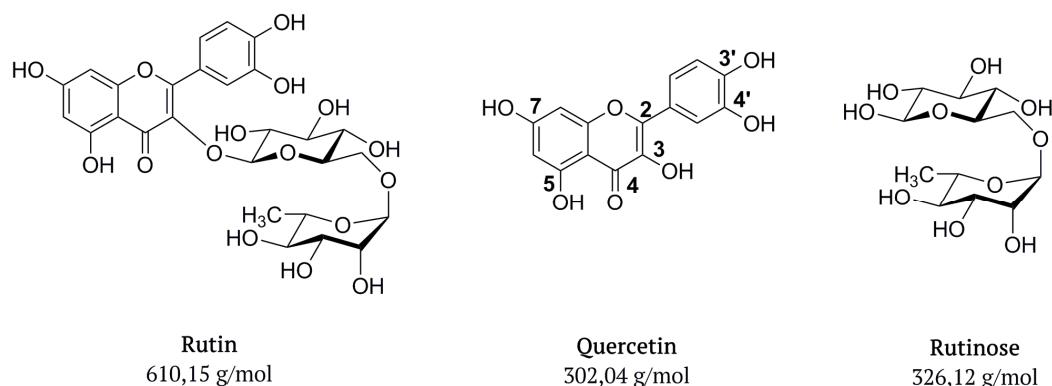


Abb. 12. Strukturformeln von Rutin, seinem Aglykon Quercetin und Rutinose.

Quercetin als Aglykon des Rutins gehört zur Gruppe der über 400 natürlich vorkommenden Flavonoide. Es ist ein Flavan-3,4-diol, das mit dem Zucker Rutinose O-glykosidisch verknüpft ist. Quercetin kann in zahlreichen Lebensmitteln in vergleichsweise hoher Konzentration nachgewiesen werden. Darunter sind vor allem Äpfel, Zwiebeln, Brokkoli, Kopfsalat und Tomaten zu nennen. Ebenso tritt es in den verarbeiteten Produkten Wein, Traubensaft und Tee-Aufgüssen auf [109]. Durch den hydrophilen Charakter des Rutins und des relativ hohen Molekulargewichts von 610 g/mol wird während des Metabolismus im menschlichen Körper eine Absorption im Dünndarm weitestgehend verhindert. Das Mikrobiom im Dickdarm produziert Glycosidasen, die eine Abspaltung des Aglykons Quercetin vom Zucker ermöglichen [110,111]. Der Abbau erfolgt bis zur 3,4-Dihydroxyphenylsäure, ein typisches Produkt des Flavonoid-Metabolismus im Darm [112]. Der metabolische Abbauweg von Quercetin im Darm wird in der Fachliteratur vielfach diskutiert. Abbildung 13 zeigt dazu eine grafische Zusammenfassung. Jaganath et al. [113] vermuten einen Stoffwechselweg über Taxifolin sowie Alphittonin, woraus 3,4-Dihydroxyphenylsäure resultiert. Ebenso detektierten sie eine „oxidierte Form“ des Quercetins, die ebenfalls zur 3,4-Dihydroxyphenylsäure abgebaut wird. Eine weitere Studie imitierte den intestinalen Metabolismus mit zwei Bakterienstämmen [114]. Es wird auch Taxifolin als Zwischenprodukt identifiziert, der weitere vermutete Abbauweg verläuft jedoch über Eriodictyol und einem

Chalkon-Derivat, das weiterfolgend zur 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure abgebaut wird. Dieser kurze Exkurs verdeutlicht, wie wichtig zusätzliche analytische Methoden sind, um eine umfassende Aufklärung metabolischer Prozesse beschreiben zu können. Dabei sollten die Bedingungen so nah wie möglich an den physiologischen Begebenheiten liegen.

Neben dem biochemischen und pharmazeutischen Hintergrund besitzt Rutin weitere Eigenschaften, die es gerade für die kapillarelektrophoretische Analytik interessant machen können. Drei protische Hydroxylgruppen generieren je nach pH-Wert bis zu vier unterschiedliche Ladungszustände. Unter sauren Bedingungen liegt Rutin neutral geladen vor. Im Alkalischen zwischen pH 9 und pH 12 liegt vorrangig die zweifach deprotonierte Form vor. Im stark alkalischen Bereich ist Rutin dreifach deprotoniert und somit dreifach negativ geladen [115]. Elektrochemisch betrachtet, weist Rutin zwei Redoxpotentiale auf. Bei niedrigeren Potentialen wird die Oxidation der 3',4'-Dihydroxylsubstituenten beobachtet. Diese erfolgt reversibel. Weiterhin findet eine irreversible Oxidation der 5,7-Dihydroxyl-Gruppe bei höheren Potentialen statt [116].

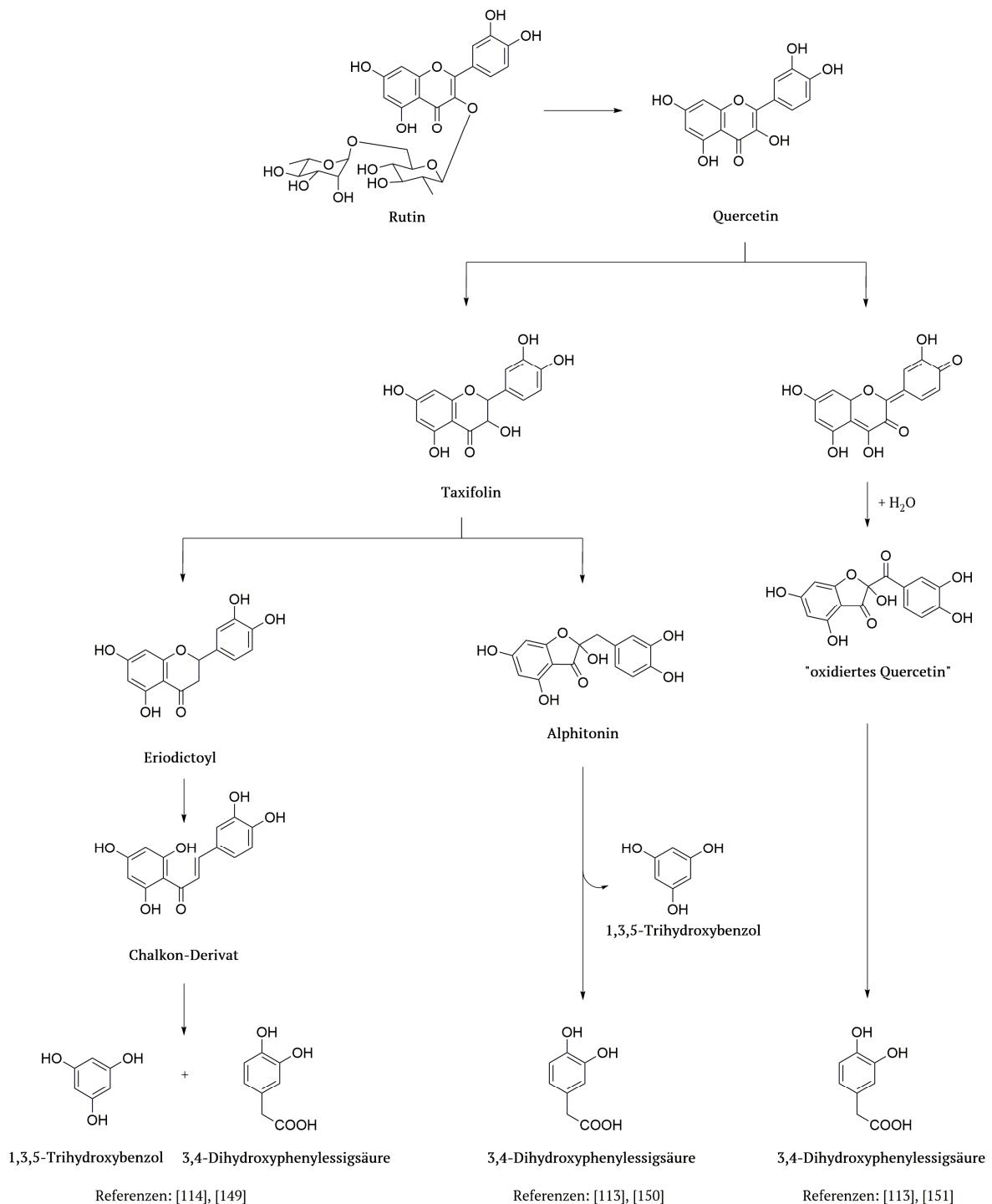


Abb. 13. In der Literatur vermutete metabolische Abbauwege des Rutins im Darm. Zusammenfassung ist adaptiert aus [113,114,149-151].

## 2. Kapitel

### Motivation und Ziel der Arbeit

Um das große Potential kapillarelektrophoretischer Trennungen nutzen zu können, muss die Möglichkeit realisiert werden, neutrale Analyten zu separieren und anschließend zu detektieren. Der Einsatz Mizellenbildender Tenside zeigte sich in verschiedenen Arbeiten als Durchbruch [117]. Durch den notwendigen Einsatz von Salzen im Hintergrundeletkrolyten sowie schwerflüchtiger Tenside treten jedoch Interferenzen auf, die das Signal bei massenspektrometrischer Detektion erheblich stören können. Verschiedene Entwicklungen umgehen die Inkompatibilität von MEKC und MS, wie beispielsweise der Einsatz flüchtiger Hintergrundeletkrolyten [118] oder die Entwicklung eines neuen Interfaces, das die Kopplung von MEKC und ESI-MS realisiert [119].

Eine sehr elegante Lösung, ungeladene Spezies in geladene Analyten zu überführen, wurde mit der elektrochemisch assistierten Injektion von Matysik [8] eingeführt. Redoxaktive Analyten können somit bereits während der Injektion in ein Kapillarfließsystem durch Oxidation bzw. Reduktion in einer speziell designten Zelle in geladene Analyten umgesetzt werden. Eine Trennung mittels CE wird nun ohne den Zusatz von Tensiden durchgeführt. Die Kopplung von EAI-CE an ein Massenspektrometer wird im Rahmen dieser Dissertation erstmalig realisiert.

Die Verbindung von Elektrochemie und Kapillarelektrophorese soll nun genutzt werden, um Mechanismen, die bei Oxidations- bzw. Reduktionsvorgängen auftreten, zu untersuchen. Die flexible Gestaltung des Hintergrundeletkrolyten bei CE-Trennungen ermöglicht dabei sowohl eine Trennung unter nicht-wässrigen Bedingungen als auch eine Trennung der Analyten unter rein wässrigen, sogar physiologischen Bedingungen. Gerade in der bioanalytischen Forschung kann eine Trennung unter physiologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle spielen, wenn Grundlagen von Oxidationsvorgängen untersucht werden sollen. Um elektrochemische Vorgänge unter physiologischen Bedingungen mittels einfachen elektrochemischen Experimenten oder EAI-CE-MS

nachahmen zu können, müssen methodisch verschiedene Parameter wie Spannung während der Oxidation, das Elektrodenmaterial, die Pufferzusammensetzung sowie ein möglicher Reaktanden Zusatz diskutiert werden.

Die Simulation von oxidativem Stress wird am Beispiel des Guanosins intensiv mit dem EAI-CE-MS-Aufbau untersucht. Eine chromatographische Trennung der Oxidationsprodukte des Guanosins konnte in der bisherigen Forschung nur unzureichend realisiert werden [120]. Es soll gezeigt werden, dass EAI-CE-MS nicht nur als Ergänzung zu EC-(LC-)MS-Methoden zu deuten ist, sondern eine Vielfalt an Informationen zur Aufklärung biologischer Prozesse generiert werden kann.

Ein weiteres Feld bioanalytisch interessanter Verbindungen stellen in diesem Zusammenhang Antioxidantien dar. Als ein Vertreter von ihnen wird Rutin, sowie dessen Aglykon Quercetin, untersucht. Nicht nur die vorliegenden Hydrolyse-Eigenschaften führen zu mechanistisch interessanten Ergebnissen. Auch aufgrund eines technischen Umbaus der EAI-Zelle im Rahmen des Arbeitskreises um Prof. Matysik [11] führt der Einsatz von kommerziellen Siebdruckelektroden (SPE, *Screen-Printed Electrodes*) sowohl zu bedeutend kleineren Probenvolumina von etwa 50 µl (gegenüber 3 ml im zuvorigen Aufbau!), als auch zu einer großen Variabilität der Elektrodenmaterialien, welche für die Untersuchung der oxidativen Eigenschaften von Rutin herangezogen werden können.

Die Anwendungsmöglichkeiten gestalten sich als sehr umfassend und verdeutlichen das große Potential von EAI-CE-MS, auch aufgrund der flexiblen Methodenentwicklung, die mit dem Trennsystem Kapillarelektrophorese einhergeht.

## 3. Kapitel

### Publizierte Fachartikel als Erstautorin

In den nächsten Kapiteln *4. Kapitel: Experimenteller Teil, 5. Kapitel: Trennung neutraler Analyten: Ferrocen und seine Derivate als Modellanalyten sowie 6. Kapitel: Simulation des oxidativen Stresses von Guanosin* werden Abbildungen, Tabellen und Textpassagen adaptiert auf Grundlage der folgenden beiden Publikationen genutzt. Es wird eine kurze Zusammenfassung der Publikationen (in englischer Sprache) gegeben. Die betreffenden Abschnitte und Abbildungen sind im folgenden Textverlauf entsprechend mit [P1] und [P2] gekennzeichnet.

- [P1] **A novel approach for the separation of neutral analytes by means of electrochemically assisted injection coupled to capillary electrophoresis – mass spectrometry**  
R. Scholz, F.-M. Matysik, Analyst 136 (2011) 1562.

A novel concept for capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE–MS) studies of neutral analytes is presented. The experimental approach is based on the implementation of electrochemically assisted injection (EAI) which enables the generation of charged species from neutral analytes. In this way electrophoretic separations can be performed without the use of surfactants leading to an excellent compatibility with ESI–MS. Various ferrocene species have been used as model compounds to demonstrate the potential of the EAI–CE–MS technique.

- [P2] **Simulation of oxidative stress of guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine by electrochemically assisted injection–capillary electrophoresis–mass spectrometry**  
R. Scholz, P. Palatzky, F.-M. Matysik, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 687.

Oxidative stress plays a crucial role in DNA and RNA damage within biological cells. As a consequence, mutations of DNA can occur, leading to disorders like cancer and neurodegenerative and cardiovascular diseases. The oxidative attack of guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine is simulated by electrochemistry coupled to capillary electrophoresis–mass spectrometry. The electrochemical conversion of the compound of interest is implemented in the injection protocol termed electrochemically assisted injection (EAI). In this way, oxidation products of guanosine can be generated electrochemically, separated by capillary electrophoresis, and detected by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (EAI–CE–MS). A fully automated laboratory-made EAI cell with an integrated buffer reservoir and a compartment holding screen-printed electrodes is used for the injection. In this study, parameters like pH of the sample solution and the redox potential applied during the injection were investigated in terms of corresponding formation of well-known markers of DNA damage. The important product species, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, was investigated in a separate study to distinguish between primary and secondary oxidation products. A comparison of product species formed under alkaline, neutral, and acidic conditions is presented. To compare real biological systems with an analytical approach for simulation of oxidative stress, it is desirable to have a well-defined control over the redox potential and to use solutions, which are close to physiological conditions. In contrast to typical HPLC–MS protocols, the hyphenation of EAI, CE, and MS enables the generation and separation of species involved without the use of organic solvents. Thus, information of the electrochemical behavior of the nucleoside guanosine as well as the primary oxidation product 8-oxo-7,8-dihydroguanosine can be characterized under conditions close to the physiological situation. In addition, the migration behavior found in CE separations of product species can be used to identify compounds if several possible species have the same mass-to-charge values determined by MS detection.

## 4. Kapitel

# Experimenteller Teil

### 4.1. Chemikalien und Materialien

*Fused Silica*-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 360 µm und verschiedenen Innen-durchmessern (50 µm, 75 µm) wurden von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) bezogen. Als Siebdruckelektroden (SPE) wurden zum einen Kohlenstoff-SPE (SPCE, Modell DS110) sowie Kohlenstoff-Nanofaser-SPE (SPE-CNF, Modell DS110CNF) der Firma DropSens (Llanera, Spanien) verwendet. Wasser zur Herstellung verschiedener Puffer und *Sheath Liquid*-Lösungen wurde mit einem Astacus System (MembraPure, Bodenheim, Deutschland) aufbereitet.

Alle weiteren Chemikalien, die im Rahmen der Dissertation Anwendung fanden, folgen nun alphabetisch geordnet. Alle Chemikalien besaßen mindestens analytische Qualität, Lösungsmittel besaßen mindestens HPLC-Qualität.

Acetonitril (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ameisensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ammoniumhydrogencarbonat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), Coffein (ABCR, Karlsruhe, Deutschland), Decamethylferrocen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ferrocen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Ferrocenmethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland), Guanosin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Natriumformiat (Merck, Darmstadt, Deutschland), Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. U. Siemeling, Kassel, Deutschland [121]), 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin (Carbosynth Limited,

Compton-Berkshire, UK), Phosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), Rutin · 3 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

## 4.2. Geräte

Zur Durchführung cyclovoltammetrischer Messungen wurde als Potentiostat das  $\mu$ Autolab III (Metrohm, Herisau, Schweiz) verwendet. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes verschiedener Pufferlösungen erfolgte mit Hilfe eines pH-Meters (Schott, Mainz, Deutschland). Fließzell-Experimente wurden mit einer Fließzelle speziell für Siebdruckelektroden (Modell DRP-FLWCL) von DropSens (Llanera, Spanien) durchgeführt. Die analytische Probe wurde über eine Spritzenpumpe (Linomat, Modell 790185) zugeführt.

Die CE-MS-Experimente erfolgten mit einem laborgefertigten CE-Aufbau, bestehend aus einer Hochspannungsquelle (Modell HCN 7E-35000, F. u. G. Elektronik, Rosenheim-Langenpfunzen, Deutschland) in einer Plexiglas-Sicherheitsbox sowie einer Steuereinheit. Das CE-System war durch einen koaxialen *Sheath Liquid*-Sprayer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit dem micrOTOF-MS (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) verbunden. Die *Sheath Liquid* wurde über eine Spritzenpumpe (Modell 601553, kdScientific, Holliston, MA, USA) aus einer Glasspritze (2,5 ml, ILS, Stützerbach, Deutschland) eingebracht.

Für die genaue Massenbestimmung und Untersuchung von Fragmentierungen während der Guanosin-Oxidation wurde ein Q-Tof-MS (Modell 6540, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) genutzt. Dazu wurden 50  $\mu$ l einer 2 mM Guanosin-Lösung (in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) bei 1,3 V für 120 s auf einer SPCE oxidiert. Unmittelbar nach Beendigung der Oxidation wurde die oxidierte Lösung in ein UHPLC-Gerät injiziert (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) und eine genaue Massenbestimmung sowie Fragmentierungsexperimente durchgeführt.

Die elektrochemisch assistierte Injektion wurde zunächst über eine laborgefertigte EAI-Zelle mit einem Fassungsvermögen von 3 ml durchgeführt. Weitere Experimente wurden mit der weiterentwickelten automatischen EAI-Zelle realisiert. Beide Modelle werden in den folgenden Unterkapiteln (Abschnitt 4.4.3. sowie 4.4.4.) ausführlicher beschrieben.

### 4.3. Software

Dieses Unterkapitel gibt einen Überblick über die im Rahmen der Arbeit verwendete Software.

Die Kontroll-Software GPES 4.9 des  $\mu$ Autolabs III kann für cyclovoltammetrische Messungen genutzt werden. Ebenso bietet der amperometrische Messmodus die Möglichkeit, bei konstantem Potential Oxidationen bzw. Reduktionen an der Arbeitselektrode im Rahmen der EAI-Experimente durchzuführen. Die Programmierung der vollautomatischen EAI-Zelle erfolgt mit Hilfe der Software ProfiLab-Expert. Damit ist eine punktgenaue Positionierung der Kapillare über der Arbeitselektrode möglich. Die Regelung des Massenspektrometers und der Datenaufnahme wurde mit micrOTOFcontrol (Version 2.3, Bruker Daltonik) realisiert. Die Analyse der Daten erfolgte mit DataAnalysis (Version 4.0 SP1, Bruker Daltonik). IsotopePattern (Bruker Daltonik) wurde für die Berechnung von m/z-Werten herangezogen.

Die Datenauswertung wurde mit Origin (Version 8, Originlab) und Microsoft Excel (Version 2009-2015) durchgeführt. Chemische Formeln wurden mit ChemDraw Pro 14 (cambridgeSoft.com) erstellt, Grafiken mit Hilfe der vektorbasierten Software Adobe Illustrator CC (Adobe) angefertigt. Dreidimensionale Darstellungen der beiden EAI-Zellen wurden mit Solid Edge ST7 erstellt.

## 4.4. Methoden

Alle wissenschaftlichen Methoden, die im Kontext dieser Arbeit Anwendung fanden, werden im Folgenden im Detail dargestellt.

### 4.4.1. Cyclovoltammetrische Messungen

Alle cyclovoltammetrischen Messungen wurden mit dem  $\mu$ Autolab III durchgeführt. Das Modellsystem der Ferrocen-Verbindungen wurde auf der Platin-Arbeitselektrode der EAI-Zelle oxidiert. Als Quasi-Referenzelektrode diente eine Silberelektrode. Oxidationsmechanismen des Guanosins und des Rutins wurden auf Siebdruckelektroden (DropSens) in der automatischen EAI-Zelle untersucht. Vorteil der Siebdruckelektroden ist das sehr viel geringere Probenvolumen von etwa 50  $\mu$ l. Aufgrund des Elektrodendesigns genügt dies, um das Drei-Elektroden-Arrangement abzudecken. Auch hier ist eine Quasi-Referenzelektrode aus Silber auf der Siebdruckelektrode integriert. Zudem können Elektroden schnell und unkompliziert ausgetauscht werden, sei es, um unterschiedliche Elektrodenmaterialien zu testen oder um defekte Elektroden unkompliziert zu ersetzen. Vor jeder Messung mit einer neuen Elektrode wurde diese konditioniert, indem für einen Zeitraum von 1 min eine Spannung von 1,3 V angelegt wurde. Medium war die Pufferlösung, in der der jeweilige Analyt gelöst werden sollte. Typische Vorschubgeschwindigkeiten, die in den cyclovoltammetrischen Messungen Anwendung gefunden haben, lagen zwischen 0,05 und 0,10 V/s. Das Stufenpotential wurde auf 0,005 V eingestellt. Die Konzentrationen liegen zwischen 0,5 mM (für Rutin) und 4 mM (für Guanosin). Messungen erfolgten für das Modellsystem der Ferrocenverbindungen in Acetonitril (ACN) unter Zusatz von 1 M Essigsäure/ 10 mM Ammoniumacetat (1 M AcOH/ 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Guanosin und Rutin wurden in wässrigen Puffern bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Eine 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ -Lösung wurde als neutraler Puffer (pH 7,40) genutzt. Für den Puffer im sauren Bereich (pH 4,75) wurde eine 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung mit Essigsäure (AcOH) auf den gewünschten pH eingestellt. Die Einstellung des pH erfolgte mittels pH-Meter. Analog dazu wurde im Alkalischen der pH von 9,25 mit einer 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Lösung und  $\text{NH}_3$  eingestellt.

### 4.4.2. Elektrochemisches Fließzell-Experiment

Um einen Überblick über mögliche Oxidationsprodukte zu erhalten, wurden vorbereitend zu den EAI-CE-MS-Messungen der Guanosin-Oxidation sowie der Rutin-Oxidation Fließzell-Experimente durchgeführt.

In einem 3 ml-Glasfläschchen wurde Guanosin in einer Pufferlösung (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 4,75) gelöst, für 5 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt, so dass eine 2 mM Lösung entstand. Diese wurde möglichst frisch vor jeder Messung hergestellt. Bei Nichtverbrauchen des Analyten wurde die restliche Lösung unter Kühlung (8 °C) und unter Lichtausschluss gelagert. Um das Oxidationsverhalten bei unterschiedlichen pH-Bedingungen zu testen, wurden äquivalente Lösungen in zwei weiteren Puffern (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7,40; 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) hergestellt. Die Lösungseigenschaften von Rutin im Wässrigen erlaubten es nur, eine 1 mM Lösung unter alkalischen Bedingungen (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) herzustellen. Eine vollständige Lösung erzielte man nach 10 min im Ultraschallbad bei 40 °C. Die Rutinlösung wurde täglich frisch hergestellt, da trotz Lagerung unter Lichtausschluss sowie Kühlung eine Abspaltung des Quercetins beobachtet werden konnte.

Der apparative Aufbau dieser EC-MS-Kopplung wurde mittels elektrochemischer Durchflusszelle (DropSens) realisiert. Die Zuleitung des Analyten erfolgte durch eine Spritzenpumpe (Linomat) mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 bis 8 µl/min. Die Analytlösung wurde kontinuierlich durch die Durchflusszelle mit gleichbleibender Geschwindigkeit gepumpt. Eine *Fused Silica*-Kapillare (ID 50 µm, 25 cm) koppelte die Fließzelle mit dem Massenspektrometer. Durch einen Potentiostaten (µAutolab III) konnte die Spannung an der Arbeitselektrode variiert werden. Vor jeder Messung mit einer neuen Elektrode wurde diese konditioniert, indem für einen Zeitraum von 1 min eine Spannung von 1,3 V angelegt wurde. Medium war die Pufferlösung, in der der jeweilige Analyt gelöst werden sollte. Während der Oxidationsstudien wurde das Potential von 0 bis 1,5 V in 100 mV-Schritten verändert. Guanosin wurde ausschließlich an einer SPCE oxidiert. Für die Oxidation des Rutins fand neben der SPCE auch die Kohlenstoff-Nano-Faser-modifizierte Variante (SPE-CNF) Anwendung.

Der Einfluss der Fließgeschwindigkeit wurde in Testversuchen mit 1 mM Ferrocenmethanol (in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) untersucht (Abbildung 14). Ziel war es, mögliche Oxidationsprodukte zeitnah mittels MS detektieren zu können, um störende Einflüsse durch eine zu lange Verweildauer in der Transferkapillare zu minimieren. Das Test-Protokoll sah diesbezüglich wie folgt aus: (i) 300 s ohne Oxidation, (ii) 300 s Oxidation bei einem Potential von 0,4 V, (iii) nach Ende der Oxidation wurde gewartet, bis sich das Ausgangsniveau des Signals wieder eingestellt hatte. Bei einer Fließgeschwindigkeit der Spritzenpumpe von 4 µl/min vergingen vom Start der Oxidation bis zur Detektion des Anstieges des Signals des geladenen Ferrocenmethanols 5 s. Verdoppelte man die Fließgeschwindigkeit auf 8 µl/min, so stieg das Signal des oxidierten Produkts in weniger als 1 s an. Eine Untersuchung von Oxidationsprodukten ohne Verweildauer in der (Transfer-)Kapillare kann somit unternommen werden.

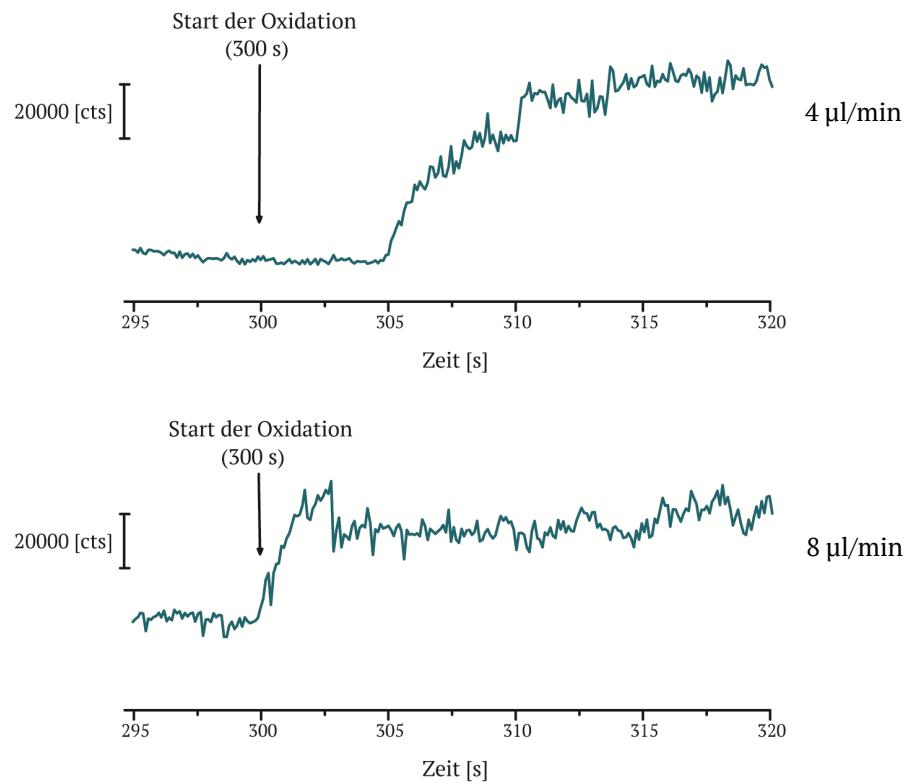


Abb. 14. Einfluss der Fließgeschwindigkeit bei Versuchen mit der elektrochemischen Durchflusszelle. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 4  $\mu\text{l}/\text{min}$  steigt das Signal des oxidierten Stoffes nach 5 s an (oben). Bei einer Verdopplung der Fließgeschwindigkeit auf 8  $\mu\text{l}/\text{min}$  steigt das Signal direkt (< 1 s) an (unten).

#### 4.4.3. Elektrochemisch assistierte Injektion: Manuelle Injektionstechnik

Die von Matysik entwickelte elektrochemische Injektionszelle [8] besteht aus einem etwa 5 ml umfassenden Glasgefäß, in dem ein Drei-Elektroden-Kompartiment eingebaut wurde (Abbildung 15). Neben der Platin-Disk-Elektrode ( $d_{\text{Pt}} = 2 \text{ mm}$ ) als Arbeitselektrode, die im Boden des Glasgefäßes integriert ist, gibt es eine Silber-Quasi-Referenzelektrode sowie eine Silber-Gegenelektrode. Die Öffnung der elektrochemischen Zelle wird mit einem Teflonstopfen verschlossen. Dieser besitzt zwei Öffnungen. Durch eine wird eine *Fused Silica*-Kapillare so eingeführt und befestigt, dass ein konstanter Kapillar-zu-Elektroden-Abstand von  $50 \pm 10 \mu\text{m}$  vorliegt, welcher sowohl eine sehr gute Diffusion des Analyten zur Disk-Elektrode ermöglicht, als auch optimale Bedingungen für die Injektion der gebildeten oxidierten bzw. reduzierten Spezies in das Kapillarsystem schafft. Durch die zweite Öffnung ist eine weitere Elektrode eingeführt, über die während der CE-Trennung eine Hochspannung (bis zu 35 kV) angelegt werden kann.

Um diese Zelle auch als Injektionszelle für die Kapillarelektrophorese nutzen zu können, wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet: Die EAI-Zelle wurde mit ausreichend Analyt-Lösung befüllt, so dass alle Elektroden vollständig bedeckt sind. Dies entspricht einem Volumen von 3 ml. Ein mit Hintergrundelektrolyt gefülltes weiteres Gefäß besitzt identische Abmessungen wie die Öffnung der EAI-Zelle, so dass der Teflonstopfen problemlos von einem auf das andere Gefäß gesetzt werden kann. An der Platin-Disk-Elektrode der EAI-Zelle wird eine Spannung (zwischen 0 und 1,5 V) für eine Dauer von 60 s angelegt. Während die elektrochemische Umwandlung andauert, wird die Kapillare in der EAI-Zelle manuell positioniert und für weitere 10 s über der Platin-Disk-Elektrode im festen Abstand gehalten. Die hydrodynamische Injektion erfolgt über das Anheben der Zelle um 10 cm gegenüber der Spitze der ESI-Sprayer-Nadel. Nach der Injektion wird die Kapillare in das Puffergefäß überführt und die Trennspannung angelegt. Diese Trennspannung konnte von 5 bis 35 kV variiert werden. Die Trennung erfolgte in einer *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 70 cm).

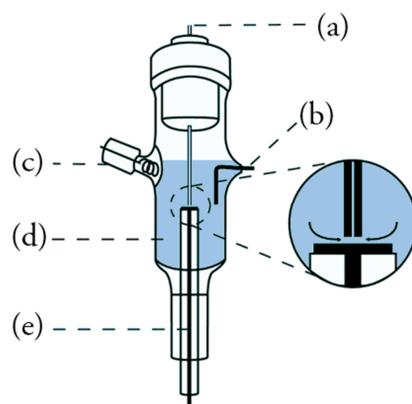


Abb. 15. Schematische Darstellung der Zellkonfiguration für die elektrochemisch assistierte Injektion: (a) *Fused Silica*-Kapillare, (b) Gegenelektrode, (c) Referenzelektrode, (d) Probenlösung und (e) Pt-Disk-Elektrode ( $d_{Pt} = 2$  mm). Abbildung entnommen aus [P1].

Mit der manuellen Injektionstechnik wurden die Versuche mit dem Modellsystem der Ferrocenverbindungen ausgeführt. Dazu wurde eine Lösung bestehend aus 1,5 mM Ferrocen, 1 mM Ferrocenmethanol, 40  $\mu$ M Decamethylferrocen und 160  $\mu$ M Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)-ferrocen in Acetonitril mit 1 M AcOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc hergestellt. Bei Nichtgebrauch wurde sie lichtundurchlässig unter Kühlung bei 8 °C aufbewahrt. Der Trennpuffer bestand aus der gleichen Pufferzusammensetzung (Acetonitril mit 1 M AcOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc).

#### 4.4.4. Elektrochemisch assistierte Injektion: Automatische EAI-Zelle

Um Oxidationsstudien im bioanalytischen Forschungsfeld realisieren zu können, musste zum einen eine deutliche Reduzierung des Probenvolumens verwirklicht werden. Zum anderen bietet eine Automatisierung des Injektionsvorganges die Möglichkeit, Schwankungen der Migrationszeiten zu minimieren. Mit der Entwicklung einer vollautomatischen EAI-Zelle [11] wurde die technische Grundlage gegeben, bioanalytische Oxidationsstudien durchzuführen. Ebenso konnte durch den Einsatz von Siebdruckelektroden (DropSens) ein unkomplizierter Tausch des Elektrodenmaterials erfolgen. Der Zellaufbau bestand aus einer Halterung für die Siebdruckelektrode, die über einen Adapter mit dem  $\mu$ Autolab III als Potentiostaten verbunden war. Die Analytlösung wird mit einem Volumen von 50  $\mu$ l auf dem Drei-Elektroden-Arrangement der Siebdruckelektrode mit einer Mikroliter-Pipette platziert, so dass eine komplette Abdeckung erfolgte. Die EAI-Zelle besaß zudem zwei Pufferreservoir (0,2 ml (in der Abbildung 16 nicht gezeigt) und 2,0 ml), die jeweils mit einer Platin-Elektrode zum Anlegen der Hochspannung während der Kapillarelektrophorese versehen waren. Durch einen Servomotor konnte computergesteuert sowohl horizontal als auch vertikal die Kapillarhalterung zwischen Analytlösung auf der Siebdruckelektrode und dem jeweiligen Pufferreservoir bewegt werden.

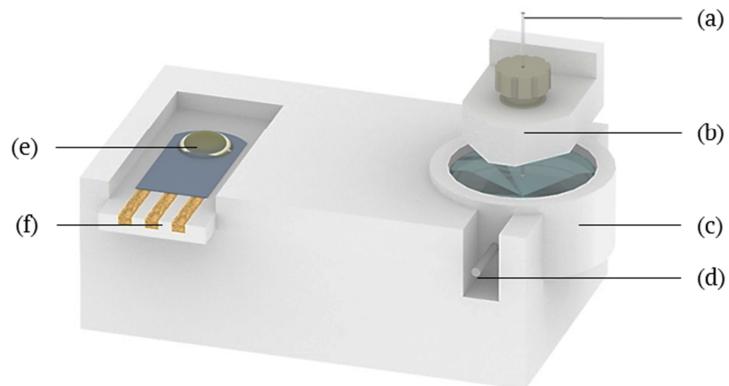


Abb. 16. Schematische Darstellung der automatischen EAI-Zelle: (a) *Fused Silica*-Kapillare, (b) Kapillarhalterung, (c) Pufferreservoir, (d) CE-Elektrode, (e) Probenlösung und (f) Siebdruckelektrode.

Mit der automatischen EAI-Zelle wurden Versuche zur Guanosin- sowie Rutin-Oxidation durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte analog der Beschreibung der Fließzell-Experimente (Unterkapitel 4.4.2.). Auch hier wurde Guanosin ausschließlich an einer SPCE oxidiert. Für die Oxidation des Rutins fand neben der SPCE auch die modifizierte Variante SPE-CNF Anwendung. Die Oxidationsdauer betrug 60 s, wobei in den letzten 10 s die Injektion erfolgte, indem die Kapillare automatisch vom Pufferreservoir auf die Elektrodenoberfläche gesetzt wurde. Durch die spezielle

Polierung der Kapillarspitze, die in einem 15°-Winkel resultiert, ist ein perfekter Abstand zwischen Elektrode und Kapillare gegeben, so dass sowohl die Diffusion des Analyten zur Elektrode wie auch die Injektion in die Kapillare optimal erfolgen können. Nach einer Injektionszeit von 10 s wird die Kapillare in das Pufferreservoir zurückgefahren und die Hochspannung zur Durchführung der Kapillarelektrophorese gestartet.

#### 4.4.5. CE-Methodenentwicklung

Der Vorbereitung der *Fused Silica*-Kapillare für die CE-Trennung wurde besondere Aufmerksamkeit verliehen. Dazu wurden zunächst etwa 5 bis 8 mm der Polyimid-Beschichtung an beiden Kapillarenden mit Hilfe eines Gasbrenners entfernt. Etwaige Rückstände wurden vorsichtig mit einem in Isopropanol getauchten Zellstofftuch entfernt. Anschließend wurden beide freien Enden mit Polierfolien (Korngröße: 15 µm) poliert. Das Kapillarend, welches im ESI-Sprayer eingebaut wurde, wurde dabei eben poliert. Das andere Ende, das über der Elektrode positioniert werden sollte, wurde hingegen mit einem 15 °-Winkel mittels einer laborgefertigten Poliermaschine versehen. Das Ergebnis wurde mit einem Mikroskop überprüft. Daraufhin erfolgte die Konditionierung der Kapillare. Diese besteht aus insgesamt vier Spülstufen von jeweils 10 min, wobei die Reihenfolge aus destilliertem Wasser, 1 M NaOH, wiederum destilliertem Wasser und abschließend der entsprechenden Pufferlösung bestand. Diese Konditionierung wurde vor jeder Messsequenz wiederholt, um einem Drift der Migrationszeiten entgegenzuwirken.

Für die vorliegende Arbeit wurde für die CE-Methodenentwicklung der Einfluss der Trennspannung, der Injektionszeit ebenso wie des EOF-Markers untersucht. Ziel war es, Signale im Elektropherogramm möglichst basisliniengetrennt zu erhalten. Sie sollten eine hohe Intensität und eine möglichst geringe Halbwertsbreite aufweisen.

#### *Einfluss der Trennspannung*

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Ionen ist direkt proportional zur Stärke des elektrischen Feldes, das während der Elektrophorese anliegt. Somit führt eine Erhöhung der Spannung zu einer schnellen Wanderung der Analyten. Eine beliebige Erhöhung der Spannung kann jedoch nachteilig ausfallen, da Peakverbreiterungen aufgrund des Einflusses von Joule'scher Wärme keine optimale CE-Trennung ermöglichen.

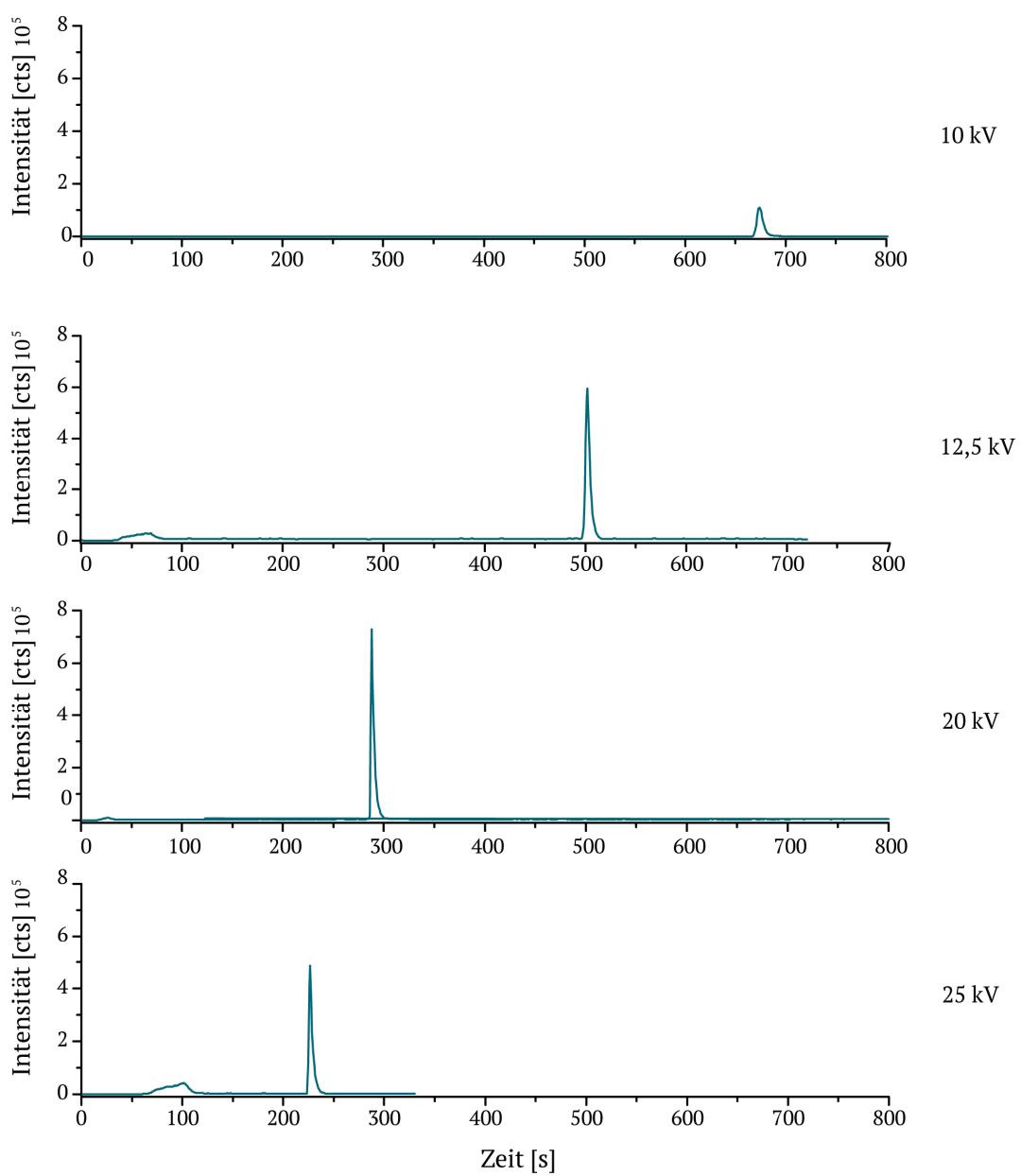


Abb. 17. Abhängigkeit der Peakhöhe und Halbwertsbreite von der Trennspannung während der Kapillarelektrophorese (*Fused Silica*-Kapillare, ID 75  $\mu\text{m}$ , 50 cm). 1 mM Ferrocen (in ACN, 1 M AcOH/ 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ).

Es wird dargestellt, welchen Einfluss die sukzessive Erhöhung der Trennspannung von 10 kV auf 25 kV auf die Eigenschaften des Signals des oxidierten Ferrocens (in ACN mit 1 M AcOH/ 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) besitzt. Prinzipiell kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Spannung während der Kapillarelektrophorese auch eine Erhöhung der Peakhöhe hervorbringt. Ebenso verkürzen sich mit zunehmender Spannung die Migrationszeiten. Es zeigt sich jedoch, dass bereits bei einer Trennspannung von 12,5 kV eine relativ gute Peakhöhe erreicht wird, die Halbwertsbreite (HWB)

aber fast doppelt so breit ist wie im optimalen Fall bei einer Spannung von 20 kV. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf 25 kV führt sowohl zu einer Reduzierung der Peakhöhe als auch zu einer leichten Bandenverbreiterung des Signals. Das Optimum der Signaleigenschaften erhält man bei einer CE-Spannung von 20 kV (Abbildung 17).

### *Injektionszeiten*

Am Beispiel der CE-Methodenentwicklung für das Antioxidans Rutin wurden drei unterschiedliche Injektionszeiten getestet. Dazu wurde eine 1 mM Rutinlösung in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer (pH 9,25) hydrodynamisch bei Injektionszeiten von 5 s, 10 s und 15 s in die Kapillare injiziert und anschließend getrennt. Basierend auf Halbwertsbreite und Intensität des Signals erfolgte eine Bestimmung der optimalen Injektionsdauer. Sowohl die protonierte Form des Rutins ([M+H]<sup>+</sup>, m/z 611) als auch das Natriumaddukt ([M+Na]<sup>+</sup>, m/z 633) wurden ausgewertet.

Die maximale Intensität wurde erwartungsgemäß bei der längsten Injektionszeit von 15 s erreicht. Die kleinsten Halbwertsbreiten traten jedoch bei 10 s Injektionsdauer auf. Da die Signalbreite entscheidenden Einfluss auf eine mögliche Basislinientrennung haben kann, wird sie als entscheidendes Kriterium gewählt. Die Oxidationsstudien des Rutins werden somit bei einer Injektionszeit von 10 s durchgeführt (Tabelle 1).

Tab. 1. Einfluss der Injektionszeit auf Signalintensität I und Halbwertsbreite (HWB) für Rutin, m/z 611 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 633 [M+Na]<sup>+</sup>. Es sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen angegeben. Die optimalen Einstellungen sind hervorgehoben.

Injektionszeit	I (m/z 611)	I (m/z 633)	HWB (m/z 611)	HWB (m/z 633)
	[cts]	[cts]	[s]	[s]
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
5 s	141482	13949	5,93	7,28
<b>10 s</b>	<b>112872</b>	<b>12497</b>	<b>5,84</b>	<b>6,91</b>
15 s	<b>150943</b>	<b>14479</b>	8,99	10,17

### *EOF-Marker*

Die gängige Methode, um den EOF einer CE-Messung zu markieren, besteht im Zusatz eines neutralen Analyten unter den pH-Bedingungen, welche durch den Puffer vorgegeben werden. Bei massenspektrometrischer Detektion muss zudem darauf geachtet werden, dass sich der EOF-Marker

im Massenbereich des Analytgemisches befindet. Ebenso muss der EOF-Marker in den verschiedenen Messmodi (ESI-positiv bzw. ESI-negativ) detektierbar sein.

Für den ESI-positiven Modus wurde Coffein (10  $\mu$ M) als EOF-Marker genutzt. In der angegebenen Konzentration waren keine Einflüsse auf die Trennung detektierbar. Während der Oxidationsstudien von Guanosin als auch bei Studien zum Rutin wurde Coffein eingesetzt. Ebenso wurde für die kapillarelektrophoretische Trennung der Rutin-Oxidationsprodukte im ESI-negativen Modus Glucose (100  $\mu$ M) als Markersubstanz verwendet. Beide EOF-Marker können oxidiert werden [122,123]. Dies ist zu beachten, wenn Oxidationsstudien bei höheren Spannungen realisiert werden. Eine Einschätzung, ob (unbekannte) Oxidationsprodukte neutral, positiv oder negativ geladenen sind, kann somit unternommen werden.

Für die Analyse der Oxidation des Modellsystems der Ferrocenverbindungen wurde kein EOF-Marker zugesetzt. Trotz der sehr geringen Ionisierungseffizienz wurden Ferrocen und Ferrocenmethanol mit (sehr) geringer Intensität detektiert. Sie markierten daher selbst den EOF, womit auf den Zusatz eines EOF-Markers verzichtet werden konnte.

#### 4.4.6. MS-Methodenentwicklung

Um eine optimale Detektion von Analyten zu gewährleisten, mussten verschiedene Parameter des Massenspektrometers angepasst werden. Der Fokus richtete sich vor allem auf instrumentelle Variablen im ESI-Prozess sowie der Einstellung der Ionenoptiken des Tof-MS.

##### *Kalibrierung des Massenspektrometers*

Die Kalibrierung des Massenspektrometers für den niedrigeren Massenbereich (m/z 50 bis m/z 750) wurde mit 10 mM Natriumformiat-Lösung durchgeführt. Dazu wurde eine Mischung aus 10  $\mu$ l einer 1 M NaOH-Lösung mit 990  $\mu$ l einer Lösung aus H<sub>2</sub>O/ Isopropanol (IP) (50/50, v/v%) und 0,1% Ameisensäure (FA) in die ESI-Quelle mittels Druck über eine *Fused Silica*-Kapillare infundiert. Die Kalibrierung wurde routinemäßig vor jeder Messsequenz durchgeführt.

### Parameter des ESI-Interfaces

Um eine Optimierung des Elektrospray-Prozesses zu erreichen, sollte die beste Kombination aus *Sheath Liquid*-Zusammensetzung und deren Fließgeschwindigkeit sowie den instrumentellen Parametern der ESI-Quelle, *Nebulizer Gas* und *Dry Gas*, gefunden werden.

Mit einem einfachen Fließexperiment kann gezeigt werden, wie die Signalintensität von der optimalen Zusammensetzung der *Sheath Liquid* abhängt. Dazu wurde eine 1  $\mu\text{M}$  Lösung von Ferrocenylmethyltrimethylammoniumiodid (**FcTMAI**) gelöst in ACN als Analyt mittels *Fused Silica*-Kapillare direkt massenspektrometrisch vermessen. Der schnelle Gasfluss des Stickstoffgases an der Spitze des ESI-Sprayers führt zu einer Vernebelung, aufgrund derer ein Saugdruck am Ende der CE-Kapillare auftritt. Dies unterstützt die hydrodynamische Injektion des Analyten in die *Fused Silica*-Kapillare und führt zu einem kontinuierlichen Fluss. Dieser relativ einfache instrumentelle Aufbau kann jedoch gut genutzt werden, um verschiedene Zusammensetzungen der *Sheath Liquid* zu untersuchen und ihren Einfluss auf die Signalintensität des Analyten zu verdeutlichen. **FcTMAI** kann sehr gut massenspektrometrisch detektiert werden, da es aufgrund seines ionischen Charakters bereits geladen vorliegt. Im Laufe der Methodenentwicklung sollte die Zusammensetzung der *Sheath Liquid* angepasst werden. Als optimale *Sheath Liquid* für Messungen des Analyten **FcTMAI** im ESI-positiven Modus ergab sich die Kombination von  $\text{H}_2\text{O}$ , Methanol und Ameisensäure (80/20 (v/v%) + 0,2%) (Tabelle 2).

Tab. 2. Exemplarische Darstellung der Abhängigkeit der Signalintensität I von der *Sheath Liquid*-Zusammensetzung für den Analyten Ferrocenylmethyltrimethylammoniumiodid (**FcTMAI**, 1  $\mu\text{M}$ ). Die optimale Zusammensetzung ist hervorgehoben.

<i>Sheath Liquid</i>	(v/v%)	Intensität [cts]
IP/ $\text{H}_2\text{O}$ + FA	50/50 + 0,2%	$4,00 \cdot 10^4$
	80/20 + 0,2%	$4,69 \cdot 10^4$
<b>MeOH/ <math>\text{H}_2\text{O}</math> + FA</b>	50/50 + 0,2%	$3,62 \cdot 10^4$
	<b>80/20 + 0,2%</b>	<b><math>11,62 \cdot 10^4</math></b>
ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ + FA	50/50 + 0,2%	$3,40 \cdot 10^4$
	80/20 + 0,2%	$4,79 \cdot 10^4$
	80/20 + 1,0%	$4,79 \cdot 10^4$
	80/20 + 2,0%	$3,39 \cdot 10^4$
ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ + AcOH	80/20 + 0,2%	$0,15 \cdot 10^4$
	80/20 + 1,2%	$0,20 \cdot 10^4$
	80/20 + 2,0%	$0,28 \cdot 10^4$

Die Untersuchungen zu den Ferrocenderivaten und der Guanosin-Oxidation sowie die Messungen im ESI-positiven Modus von Rutin wurden mit einer *Sheath Liquid*-Zusammensetzung von IP/ H<sub>2</sub>O + FA (50/50 (v/v%) + 0,2%) durchgeführt. Die Oxidation von Rutin wurde ebenso unter ESI-negativen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde eine *Sheath Liquid*-Zusammensetzung von Methanol, H<sub>2</sub>O und Ammoniak (80/20 (v/v%) + 0,1%) verwendet. Zudem wurden vier weitere Parameter und deren Einfluss auf Peak-Intensität und Halbwertsbreite untersucht. Die beste Kombination aus *Nebulizer Gas*-Einstellungen, *Dry Gas*-Flussrate und -temperatur sind im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabellen 3-6).

Zunächst wurden vier unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten der *Sheath Liquid* (IP/ H<sub>2</sub>O = 50/50 (v/v%) + 0,2% FA) getestet. Die geringsten Intensitäten wurden dabei bei der höchsten Fließgeschwindigkeit von 480 µl/h erzielt. Dies ist auf die größere Verdünnung des Sprays zurückzuführen. Wird die Geschwindigkeit herabgesetzt, erhöht sich die Intensität. Die höchste Intensität wird bei 180 µl/h erzielt. Hierbei ergeben sich jedoch Peakverbreiterungen für die Signale von Rutin, [M+H]<sup>+</sup> und [M+Na]<sup>+</sup>, (HWB 8,84 s/ 9,69 s) gegenüber einer Fließgeschwindigkeit von 240 µl/h (HWB 6,80 s/ 7,86 s). Somit erzielt zwar eine Geschwindigkeit der *Sheath Liquid* von 180 µl/h die höchsten Intensitäten, jedoch werden die kleinsten Halbwertsbreiten bei 240 µl/h erreicht. Die ermittelte optimale Geschwindigkeit für die *Sheath Liquid* beträgt daher 240 µl/h.

Tab. 3. Abhängigkeit der Signalintensitäten und -halbwertsbreiten von der Fließgeschwindigkeit der *Sheath Liquid* (IP/ H<sub>2</sub>O + FA (50/50 (v/v%) + 0,2%)) für Rutin, m/z 611 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 633 [M+Na]<sup>+</sup>. Es sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen angegeben. Die optimalen Einstellungen sind hervorgehoben.

Fließgeschwindigkeit	I (m/z 611)	I (m/z 633)	HWB (m/z 611)	HWB (m/z 633)
	[cts] [M+H] <sup>+</sup>	[cts] [M+Na] <sup>+</sup>	[s] [M+H] <sup>+</sup>	[s] [M+Na] <sup>+</sup>
180 µl/h	<b>84116</b>	<b>17391</b>	8,84 s	9,69 s
<b>240 µl/h</b>	78810	14896	<b>6,80 s</b>	<b>7,86 s</b>
360 µl/h	67382	13118	7,20 s	8,14 s
480 µl/h	48809	12460	6,92 s	7,37 s

Des Weiteren wurden im Rahmen der Rutin-Methodenentwicklung verschiedene Geräteparameter des Massenspektrometers getestet. Zum einen wurde der Einfluss untersucht, den das *Nebulizer Gas* auf die Signalintensität bzw. Halbwertsbreite ausübt. Die Druckeigenschaften wurden von 0,4 bis

1,6 bar variiert. Das Optimum von Signalintensität und Signalbreite findet sich bei einem *Nebulizer Gas*-Druck von 1,4 bar (Tabelle 4).

Tab. 4. Einfluss der *Nebulizer Gas*-Einstellungen auf die Signalparameter bei der MS-Detektion von Rutin, m/z 611 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 633 [M+Na]<sup>+</sup>. Es sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen angegeben. Die optimalen Einstellungen sind hervorgehoben.

<i>Nebulizer Gas</i>	I (m/z 611)	I (m/z 633)	HWB (m/z 611)	HWB (m/z 633)
0,4 bar	32485	7147	<b>5,17</b>	<b>5,51</b>
0,8 bar	50799	9822	7,94	8,27
1,0 bar	52272	10495	7,64	8,44
1,2 bar	<b>66349</b>	10804	6,82	7,21
<b>1,4 bar</b>	<b>51631</b>	<b>11423</b>	5,74	6,37
1,6 bar	42499	6932	4,66	5,26

Einen dritten Parameter stellt das *Dry Gas* dar. Es wurden vier Fließgeschwindigkeiten von 3,0 bis 5,0 l/min untersucht. Die besten Signaleigenschaften werden mit der *Dry Gas*-Einstellung von 3,5 l/min erzielt (Tabelle 5). Als weiterer Geräteparameter wurde ebenso die *Dry Gas*-Temperatur untersucht. Aufgrund der hohen Intensitäten wurde als *Dry Gas*-Temperatur 210 °C gewählt (Tabelle 6).

Tab. 5. Abhängigkeit der Signalparameter Intensität und Halbwertsbreite von den *Dry Gas*-Einstellungen für Rutin, m/z 611 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 633 [M+Na]<sup>+</sup>. Es sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen angegeben. Die optimalen Einstellungen sind hervorgehoben.

<i>Dry Gas</i>	I (m/z 611)	I (m/z 633)	HWB (m/z 611)	HWB (m/z 633)
3,0 l/min	26727	4346	5,57	6,57
<b>3,5 l/min</b>	<b>92891</b>	<b>15637</b>	5,65	6,35
4,0 l/min	79686	13656	<b>4,76</b>	<b>5,75</b>
5,0 l/min	71924	10491	5,91	6,93

Tab. 6. Einfluss der *Dry Gas*-Temperatur auf die Signalparameter für Rutin, m/z 611 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 633 [M+Na]<sup>+</sup>. Es sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen angegeben. Die optimalen Einstellungen sind hervorgehoben.

Dry Gas Temperatur	I (m/z 611)	I (m/z 633)	HWB (m/z 611)	HWB (m/z 633)
170 °C	96886	12148	5,13	5,66
190 °C	92891	15637	5,65	6,35
<b>210 °C</b>	<b>123783</b>	<b>18384</b>	6,38	7,13
230 °C	98613	16216	<b>4,75</b>	<b>5,20</b>

Im Rahmen einer jeden Methodenentwicklung sollten diese Parameter, die Einfluss auf die Elektrospray-Bildung haben können, getestet und eingestellt werden, um eine möglichst optimale Detektion des Analyten zu gewährleisten.

#### *Parameter der Ionenoptiken*

Der zweite Schritt der Methodenentwicklung der MS-Detektion besteht in der Anpassung der Ionenoptiken. Um eine Sensitivitätserhöhung zu erreichen, können die Einstellungen des Hexapols optimiert werden. Ebenso haben *Skimmer 1* sowie die Spannung am Ausgang der Transferkapillare (*Capillary Exit*) Einfluss auf die Auswahl des Massenbereichs. In Hinblick darauf, dass keine vergleichbar gute Sensitivität für kleine Massen in einem engen Massenbereich wie in weiten Massenbereich gegeben ist, kann die Einstellung von *Skimmer 1*, *Capillary Exit* und Hexapol Einfluss auf die Detektion nehmen (Tabelle 7).

Tab. 7. Parameter-Einstellungen der verschiedenen MS-Methoden. Drei Abschnitte unterteilen allgemeine Einstellungen (oben), ESI-Interface-Parameter (mittig) sowie Ionenoptiken (unten).

Parameter	Ferrocen-verbindingen	EAI-CE-MS Guanosin	EAI-CE-MS Rutin	Fließzelle Guanosin	Fließzelle Rutin
Ionen-Polarität	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Massenbereich [m/z]	50-1000	50-700	50-700	50-550	50-700
Spektrenrate [Hz]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Endplate Offset</i> [V]	-500	-500	-500	-500	-500
<i>Capillary</i> [V]	-4500	-4500	-4500	-4000	-4000
<i>Nebulizer Gas</i> [bar]	0,4	1,0	1,4	0,4	1,4
<i>Dry Gas</i> [l/min]	4,0	4,0	3,5	4,0	3,5
<i>Dry Gas</i> -Temperatur [°C]	190	190	210	190	210
<i>Capillary Exit</i> [V]	90,0	90,0	90,0	-150	120,0
<i>Skimmer 1</i> [V]	50,0	30,0	30,0	-50	40,0
<i>Hexapole 1</i> [V]	23,0	23,0	23,0	-23,0	23,0
<i>Hexapole RF</i> [V <sub>pp</sub> ]	80,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Skimmer 2</i> [V]	23,0	22,0	23,0	-23,0	23,0
<i>Lens 1 Transfer</i> [V]	49,0	49,0	49,0	30,0	30,0
<i>Lens 1 Pre Puls Storage</i> [μs]	5,0	10,0	10,0	10,0	10,0

## 5. Kapitel

# Trennung neutraler Analyten: Ferrocen und seine Derivate als Modellanalyten

Ein neuartiges Konzept, dass die Untersuchung neutraler Analyten mittels CE-MS-Aufbau ermöglicht, wird anhand eines Modellsystems bestehend aus Ferrocen und drei Ferrocenderivaten eingeführt. Grundlage ist die Einführung einer speziellen Injektionstechnik, die von Matysik [8] bereits 2003 vorgestellt wurde. Durch Anwendung der elektrochemisch assistierten Injektion können Neutralanalyten in geladene Spezies überführt werden, wenn sie redoxaktiv sind.

### 5.1. Trennung und Detektion mit EAI-CE-MS

Ferrocenverbindungen eignen sich in mehrfacher Hinsicht sehr gut als Modellsubstanzen für Untersuchungen mit EAI-CE-MS. Ihre Redoxeigenschaften ermöglichen es, in einem einfachen Ein-Elektronen-Übergang bereits bei niedrigen Potentialen von etwa 500 mV (vs. SHE) positiv geladene Ferrocenium-Spezies zu erzeugen. Abbildung 18 zeigt ein Cyclovoltammogramm des Redoxpaars Ferrocen/ Ferrocenium-Ion ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) einer 2 mM Ferrocenlösung. Die Messung erfolgte mit einer Platin-Mikroelektrode mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$ . Als Quasi-Referenzelektrode wurde ein Platindraht genutzt, um eine Kontamination, wie sie durch den Einsatz einer konventionellen Referenzelektrode entstehen kann, zu unterdrücken [124]. Durch den Gebrauch der Mikroelektrode tritt kein sonst für Cyclovoltammogramme typischer Hysterese-Verlauf des Signals auf. Durch die sehr kleine Elektrodenoberfläche ist der Zugang für Analytmoleküle durch hemisphärische Diffusion aus der Lösung an die Nähe der Elektrodenoberfläche sehr gut gegeben. Somit kommt es zu keiner (signifikanten) Ausbildung eines Plateaus (vgl. Abbildung 2 in Kapitel 1.1.1.). Relevant ist zudem die Abstimmung der Vorschubgeschwindigkeit auf den gegebenen Radius der Mikroelektrode. Eine planare Diffusion tritt demnach bei höheren Vorschubgeschwindigkeiten und größeren

Elektrodenradien auf, während die hemisphärische Diffusion vorzugsweise bei kleineren Vorschubgeschwindigkeiten und kleineren Elektrodenradien anzutreffen ist. Beide Parameter haben einen entscheidenden Einfluss auf den Kurvenverlauf. [125]

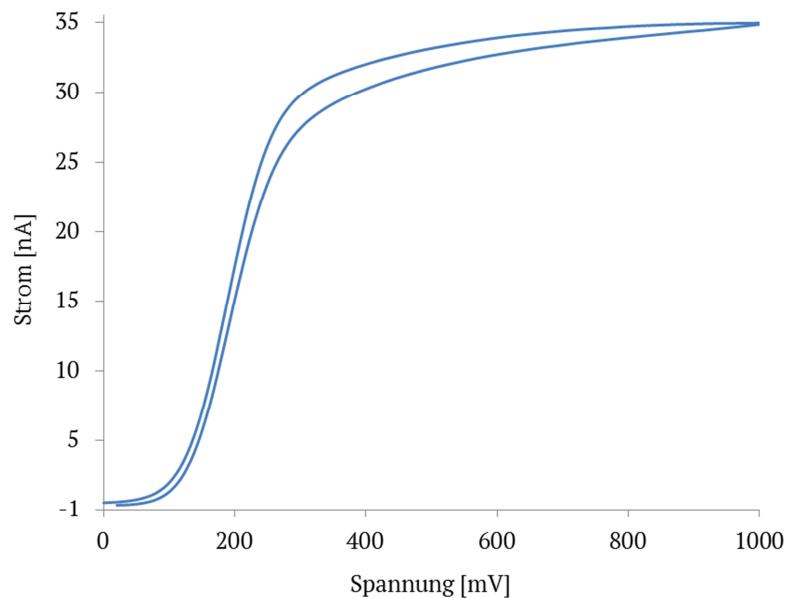


Abb. 18. Cyclovoltammogramm von 2 mM Ferrocen in 1 M AcOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in ACN. Als Arbeitselektrode wurde eine Platin-Mikroelektrode (10 µm) eingesetzt. Einstellungen des Potentiostaten: Schrittpotential 0,005 V, Vorschubgeschwindigkeit 0,05 V/s.

Ferrocenverbindungen sind sehr gut in organischen Lösungsmitteln löslich. Für die CE-Trennung können somit nicht-wässrige Puffersysteme auf Acetonitrilbasis herangezogen werden und die kapillarelektrophoretische Trennung als nicht-wässrige Kapillarelektrophorese durchgeführt werden. Als Elektrolytlösung für die Untersuchungen diente 1 M AcOH / 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in Acetonitril. Dieses Elektrolytsystem eignet sich hervorragend für ESI-MS-Messungen, da alle Bestandteile leicht verdampfbar sind. Als Modellsubstanzen kamen Ferrocen, Ferrocenmethanol, Decamethylferrocen sowie Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen zur Anwendung. Für die Substanzen Decamethylferrocen und Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen waren folgende Besonderheiten zu beachten: Wie in Abbildung 19 gezeigt, können beide Verbindungen auch ohne EAI in geladene Spezies umgewandelt werden. Decamethylferrocen wird aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials bereits durch gelösten Luftsauerstoff zum Decamethylferrocenium-Kation oxidiert [80]. Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen wird in dem verwendeten Elektrolytsystem (1 M AcOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in ACN) an einem Pyridylsubstituenten protoniert und trägt ebenfalls eine positive Ladung [82]. Im Modellgemisch liegen somit zwei ungeladene Analyten und zwei bereits geladene Analyten vor. [P1]

Die elektrochemisch assistierte Injektion wurde in einer speziellen elektrochemischen Injektionszelle durchgeführt, die im Unterkapitel 4.4.3. beschrieben ist. Die Injektion in das Kapillarfließsystem erfolgte hydrodynamisch außerhalb des Hochspannungsfeldes der CE. Nach der kapillarelektrophoretischen Trennung wurde die Detektion mittels ESI-Tof-MS durchgeführt. Für die Ferrocenspezies erhält man die charakteristischen Isotopenmuster des Eisens, die auch in komplexen Probengemischen eine leichte Identifizierung ermöglichen.

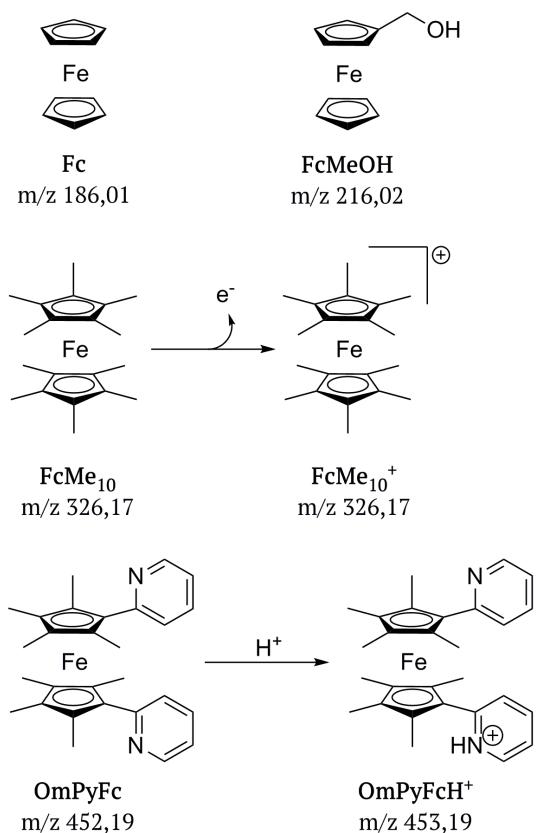


Abb. 19. Ferrocen (**Fc**) und seine Derivate Ferrocenmethanol (**FcMeOH**), Decamethylferrocen (**FcMe<sub>10</sub>**) sowie Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (**OmPyFc**) als Modellanalyten für EAI-CE-MS. [P1]

In Abbildung 20 sind zwei Elektropherogramme gezeigt, von denen das obere Elektropherogramm die kapillarelektrophoretische Trennung ohne EAI zeigt, das untere Elektropherogramm eine EAI-CE-Trennung repräsentiert. Ohne EAI sind nur die beiden bereits als ionische Spezies vorliegenden Analyten, das Decamethylferrocenium-Ion, und das protonierte Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen, als getrennte Signale zu erkennen. Die neutralen Analyten Ferrocen und Ferrocenmethanol können nicht mittels Kapillarelektrophorese getrennt werden. Beide Verbindungen werden mit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses transportiert. Bei einer Migrationszeit von etwa 520 s treten Signale sehr geringer Intensität für die mit dem EOF

transportierten Spezies auf. Ferrocen sowie Ferrocenmethanol werden als hydrophobe Analyten nur mit schlechter Effizienz in der ESI-Quelle protoniert. Eine Oxidation der Ferrocenverbindungen, wie sie Xu et al. [126] beschrieben haben, hat unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen und im Fall des verwendeten CE-ESI-Interfaces offensichtlich nur eine untergeordnete Bedeutung. Auf den Zusatz eines EOF-Markers kann verzichtet werden, da die nichtoxidierten Formen von Ferrocen und Ferrocenmethanol als ungeladene Spezies den EOF selbst markieren. Ebenfalls mit dem EOF migriert eine weitere Spezies mit  $m/z$  199,02. Dabei handelt es sich um ein Methylferrocenradikal, dass während des ESI-Prozesses unter Abspaltung eines Hydroxylradikals aus Ferrocenmethanol hervorgeht. [P1]

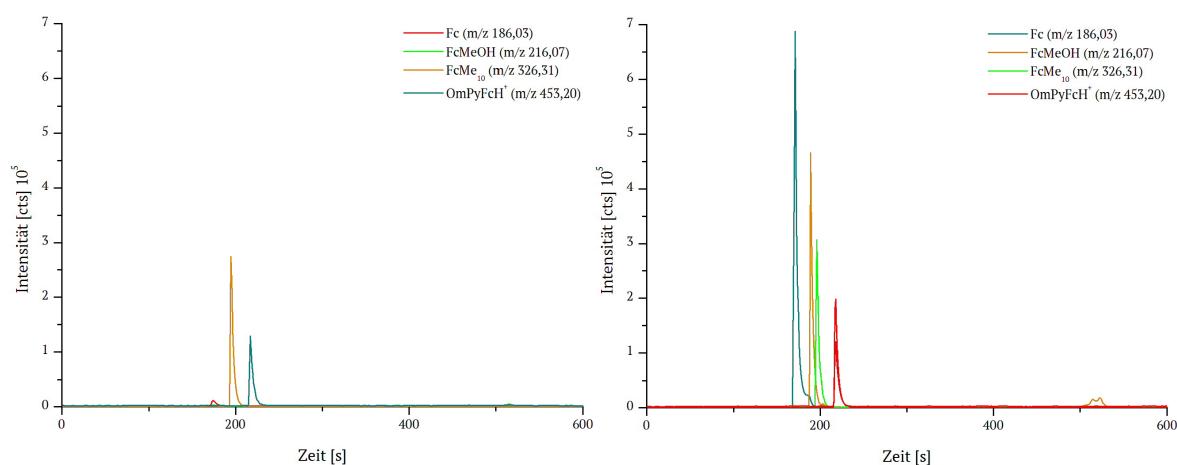


Abb. 20. Elektropherogramme nach EAI-CE-MS von Ferrocen (1,5 mM), Ferrocenmethanol (1 mM), Decamethylferrocen (40  $\mu$ M) und Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (160  $\mu$ M) ohne EAI (links) und mit EAI,  $E = 1$  V, (rechts). Als Elektrolytlösung wurde ACN/1 M AcOH/10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  verwendet. Die Trennung erfolgte in einer Quarzkapillare (ID 50  $\mu$ m, 70 cm) bei einer Trennspannung von 30 kV. [P1]

Während der EAI findet im Injektionsschritt bei einem Potential von 1 V eine Oxidation aller vorliegenden Ferrocenderivate statt. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass im Fall der EAI eine Trennung aller vier Ferrocenderivate in Form kationischer Spezies möglich ist. Zuvor ungeladene Analyten wie Ferrocen und Ferrocenmethanol werden in ihre oxidierte Form umgewandelt und können somit kapillarelektrophoretisch neben den beiden bereits geladenen Ferrocenderivaten aufgetrennt werden. Zu beachten ist allerdings, dass abhängig von der Gestaltung der EAI-Zelle ein gewisser Anteil von nicht umgesetzten Neutralanalyten injiziert wird, d. h. die coulometrische Effizienz der EAI liegt meist unter 100%. [P1] Die Elektropherogramme verdeutlichen auch, dass zusätzlich zu der erreichten Trennung der Neutralanalyten durch die Überführung in geladene Spezies eine beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit bei der anschließenden massenspektrometrischen Detektion erreicht werden kann. Allgemein ist die höchste Sensitivität mit ESI-MS für Analyten gegeben, die in ionischem Zustand in Lösung vorliegen [78]. Dies wurde durch dieses EAI-CE-MS-

Experiment realisiert. Vergleicht man die Intensitäten der verschiedenen Analyten ohne und mit EAI, so ergibt sich für Ferrocenmethanol eine Intensitätssteigerung von  $0,3 \cdot 10^5$  cts auf  $4,7 \cdot 10^5$  cts. Ferrocen ist ohne EAI nicht detektierbar, erreicht jedoch im geladenen Zustand eine Intensität von  $6,8 \cdot 10^5$  cts. Selbst der bereits in ionischer Form vorliegende Analyt **FcMe<sub>10</sub><sup>+</sup>** steigert seine Intensität um 30.000 cts. Es kann vermutet werden, dass die durch Luftsauerstoff vermittelte Oxidation vom Decamethylferrocen zu Decamethylferrocenium-Ion nicht vollständig erfolgte. Erst durch das Anlegen einer höheren Spannung von 1,0 V erfolgte eine vollständige Oxidation. Eine Besonderheit tritt jedoch bei der protonierten Form von Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (**OmPyFcH<sup>+</sup>**) auf. Hier sinkt die Intensität sogar von  $1,25 \cdot 10^5$  cts auf  $1,20 \cdot 10^5$  cts. Dieses Verhalten wird im folgenden Unterkapitel näher erläutert.

## 5.2. Besonderheit im Protonierungsverhalten

Das EAI-CE-MS-Konzept lässt sich somit auch für mechanistische Untersuchungen anwenden. Als Beispiel für diese Anwendung wurde das Protonierungsverhalten von Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Eisens näher betrachtet. Abbildung 21 zeigt die Massenspektren für zwei nebeneinander vorliegende Spezies, das protonierte Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (Molekülpeak  $m/z$  453,2 mit Eisen im Oxidationszustand +2) und das nichtprotonierte Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (Molekülpeak  $m/z$  452,2 mit Eisen im Oxidationszustand +3). Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen treten im ESI-Prozess offenbar beide Ionen auf. Ohne EAI überwiegt jedoch die protonierte Spezies mit Eisen im Oxidationszustand +2 (linkes Massenspektrum). Bei Anwendung der EAI überwiegt die deprotonierte Form mit Eisen im Oxidationszustand +3 (rechtes Massenspektrum). [P1]

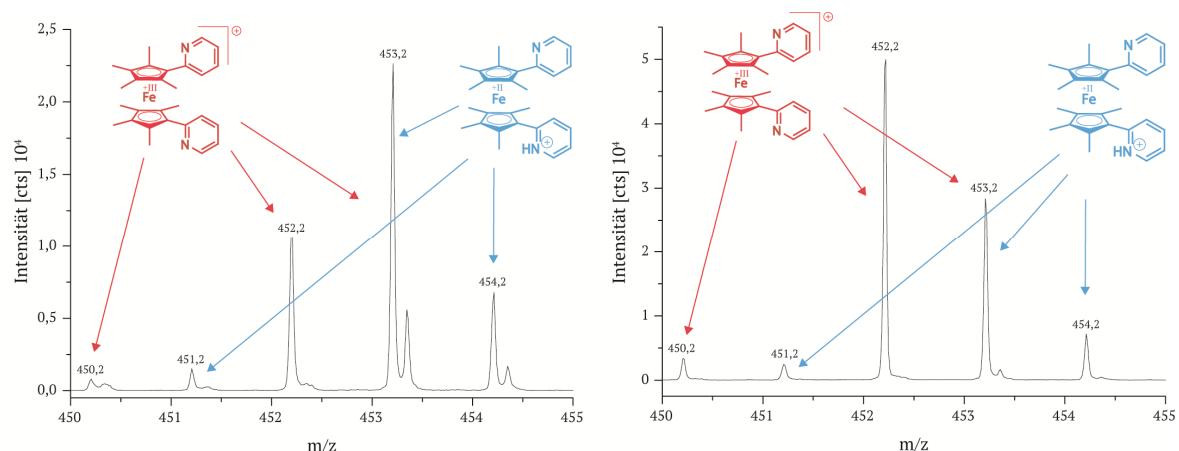


Abb. 21. Massenspektren von CE-MS-Signalen des Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocens ohne EAI (links) und mit EAI (rechts). Die Pfeile markieren die zu den jeweiligen Analyten gehörigen Isotopen-Peaks. [P1]

Nach elektrochemischer Oxidation kehrt sich das Signalverhältnis von protonierter zu nichtprotonierter Form um. Mit der elektrochemischen Oxidation des Eisens kommt es offenbar zur Deprotonierung des Pyridylsubstituenten. Dieser weist aufgrund seiner  $\pi$ -Orbitale einen bevorzugten Aufenthaltsraum für die positive Ladung auf. Es ist somit davon auszugehen, dass die während der Oxidation des Eisens gebildete Ladung nicht direkt dort lokalisiert ist, sondern in den  $\pi$ -Orbitalen delokalisiert vorliegt. Elektrochemische Studien von Übergangsmetallkomplexen und aromatischen Ringsystemen bestätigen diese Vermutung [127]. Das Vorliegen einer positiven Ladung am Pyridylsubstituenten erschwert die Anlagerung eines Protons, so dass das Hydrolyse-Gleichgewicht empfindlich gestört wird. Die Möglichkeit, dass sich eine zweifach positiv geladene Spezies während des EAI-CE-MS-Prozesses gebildet hat, konnte nicht nachgewiesen werden. Die beiden kationischen Spezies weisen nur sehr geringfügige Unterschiede bezüglich der elektrophoretischen Mobilität auf, so

dass eine kapillarelektrophoretische Trennung nicht realisiert werden kann. Die Isotopenpeaks, die nicht durch den jeweils anderen Analyten beeinflusst werden können, lassen sich sicher diskriminieren. Sie sind in Abbildung 22 dargestellt. Für die nichtprotonierte Form wurde demnach m/z 450,20 gewählt, für die protonierte Form m/z 454,20. [P1]

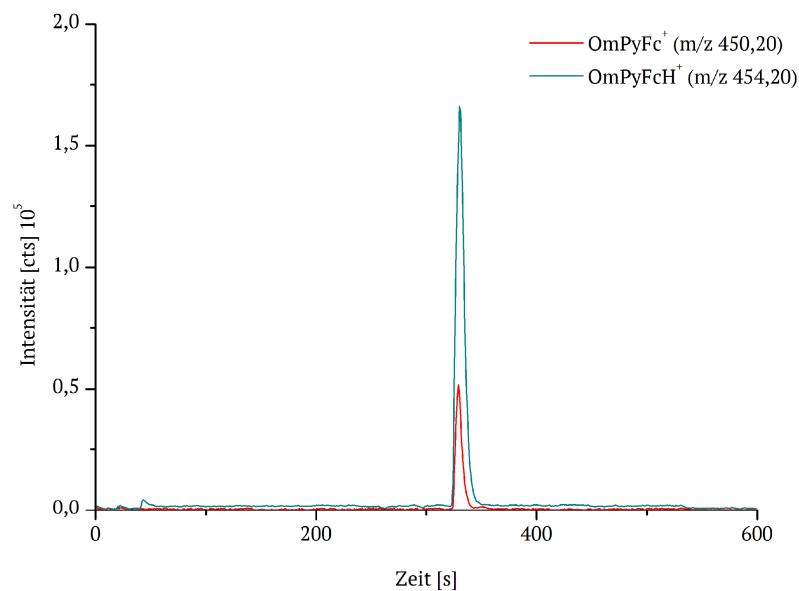


Abb. 22. Elektropherogramm von Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen (**OmPyFc**) im Rahmen eines EAI-CE-MS-Experiments. Dargestellt sind die jeweils selektiven extrahierten Massenspuren der oxidierten (**OmPyFc<sup>+</sup>**) und der protonierten (**OmPyFcH<sup>+</sup>**) Spezies. [P1]

### 5.3. Zusammenfassung

Die Kapillarelektrophorese ist eine leistungsfähige, hocheffiziente Trennmethode mit großer Anwendungsbreite. Die Kopplung von CE mit der Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie ist aufgrund der hervorragenden Selektivität und des sehr guten Nachweisvermögens der MS-Detektion sehr attraktiv. Problematisch ist jedoch die Trennung von Neutralanalyten mittels CE mit nachfolgender Detektion durch ESI-MS.

Mit dem Konzept der elektrochemisch assistierten Injektion konnte eine Trennung von Neutralanalyten mittels CE mit exzellenter Kompatibilität zur ESI-MS gezeigt werden. Das Prinzip der EAI basierte auf der elektrochemischen Umwandlung von redoxaktiven Analyten während des Injektionsschrittes in das Kapillarfließsystem. Die Motivation für diese methodische Entwicklung beinhaltete mehrere Aspekte. Zum einen konnten durch die elektrochemische Umwandlung aus neutralen Analyten ionische Spezies generiert werden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten eine CE-Trennung ermöglichten. Zum anderen waren mechanistische Studien elektrochemischer Reaktionen möglich, wobei die Kapillarelektrophorese als sehr schnelle und effiziente Trenntechnik genutzt werden konnte, um das gebildete Produktgemisch zu untersuchen. Im Kontext von CE-MS-Messungen war weiterhin interessant, dass im Fall der elektrochemischen Konvertierung von Neutralanalyten zu geladenen Produkten das Nachweisvermögen der ESI-MS-Detektion verbessert werden konnte. Gerade hydrophobe Analyten, die im ESI-Prozess eine geringe Ionisierungseffizienz zeigten, konnten nach einer elektrochemischen Umwandlung zu Produkten führen, die sich nachweisstark massenspektrometrisch detektieren ließen.

## 6. Kapitel

# Oxidativer Stress und seine Wirkung auf das Nukleosid Guanosin

Oxidativer Stress spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von DNA- und RNA-Schädigungen in biologischen Zellen. Wenn körpereigene Reparaturmechanismen versagen oder nur unzureichend agieren, kann es zu diversen Krankheiten wie Krebs und neurodegenerativen oder kardiovaskulären Erkrankungen kommen. [P2] Guanosin ist aufgrund seines relativ niedrigen Redoxpotentials vorrangig Ziel oxidativer Angriffe. Um Abläufe und grundlegende Begebenheiten besser zu verstehen, wurde der oxidative Stress an Guanosin mit dem EAI-CE-MS-Konzept simuliert. Auf diesem Weg konnten Oxidationsprodukte elektrochemisch gebildet, anschließend kapillarelektrophoretisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert werden.

Die Einführung einer automatischen EAI-Zelle mit bedeutend kleinerem Elektroden-Arrangement ermöglichte es, bioanalytische Proben mit deutlich reduzierten Volumina von 50 µl zu untersuchen. Zudem bestand die Möglichkeit, kommerziell erhältliche Siebdruckelektroden (DropSens) schnell und unkompliziert zu ersetzen.

### 6.1. Cyclovoltammetrische Messungen

Bevor EAI-CE-MS-Messungen durchgeführt werden konnten, mussten vorbereitende Experimente erfolgen. Dazu wurde zunächst das voltammetrische Verhalten von Guanosin untersucht. Eine 4 mM Guanosin-Lösung in wässrigem Puffer (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) zeigte ein eindeutiges elektrochemisches Verhalten (Abbildung 23). Als Elektrode wurde für alle Messungen eine Kohlenstoff-Siebdruckelektrode (SPCE) verwendet. Bei einem Potential von 650 mV beginnt die Oxidation zum Oxidationsprodukt 8-Oxoguanosin. Dieser Zwei-Elektronen-Zwei-Protonen-

Mechanismus erfolgt irreversibel [128]. Eine weitere (reversible) Oxidation zum Guanosin-Dimer, wie sie bei der einzelnen Base Guanin zum jeweiligen Dimer beobachtet wurde [129], konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht gezeigt werden. Die Oxidationsstudien für das Guanosin wurden bei drei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Neben der beschriebenen alkalischen Bedingung (pH 9,25) wurde das oxidative Verhalten unter sauren (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 4,75) und neutralen Bedingungen (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7,40) untersucht. Auf der Basis der cyclovoltammetrischen Ergebnisse ergab sich ein nutzbarer Potentialbereich von 0,6 bis 1,5 V für die elektrochemisch assistierte Injektion. [P2]

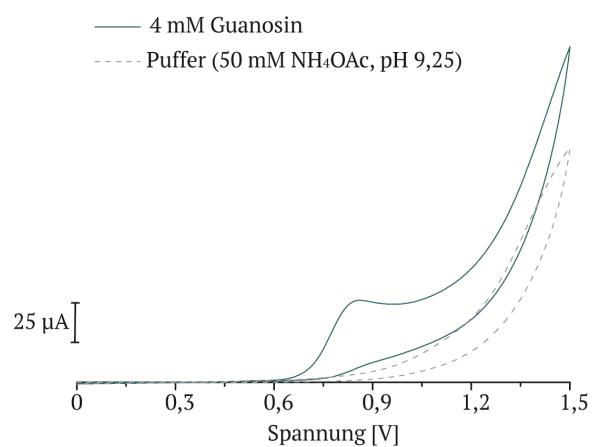


Abb. 23. Cyclovoltammogramm einer 4 mM Guanosin-Lösung in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer (pH 9,25) an einer SPCE. Vorschubgeschwindigkeit 50 mV/s. [P2]

## 6.2. Elektrochemische Fließzell-Experimente

Der zweite wichtige Schritt zur Vorbereitung von Messungen mittels EAI-CE-MS sind Fließzell-Experimente. Diese wurden mit einer elektrochemischen Durchflusszelle (DropSens) durchgeführt. Ziel war es, einen Überblick über die möglichen gebildeten Oxidationsprodukte von Guanosin zu bekommen. Dazu wurden die Massenspektren der nichtoxidierten und der oxidierten Guanosin-Lösung verglichen. Die Oxidation wurde an einer SPCE durchgeführt.

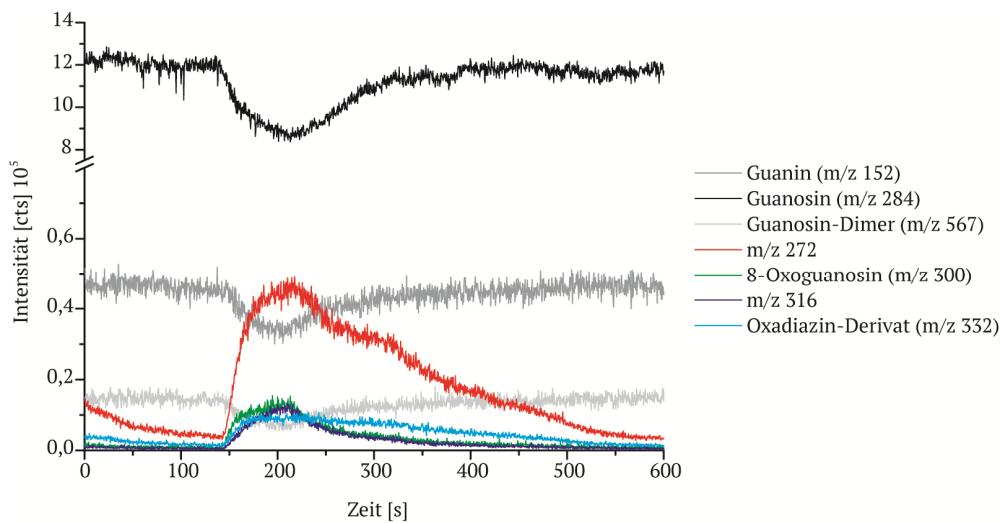


Abb. 24. Intensitätsverlauf der Edukte und Oxidationsprodukte während der Oxidation von 2 mM Guanosin in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc (pH 9,25) bei 1,2 V an einer SPCE. Die Oxidation startete bei 150 s für eine Dauer von 60 s.

Am Beispiel einer 2 mM Guanosin-Lösung unter alkalischen Bedingungen soll gezeigt werden, welche Oxidationsprodukte bei Potentialen von 0,8 bis 1,5 V neben 8-Oxoguanosin entstehen. Es zeigte sich, dass die Intensität des Guanosins (m/z 284) mit Beginn der Oxidation um etwa 40% abnimmt (Abbildung 24). Ebenso verhält es sich mit Guanin (m/z 152) sowie dem Guanosin-Dimer (m/z 567), welches sogar um 70% reduziert wird. Die Dimerisierung des Guanosins und die Abspaltung des Zuckers zum Guanin erfolgten vermutlich im Elektrospray in der ESI-Quelle. Wann die Modifikation des Guanosins erfolgt, kann durch die Implementierung eines Trennprinzips wie der Kapillarelektrophorese geklärt werden, da sich im Falle der Abspaltung vor der Detektion Unterschiede im Migrationsverhalten ergeben würden. Eine Aussage aufgrund eines einfachen EC-MS-Experiments kann nicht vorgenommen werden. Durch den Anstieg der Signalintensität ab dem Beginn der Oxidation konnten Oxidationsprodukte identifiziert werden. Neben 8-Oxoguanosin (m/z 300) und einem Oxadiazin-Derivat (m/z 332) [92] wurden zwei weitere Produkte mit m/z 272 und m/z 316 detektiert. Abbildung 24 zeigt den Intensitätsverlauf der drei Ausgangsverbindungen und der vier

Oxidationsprodukte bei einer Oxidationsspannung von 1,2 V. Das Messprotokoll beinhaltete zunächst die Aufzeichnung des Signals ohne Anlegen einer Spannung an der Arbeitselektrode der elektrochemischen Durchflusszelle von 2 min. Anschließend wurde die jeweilige Spannung im Bereich von 0,8 bis 1,5 V für eine Dauer von 1 min angelegt. Im Anschluss wurde etwa 7 min gewartet, bis das Ausgangsniveau der Intensitäten wieder erreicht worden war.

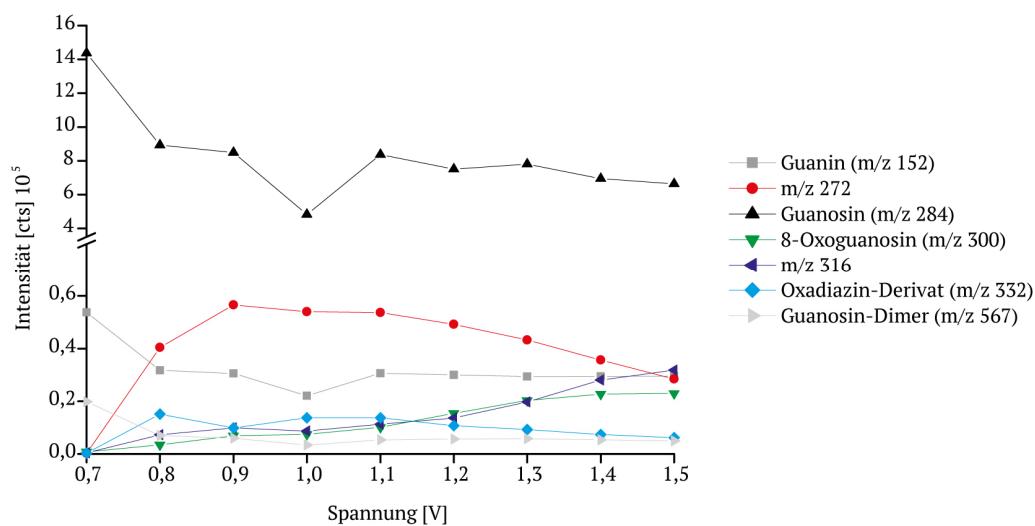


Abb. 25. Potentialabhängiger Intensitätsverlauf der Edukte und Produkte während der Guanosin-Oxidation im Fließzell-Experiment.

Abbildung 25 zeigt den potentialabhängigen Intensitätsverlauf von Ausgangsstoffen und Oxidationsprodukten. In Abbildung 26 sind nur die Intensitätsverläufe der Produkte dargestellt. Alle vier Oxidationsprodukte waren unter Standardbedingungen ( $U = 0$  V) nicht detektierbar. Ab einer angelegten Spannung von 0,8 V stiegen die Intensitäten an. Das Oxidationsprodukt mit der höchsten Intensität war das Signal mit  $m/z$  272, welches mit maximaler Intensität bei einer Spannung von 0,9 V gebildet wurde. Das Oxadiazin-Derivat mit  $m/z$  332 erreicht seine höchste Intensität ebenfalls bei einer Spannung von 0,9 V. Anders verhält es sich mit den beiden anderen nachgewiesenen Oxidationsprodukten. Sowohl 8-Oxoguanosin ( $m/z$  300) als auch das Produkt  $m/z$  316 steigen kontinuierlich an und erreichen ihre höchste Intensität bei 1,5 V. Da diese Spannung mit dem Beginn der Sauerstoffbildung des wässrigen Puffers zusammenfällt, konnte diese nicht weiter erhöht werden. Die einsetzende Blasenbildung unterbrach den Flüssigkeitstransport durch die Kapillare. Somit stellt eine Spannung von 1,5 V die oxidative Grenze in diesem Experiment dar.

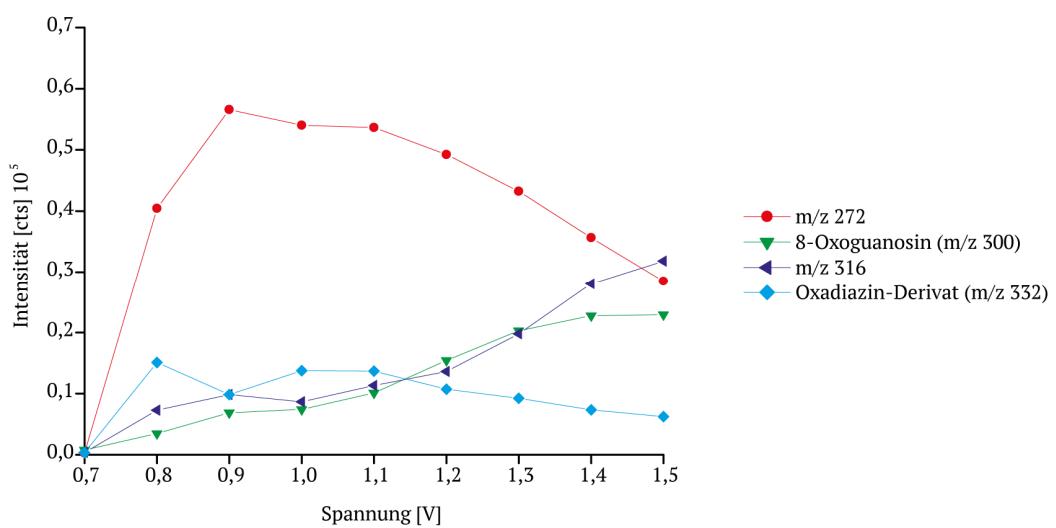


Abb. 26. Potentialabhängiger Intensitätsverlauf der Oxidationsprodukte von 2 mM Guanosin (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) im Fließzell-Experiment.

### 6.3. Oxidation und Trennung mittels EAI-CE-MS

Die ersten EAI-CE-MS-Experimente wurden unter alkalischen Bedingungen (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) mit einer 2 mM Guanosinlösung realisiert (Abbildung 27). Erwartungsgemäß ist Guanosin (m/z 284) das einzige Signal, das ohne elektrochemische Konvertierung erhalten wird (links). Guanosin liegt unter den gegebenen alkalischen Bedingungen negativ geladen vor. Guanin (m/z 152) und das Guanosin-Dimer (m/z 567) migrieren mit Guanosin zusammen, womit bestätigt wird, dass die Zuckerabspaltung im Electrospray erfolgt. Wird die elektrochemisch assistierte Injektion bei 1,3 V für 120 s angewendet, sind vier weitere Signale detektierbar (rechts). Das Guanosin-Signal (m/z 284) entsprach etwa nur noch der Hälfte der Ausgangssignalstärke. Im Elektropherogramm wird deutlich, dass 8-Oxoguanosin (m/z 300) und das Oxidationsprodukt m/z 316 eine negative Ladung tragen müssen, da sie den Detektor nach dem EOF passieren. Das Oxadiazin-Derivat (m/z 332) und das Oxidationsprodukt m/z 272 tragen unter den alkalischen Bedingungen keine Nettoladung und migrieren mit dem EOF zusammen. [P2]

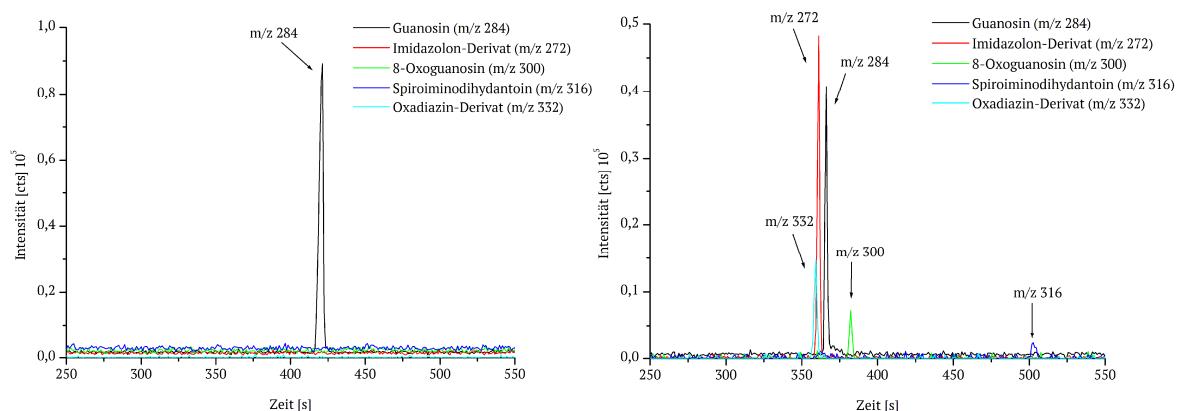


Abb. 27. Elektropherogramme für die extrahierten Massenspuren von Guanosin und dessen Oxidationsprodukten ohne (links) und mit (rechts) EAI bei 1,1 V für 120 s. Es werden  $[M+H]^+$ -Spezies gezeigt. Die CE-Trennung erfolgte bei 10 kV mit einer *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 50 cm). [P2]

Alle Strukturformeln, die in der Auswertung der Guanosin-Oxidation eine Rolle spielten, sind in Abbildung 28 grafisch dargestellt. In der Literatur wurden zahlreiche Oxidationsprodukte vermutet und genannt. So schließen Goyal et al. [130] aus der Auswertung von Cyclovoltammogrammen, dass im Zuge des Oxidationsmechanismus doppelt- und dreifach hydroxylierte Guanosinspezies auftreten. Die Verbindung mit m/z 316 ( $[M+H]^+$ ) stellt mit 5-Hydroxy-8-oxoguanosin (**5-OH-8-oxo-Gs**) solch eine doppelt hydroxylierte Spezies dar. Das gleiche Masse-zu-Ladungsverhältnis findet sich jedoch für Spiroiminodihydantoin (**Sp**). Der große Vorteil von EAI-CE-MS-Messungen besteht darin, das elektromigrative Verhalten als wichtige Information zur Strukturaufklärung hinzuziehen zu können.

Das Oxidationsprodukt m/z 316 ist unter den vorliegenden pH-Bedingungen negativ geladen. **5-OH-8-oxo-Gs** besitzt einen pK<sub>S</sub>-Wert von 5,8 [131] und liegt somit neutral vor. Spiroiminodihydantoin hingegen sollte unter den gegebenen Bedingungen negativ geladen sein (pK<sub>S1</sub> 0,5; pK<sub>S2</sub> 4,8 [132]). Somit kann mit Hilfe der kapillarelektrophoretischen Trennung eine eindeutige Zuordnung des Peaks mit m/z 316,10 zum Oxidationsprodukt Spiroiminodihydantoin erfolgen. In weiteren Publikationen wurde **Sp** als Hauptprodukt der Guanosinoxidation unter alkalischen Bedingungen gefunden [133] und die Umlagerung von **5-OH-8-oxo-Gs** zum Spiroiminodihydantoin gezeigt [134]. [P2]

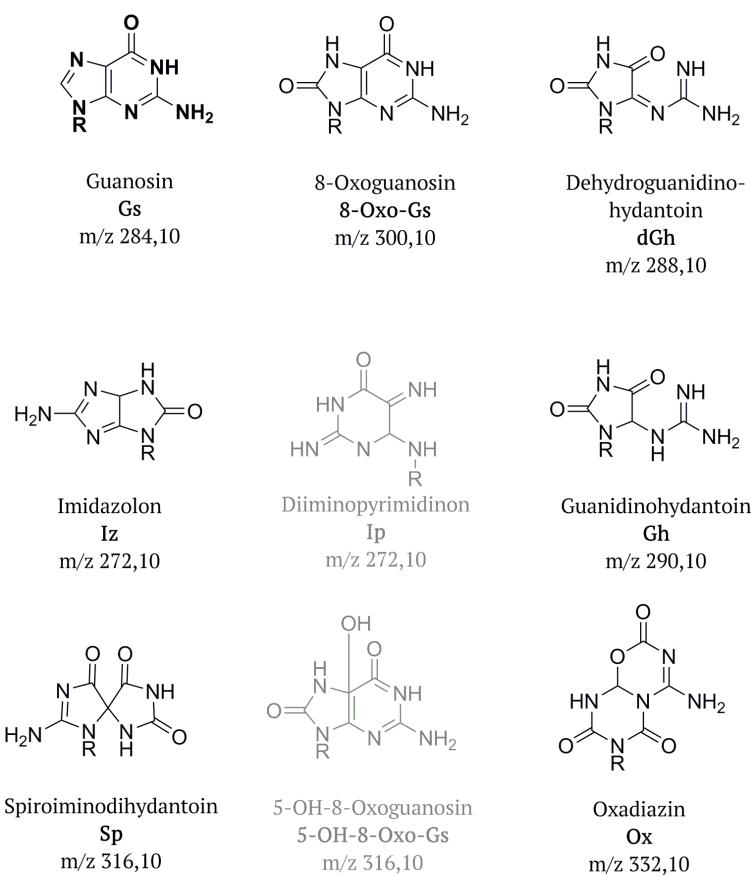


Abb. 28. Strukturformeln und m/z-Werte [M+H]<sup>+</sup> von Guanosin und dessen vermuteten Oxidationsprodukten. R entspricht 2'-Desoxyribose. Alle grau unterlegten Strukturen konnten aufgrund ihres elektromigrativen Verhaltens ausgeschlossen werden. [P2]

Um dem Oxidationsprodukt m/z 272 ein Gesicht geben zu können, wurden eine genaue Massenbestimmung sowie Fragmentierungsexperimente mit einem Q-Tof-MS (Agilent Technologies) durchgeführt. Mit einer Massengenauigkeit von 0,97 ppm (m/z 272,0995) wurde die Summenformel C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> erhalten. Das Oxidationsprodukt trägt unter den alkalischen Verhältnissen keine Ladung

und migriert zusammen mit dem elektroosmotischen Fluss. MS/MS-Experimente zeigten ein intensives Fragment-Ion ( $m/z$  140,0554), welches der modifizierten Nukleobase Guanin nach Abspaltung von 2'-Desoxyribose entspricht. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Oxidation an der Nukleobase und nicht am Zuckerrest erfolgt. Für die ermittelte Summenformel konnten zwei mögliche Verbindungen bestimmt werden. Zum einen beschrieben sowohl Sheu et al. [135] als auch Kang und Foote [136] die Umwandlung von geschütztem Guanin zu 2,5-Diimino-2,5-dihydro-3*H*-pyrimidin-4-on (**Ip**) während der photoinduzierten Oxidation. Eine weitere mögliche Struktur schlugen Volk et al. vor, wobei sie die Umwandlung von Harnsäure nach elektrochemischer Behandlung untersuchten. Dabei stellten sie eine Decarboxylierung fest, die in einem bizyklischen Imidazolon (**Iz**) resultierte. Sie vermuteten einen ähnlichen Mechanismus für **5-OH-8-oxo-Gs**. Analog zu den Informationen, die aus dem elektromigrativen Verhalten für  $m/z$  316 gezogen werden konnten, kann eine Ermittlung der Nettoladung unter Zuhilfenahme der  $pK_s$ -Werte auch im Fall der unbekannten Struktur für  $m/z$  272 hilfreich sein. EAI-CE-MS-Experimente wurden nicht nur unter alkalischen Bedingungen durchgeführt, sondern ebenso unter sauren (pH 4,25) sowie physiologischen (pH 7,40) Bedingungen. In beiden Fällen ist  $m/z$  272 positiv geladen, da es vor dem EOF migriert. Das spricht für die Struktur des Imidazolon-Derivates **Iz**, während für das Diiminopyrimidinon-Analogon **Ip** ein  $pK_s$ -Wert von 5,13 berechnet werden kann (mittels Advanced Chemistry Development Software, SciFinder). Für **Ip** würde sich daher ein unterschiedliches Migrationsverhalten unter sauren und neutralen Bedingungen ergeben. Zusammenfassend kann daher dem Peak bei  $m/z$  272 **Iz** als Struktur zugewiesen werden. [P2]

## 6.4. Variation der Oxidationsspannung

Für eine detailliertere Darstellung des oxidativen Verhaltens wurde die Abhängigkeit der Intensitäten der Oxidationsprodukte von der Höhe der Spannung während der Oxidation untersucht. Dafür wurden die gemessenen Daten in einem dreidimensionalen Elektropherogramm dargestellt (Abbildung 29), in dem die Intensität als Funktion der Migrationszeit und angelegten Spannung während der Oxidation in der EAI-Zelle auftritt. Zur besseren Verständlichkeit sind nur die extrahierten Massenspuren der Oxidationsprodukte gezeigt. [P2]

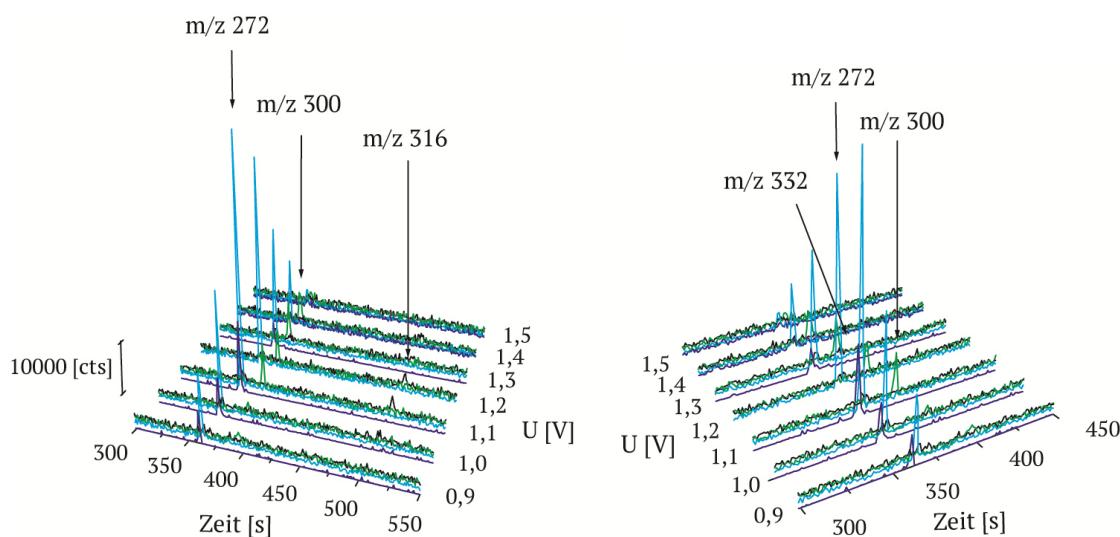


Abb. 29. Potentialabhängiges Elektropherogramm einer 2 mM Guanosin-Lösung (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) nach EAI-CE-MS-Experimenten. Zur besseren Darstellung wurde die Zeitachse-Achse gedreht. Die linke Abbildung zeigt einen Ausschnitt der rechten Abbildung. Es werden nur die extrahierten Massenspuren der Oxidationsprodukte gezeigt. [P2]

Die Bildung von Oxidationsprodukten ist erst ab einer Spannung von 0,9 V nachweisbar. Die Aufnahme des Cyclovoltammograms (Abbildung 23, Kapitel 6.1.) zeigt einen Beginn der Oxidation bereits ab einer niedrigeren Spannung von 0,65 V an. Diese Diskrepanz kann auf geringe Unterschiede in der Methodik zwischen schrittweiser Erhöhung der Spannung bei der EAI gegenüber der dynamischen Cyclovoltammetrie zurückgeführt werden. Ebenso könnte die limitierte Verlässlichkeit der Quasi-Referenzelektroden der SPCE Grund für eine leichte Verschiebung sein. [P2]

Analog zu den Ergebnissen der Fließzell-Experimente werden die Oxidationsprodukte **Ox** (m/z 332) und **Iz** (m/z 272) bereits bei relativ niedrigen Spannungen ab 0,9 V gebildet. Sie erreichen ihre jeweilige maximale Intensität bei 1,1 V während des EAI-Prozesses. Das Oxadiazin-

Derivat **Ox** ist ab einer Spannung von 1,4 V nicht mehr detektierbar. **Iz** stellt unter alkalischen Bedingungen das Produkt mit der höchsten Intensität im gesamten Spannungsbereich von 0,9 bis 1,5 V dar. 8-Oxoguanosin (m/z 300) wird erst bei höheren Spannungen von 1,0 bis 1,4 V detektiert. **Sp** (m/z 316) tritt als Oxidationsprodukt bei 1,2 V auf. Bei einer Spannung von 1,4 V ist es bereits nicht mehr detektierbar. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Daten des Fließzell-Experiments (Abbildung 25, Kapitel 6.2), so wird das Erreichen der maximalen Intensität für **Ox** und **Iz** tendenziell bestätigt. Der spannungsabhängige Intensitätsverlauf ist um 200 mV verschoben, entspricht jedoch dem des Fließzell-Experiments. Für **8-Oxo-Gs** liegt das Intensitätsmaximum im EAI-CE-MS-Experiment ebenfalls bei 1,1 V. Bei Erhöhung der Spannung während der elektrochemischen Injektion sinkt jedoch die Intensität des 8-Oxoguanosin-Signals kontinuierlich ab. Spiroiminodihydantoin zeigt seine höchste Intensität bei 1,2 V. Anschließend ist ein Absinken der Signalstärke zu beobachten. [P2]

Wie wichtig eine Trennung von Analyten und möglichen Oxidationsprodukten durch eine zusätzliche Trennmethode, wie der CE, vor der Detektion mittels MS sein kann, wird hiermit verdeutlicht. Verschiedene Faktoren beeinflussen die elektrochemischen Prozesse in der Fließzelle. So ist der Stofftransport zur Elektrodenoberfläche durch Diffusion aufgrund des kontinuierlichen Zustroms nichtoxidierter Guanosin-Lösung nicht vergleichbar zur elektrochemisch assistierten Injektion. Es zeigt sich, dass Fließzell-Experimente eine gute Grundlage bilden, um beispielsweise unbekannte Verbindungen zu identifizieren. Ein reales Verhältnis von Intensitäten kann jedoch nur mit EAI-CE-MS abgebildet werden. Eine weitere negative Beeinflussung, wie Ionensuppression im Elektrospray, kann mit einer vorweggeschalteten Trennmethode wie der Kapillarelektrophorese vermieden werden.

## 6.5. pH-Abhängigkeit der Oxidation von Guanosin

Der pH-Wert einer wässrigen Pufferlösung bestimmt den Ladungszustand des Guanosins. Unter sauren Bedingungen liegt Guanosin positiv geladen vor, da die 7-N-Position protoniert wird ( $pK_{S1}$  2,20, [93]). Unter physiologischen Bedingungen besitzt Guanosin keine Ladung, während im Alkalischen die 3-N-Position deprotoniert vorliegt und Guanosin negativ geladen ist ( $pK_{S2} = 9,50$  [93]) (Abbildung 30). Ebenso besteht ein Einfluss auf Hydrolysegleichgewichte möglicher Oxidationsprodukte. Somit ist es von großem Interesse, pH-Werte zu variieren und die Oxidationsvorgänge bei unterschiedlichen pH-Werten zu diskutieren. [P2]

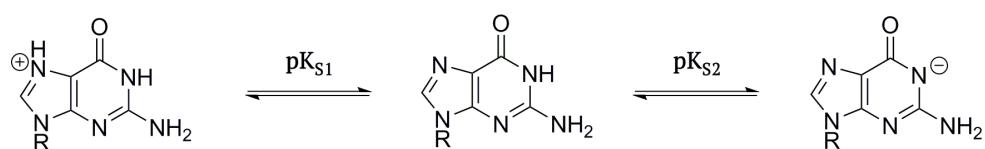


Abb. 30. Hydrolysegleichgewicht von Guanosin in wässriger Lösung.  $pK_{S1}$  liegt bei 2,20,  $pK_{S2}$  liegt bei 9,50.

### 6.5.1. Messungen unter sauren pH-Bedingungen

Guanosin wurde in einem 50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer mit pH 4,75 gelöst und analog des Protokolls für alkalische Bedingungen sowohl in der elektrochemischen Fließzelle als auch im EAI-CE-MS-Experiment untersucht. Drei der bereits bekannten Oxidationsprodukte unter alkalischen Bedingungen wurden auch unter sauren Bedingungen detektiert: Das Imidazolon-Analogon **Iz** (m/z 272), 8-Oxoguanosin (m/z 300) sowie Spiroiminodihydantoin **Sp** (m/z 316). Das Oxadiazin-Derivat **Ox** konnte unter sauren Bedingungen nicht detektiert werden. **Iz** stellt nun jedoch nicht mehr das Oxidationsprodukt mit der höchsten Intensität dar. Ein neues Produkt, Dehydroguanidinohydantoin (**dGh**) mit m/z 288 erreicht die höchsten Intensitäten bei einer Spannung von 1,4 V. Ein weiteres Oxidationsprodukt, Guanidinohydantoin (**Gh**, m/z 290), tritt ebenfalls unter den Reaktionsbedingungen bei saurem pH-Wert auf. Allgemein ist interessant, dass eine Intensitatsverringerung des Guanosins verbunden mit einer Intensitätserhöhung der Produkte schon ab einer Spannung von 0,8 V (und damit um 100 mV früher als unter alkalischen Bedingungen) beginnt. **Sp** konnte erst bei höheren Spannungen von 1,4 bis 1,5 V detektiert werden. In Tabelle 8 sind die Abhängigkeiten der gebildeten Oxidationsprodukte des Guanosins von der Spannung während des EAI-Prozesses bei verschiedenen pH-Werten zusammengefasst. So besitzen **Iz** und **dGh** die höchste Intensität bei 1,1 V, während **Gh** bei 1,0 V mit maximaler Intensität gebildet wird. **8-Oxo-Gs** wird, im

Gegensatz zur Messung unter alkalischen Pufferbedingungen bereits bei 1,0 V mit höchster Intensität detektiert. [P2]

Es treten keine negativ geladenen Oxidationsprodukte auf. Alle Analyten migrieren vor oder mit dem EOF. Guanosin als Ausgangsprodukt liegt ebenso wie **8-Oxo-Gs** und **Sp** neutral vor. **Iz** passiert den Detektor noch vor **dGh** und **Gh**. Alle drei Analyten tragen eine positive Ladung. [P2]

#### 6.5.2. Messungen unter physiologischen pH-Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen liegt Guanosin neutral vor und migriert mit dem EOF-Marker Coffein. Als Puffer wurde eine 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit einem pH-Wert von 7,40 verwendet. Mit Spiroiminodihydantoin (m/z 316) und dem Oxadiazin-Derivat (m/z 332) sind zwei Oxidationsprodukte aus der Messung unter alkalischen Bedingungen nicht mehr detektierbar. Dehydroguanidinohydantoin (m/z 288) und Guanidinohydantoin (m/z 290) werden jedoch vergleichbar zu den Messungen unter sauren pH-Bedingungen nachgewiesen. **Gh** ist dabei der Analyt mit der höchsten Intensität (bei 1,3 V). Weitere Produkte sind **Iz** und **8-Oxo-Gs**, die über den gesamten pH-Bereich von 4,75 bis 9,25 als Oxidationsprodukte vertreten sind. Betrachtet man die Intensität von Dehydroguanidinohydantoin, so ist interessant, dass eine Steigerung (bezogen auf die Intensität des Guanosins) mit abnehmendem pH-Wert auftritt. Entgegengesetzt verhält es sich mit **Iz**, das mit steigendem pH-Wert seine Signalintensität steigert. Die Oxidation von 8-Oxoguanosin zum mutmaßlichen Produkt Guanidinohydantoin wird in der Literatur als stark pH-abhängig beschrieben [137]. Die besondere Rolle, die **8-Oxo-Gs** im Mechanismus der Guanosin-Oxidation als primäres Oxidationsprodukt spielt, wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben. [P2]

Tab. 8. Relative Abhängigkeit der Intensitäten der Oxidationsprodukte von pH-Wert des Puffers und Spannung während der EAI-CE-MS-Experimente. Die jeweiligen maximalen Intensitäten der Oxidationsprodukte sind hervorgehoben. Coffein wird mit Cof abgekürzt, die Migrationszeit mit  $t_m$  [P2]

Puffer	m/z [M+H] <sup>+</sup>	$t_m$ [s]	U [V]	Intensität [%] relativ zur Intensität des Guanosinsignals						
				0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3
pH 4,75 (50 mM NH <sub>4</sub> OAc)	Cof (EOF)	195,20	454							
	Gs	284,10	454	100	100	100	100	100	100	100
	Iz	272,10	322	—	—	—	8,26	<b>19,30</b>	7,28	3,05
	dGh	288,10	408	—	—	17,07	23,10	<b>39,18</b>	20,20	15,95
	Gh	290,10	335	—	8,41	9,88	<b>10,07</b>	6,84	3,31	1,60
	8-Oxo-Gs	300,10	454	—	—	8,48	<b>13,34</b>	9,60	6,20	4,48
	Sp	316,10	454	—	—	—	—	—	—	5,26
	Ox	332,10	—	—	—	—	—	—	—	5,80
	Cof (EOF)	195,20	433	100	100	100	100	100	100	100
	Gs	284,10	433	—	—	—	—	2,85	2,87	6,47
pH 7,40 (50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Iz	272,10	358	—	—	—	—	2,42	5,15	<b>12,40</b>
	dGh	288,10	431	—	—	—	—	—	—	11,35
	Gh	290,10	429	—	—	3,72	14,62	30,92	37,60	<b>53,27</b>
	8-Oxo-Gs	300,10	433	—	—	—	3,77	4,78	4,84	<b>5,83</b>
	Sp	316,10	—	—	—	—	—	—	—	3,94
	Ox	332,10	—	—	—	—	—	—	—	5,08
	Cof (EOF)	195,20	359							
	Gs	284,10	366	100	100	100	100	100	100	100
	Iz	272,10	361	—	—	24,26	35,70	<b>119,09</b>	95,17	77,85
	dGh	288,10	—	—	—	—	—	—	—	49,52
pH 9,25 (50 mM NH <sub>4</sub> OAc)	Gh	290,10	—	—	—	—	—	—	—	13,51
	8-Oxo-Gs	300,10	382	—	—	7,01	5,91	25,36	19,85	<b>31,76</b>
	Sp	316,10	503	—	—	—	—	13,11	11,41	—
	Ox	332,10	359	—	11,14	11,18	<b>34,82</b>	29,30	16,27	—
	Cof (EOF)	195,20	359							

## 6.6. Ein besonderes Oxidationsprodukt: 8-Oxoguanosin

Für ein besseres Verständnis des Oxidationsmechanismus von Guanosin wurde 8-Oxoguanosin in einer separaten Oxidationsstudie untersucht. 8-Oxoguanosin (2 mM in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) besitzt ein verhältnismäßig niedriges Redoxpotential von 250 mV. Ziel war es, primäre und sekundäre Oxidationsprodukte zu bestimmen und für die Mechanismus-Aufklärung nutzen zu können.

### 6.6.1. Konzentrationsbestimmung

Da nicht prinzipiell davon ausgegangen werden kann, dass unterschiedliche Analyten, wie in diesem Fall Guanosin und 8-Oxoguanosin, in gleichem Maße im MS in der ESI-Quelle ionisiert werden, wurde die Konzentration von 8-Oxoguanosin mittels Kalibrierung bestimmt. Dazu wurde eine 2 mM Stammlösung von 8-Oxoguanosin (in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) hergestellt und in unterschiedlichen Verdünnungen mittels CE-MS analysiert. Es wurde eine *Fused Silica*-Kapillare (ID 50 µm, 50 cm) bei einer Trennspannung von 10 kV genutzt. Die hydrodynamische Injektion wurde für 15 s ausgeführt. Aus den Messwerten wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe die Konzentration von 8-Oxo-Gs während der Oxidationsstudien des Guanosins ermittelt werden konnte.

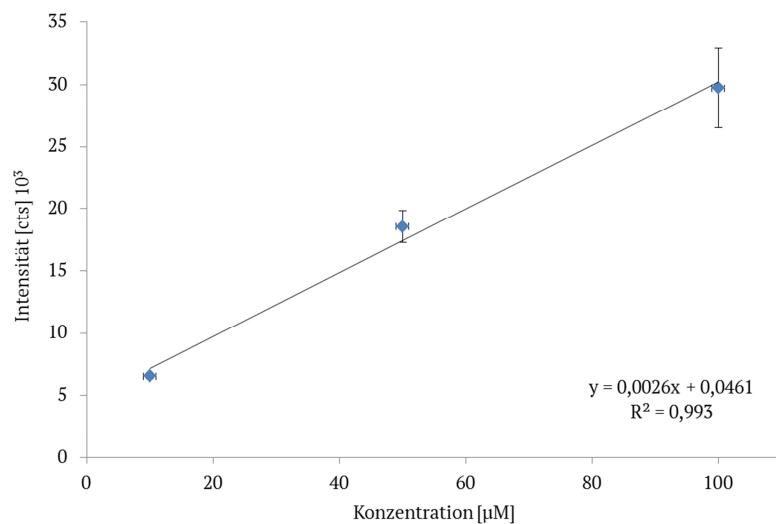


Abb. 31. Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung von 8-Oxoguanosin in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25.

Daraus resultiert beispielsweise für ein Signal des 8-Oxoguanosins von 10.000 cts gerade einmal eine Konzentration von 21 µM. Die Signalintensität für Guanosin einer vergleichbaren Konzentration von 20 µM liegt lediglich bei etwa 1.000 cts. 8-Oxoguanosin wird demnach um den Faktor 10 sensitiver

als Guanosin im ESI-Prozess ionisiert. Dies verdeutlicht noch einmal, welchen zusätzlichen Einfluss die Art des Analyten auf dessen Ionisation in der ESI-Quelle besitzt.

### 6.6.2. pH-Abhängigkeit der Oxidation

8-Oxoguanosin wird in der Literatur als primäres Oxidationsprodukt bei der Oxidation von Guanosin beschrieben [138]. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde das EAI-CE-MS-Protokoll für die direkte Oxidation von **8-Oxo-Gs** verwendet und das Auftreten der Oxidationsprodukte mit denen der Guanosin-Oxidation verglichen.

Die Experimente wurden in den gleichen drei Pufferzusammensetzungen vorgenommen wie bei der Guanosin-Oxidation. Abbildung 32 zeigt die Elektropherogramme der EAI-CE-MS-Versuche mit der optimalen jeweiligen Produktzusammensetzung bei folgenden Spannungen: Die Messungen im sauren pH-Bereich sind bei 0,9 V dargestellt, im Alkalischen wurde das Elektropherogramm bei 0,3 V Oxidationsspannung gewählt und unter physiologischen Verhältnissen wurde die Trennung nach einer Oxidation mittels EAI bei 0,8 V dargestellt. Für den alkalischen Bereich (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 9,25) ergeben sich im Vergleich zur Guanosin-Oxidation keine Unterschiede in der Produktzusammensetzung. **Iz** (m/z 272), **Sp** (m/z 316) sowie **Ox** (m/z 332) treten als Oxidationsprodukte auf. Das Intensitätsverhältnis ist jedoch nicht mehr für jedes Produkt mit den Ergebnissen der Guanosin-Oxidation vergleichbar. **Iz** ist ebenso wie bei der Guanosin-Oxidation der Analyt mit der höchsten Intensität. Das Verhältnis zum Spiroiminodihydantoin ist gleich geblieben, zum Oxadiazin-Analogon vergrößert es sich um mehr als das Doppelte. Dies könnte auf Diffusionseffekte zur Elektrode zurückzuführen sein. Im Fall der Guanosin-Oxidation muss zunächst 8-Oxoguanosin gebildet werden, das dann wiederum erst an der Elektrodenoberfläche zu den weiteren Produkten umgesetzt werden kann. Bei der direkten Oxidation entfällt dieser Transportschritt des 8-Oxoguanosins. Dies ist, gerade in Bezug darauf, dass keine vollständige Stoffumsetzung von Guanosin erfolgt, ein wichtiges Kriterium. [P2]

Unter sauren (pH 4,75) und neutralen pH-Bedingungen ist auch die Produktzusammensetzung gegenüber der Guanosin-Oxidation geringfügig verschieden. Im Sauren kann **Iz** nicht detektiert werden. Allgemein sind die Intensitäten der Produkte bei pH 4,75 sehr gering. 8-Oxoguanosin wird jedoch mit vergleichbarer Intensität wie bei den anderen beiden pH-Werten massenspektrometrisch erfasst. Unter physiologischen Bedingungen ist Dehydroguanidinohydantoin nicht nachweisbar. Dafür treten jedoch mit **Sp** (m/z 316) und **Ox** (m/z 332) zwei Produkte auf, die bei der Guanosin-Oxidation

nicht detektiert worden sind. Auch in diesen beiden Fällen kann die Diskrepanz der Produktzusammensetzung mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen erklärt werden. [P2]

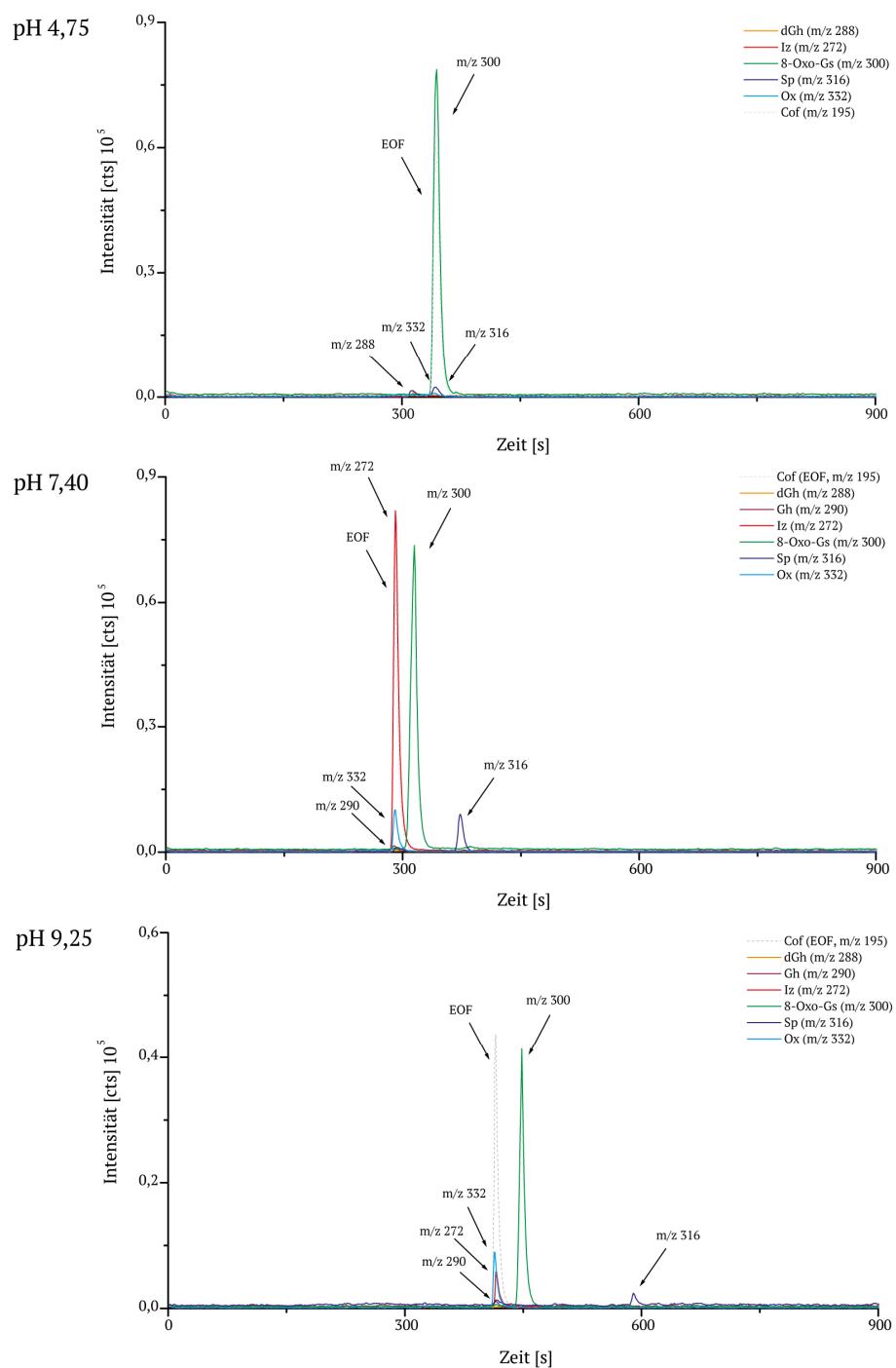


Abb. 32. Ausgewählte Elektropherogramme von 8-Oxoguanosin und seinen Oxidationsprodukten bei drei verschiedenen pH-Werten (pH 4,75, pH 7,40, pH 9,25). Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 10 kV in einer *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 50 cm).

Die Ergebnisse der Oxidationsstudie des 8-Oxoguanosins bestätigen qualitativ die These, dass 8-Oxoguanosin als primäres Oxidationsprodukt auftritt und alle weiteren Produkte als sekundäre Produkte daraus hervorgehen (Abbildung 33).

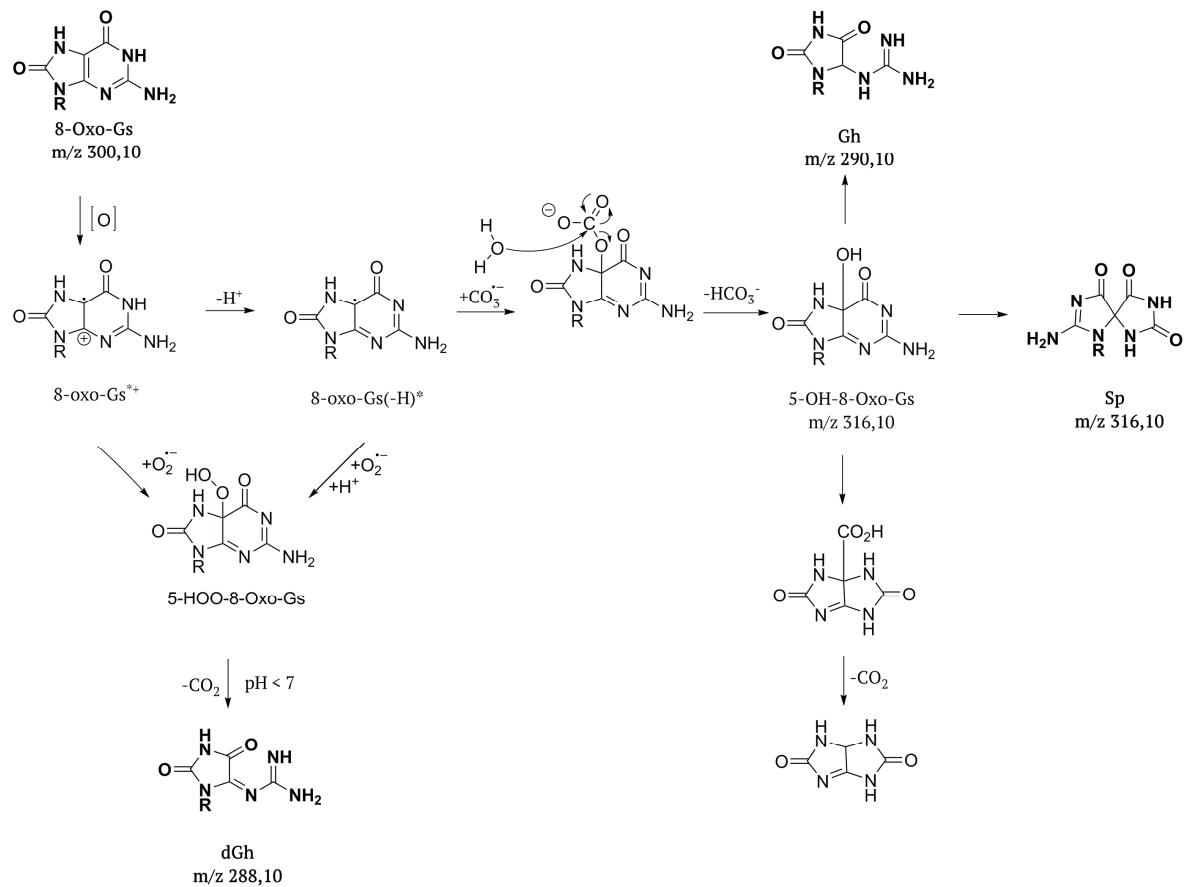


Abb. 33. Vermuteter Oxidationsmechanismus des 8-Oxoguanosins. Adaptiert aus [138] und [139].

## 6.7. Vor- und Nachteile der Oxidation von Guanosin mittels EAI-CE-MS ein Vergleich mit weiteren publizierten Methoden

Um Oxidationsstudien unter definierten Bedingungen durchzuführen, bieten elektrochemische Messungen eine hervorragende Grundlage. In direkter Kombination mit der Massenspektrometrie kann eine einfache Methode zur Simulation oxidativen Stresses erstellt werden. Baumann et al. [140] nutzten eine Bor-dotierte Diamant-Elektrode (BDD-Elektrode) in einer elektrochemischen Durchflusszelle, um fünf Nukleotide, darunter 2'-Deoxyguanosin-5'-monophosphat, oxidativ zu untersuchen. Sie imitierten die Bildung von Hydroxylradikalen bei Spannungen bis zu 2,5 V. Sie vermuteten, dass sowohl der direkte Elektronentransfer von der Elektrode als auch die mögliche Bildung von Radikalen Einfluss auf die Oxidation der Nukleotide hat. Durch den Gebrauch der BDD-Elektrode bei sehr hohen Spannungen werden jedoch vorzugsweise Hydroxylradikale gebildet. Somit kann nur schwer zwischen primären und sekundären Elektrodenvorgängen unterschieden werden. Als Produkte wurden dehydrogenierte Verbindungen als auch eine Vielzahl hydroxylierter Spezies detektiert. Zuvor berichtete dimere und tetramere Strukturen [141] konnten nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Studie zeigte die Bildung vernetzter Spezies, konnte jedoch kein 8-Oxoguanosin identifizieren [142]. Es ist bekannt, dass Guanosin dazu neigt, selbstkomplementär dimere und tetramere Strukturen auszubilden, die über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden [143]. Solche Strukturen können den ESI-Prozess überstehen und als kovalent gebundene Dimere fehlinterpretiert werden. Die Implementierung eines Trennsystems kann diesen Sachverhalt klären. Während der Oxidation von Guanosin und 8-Oxoguanosin durch EAI-CE-MS sind ebenfalls dimere Strukturen detektiert worden. Diese besaßen jedoch das gleiche Migrationsverhalten wie Guanosin bzw. 8-Oxoguanosin selbst. Wären sie während der Oxidation gebildet worden, hätte aufgrund des deutlichen Massenunterschieds eine kapillarelektrophoretische Trennung der geladenen Spezies erfolgen müssen. Demnach ereignete sich die Dimerisierung erst in der ESI-Quelle. [P2]

Die Arbeitsgruppe um Oberacher [144] identifizierte neben hydroxylierten Derivaten auch vernetzte Analyten. Eine direkte Kopplung von Elektrochemie und MS stellt zwar eine einfache und schnelle Methode dar, oxidative Prozesse in der Bioanalytik zu untersuchen, dennoch sind quantitative Aussagen durch das Auftreten einer möglichen Ionensuppression während des ESI-Prozesses limitiert. Daher ist ein Trennschritt zwischen EC und MS die logische Konsequenz. Erb et al. [120] publizierten eine Methode für EC- $\mu$ LC-MS, mit der 8-Oxoguanosin sowie zwei isomere Formen eines kovalent gebundenen Guanosin-Dimers als primäre Oxidationsprodukte identifiziert wurden. Weitere Oxidationsprodukte, die zuvor durch EC-MS-Experimente detektiert wurden, konnten nur in Spuren detektiert werden. Sie vermuteten, dass diese Produkte instabil seien und innerhalb des

zeitlichen Rahmens eines LC-MS-Laufs zerfielen. Des Weiteren könnte das Vorhandensein organischer Lösungsmittel einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Oxidationsprodukte haben. [P2]

In allen Studien wurde eine Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser genutzt, was für den Gebrauch von elektrochemischen Durchflusszellen in Kopplung mit MS notwendig erscheint. Ebenso kann in der Flüssigchromatographie nicht auf den Zusatz organischer Lösungsmittel verzichtet werden. Gerade in Bezug auf die Simulation biologischer Redoxprozesse, die in der Mehrzahl im Wässrigen ablaufen, muss dies als Nachteil betrachtet werden. Der große Vorteil der Kapillarelektrophorese gegenüber der Flüssigchromatographie ist die Anwendbarkeit rein wässriger Trennpuffer. In der Methodik eines EAI-CE-MS-Laufs werden erst während der Ionisation in der ESI-Quelle über die *Sheath Liquid* organische Lösungsmittel zugesetzt. Die bedeutsamen Schritte der Oxidation und Separation erfolgen ausschließlich im Wässrigen. Zeitlich betrachtet sind etwaige instabile Produkte nur sehr kurz organischen Lösungsmitteln ausgesetzt. Die Simulation von physiologischen Bedingungen ist somit hervorragend mit einem EAI-CE-MS-Experiment zu verwirklichen. Aufgrund der Bildung von geladenen Produktspezies ist EAI-CE-MS eine sehr gut geeignete Methode, um oxidative Prozesse zu untersuchen. [P2]

Betrachtet man die Vielzahl an Veröffentlichungen zur Thematik „Oxidation von Guanosin“ und vergleicht man die verschiedenen Methoden, die vorgestellt wurden, so erkennt man, dass die Produktzusammensetzung sehr stark von der Wahl der experimentellen Bedingungen, wie dem Elektrodenmaterial und der Pufferzusammensetzung, aber auch von Trennbedingungen und ESI-Parametern während der MS-Detektion abhängt. [P2]

## 6.8. Zusammenfassung

Mit der Untersuchung des oxidativen Verhaltens von Guanosin und 8-Oxoguanosin wurde erstmalig eine bioanalytische Anwendung für das Konzept EAI-CE-MS verwirklicht. Neben vorbereitenden Experimenten mit Cyclovoltammetrie und einfacher EC-MS-Kopplung wurden die EAI-CE-MS-Messungen mit einer automatischen EAI-Zelle durchgeführt. Diese überzeugt durch die Verwendung von Siebdruckelektroden, die es ermöglichen, schnell und unkompliziert Elektroden auszutauschen und ebenso eine sehr geringe Probenmenge benötigen.

Aufgrund seiner Bedeutung während des Prozesses von DNA- und RNA-Schädigungen durch oxidativen Stress, stellt Guanosin das Biomolekül der Wahl dar. Es besitzt das niedrigste Redoxpotential von allen Nukleosiden und kann durch pH-Variation in verschiedene Ladungszustände überführt werden, womit es gut mittels CE von verschiedenen Oxidationsprodukten getrennt werden kann. Sowohl die elektrochemische Konvertierung als auch die CE-Trennung erfolgten ausschließlich in wässrigen Puffern. Damit kann die Simulation oxidativen Stresses nahe an physiologischen Bedingungen untersucht werden. Das elektromigrative Verhalten der Produkte diente als wertvolles Kriterium, um eine Strukturzuordnung von möglichen Verbindungen mit identischer Summenformel vorzunehmen.

Die Studie des oxidativen Verhaltens von 8-Oxoguanosin bestätigte qualitativ die Ergebnisse der Guanosin-Oxidation. Zudem konnte gezeigt werden, dass 8-Oxoguanosin eine entscheidende Rolle als primäres Oxidationsprodukt im Mechanismus der Guanosin-Oxidation spielt.

## 7. Kapitel

# Oxidationsstudien zum Naturstoff Rutin

Zahlreiche Studien wurden in den letzten Jahren durchgeführt, um den nützlichen Effekt phenolischer Verbindungen, die als natürliche Antioxidantien agieren, zu untersuchen. Rutin als Vertreter der Flavonoide zeichnet sich durch ein interessantes oxidatives Verhalten aus. Dieses Verhalten von Rutin unter oxidativen Bedingungen wurde elektrochemisch untersucht und mit dem Konzept des EAI-CE-MS-Experiments weiter vertieft. Dabei werden verschiedene Parameter wie Spannung und Elektrodenmaterial während der Oxidation sowie die Zusammensetzung des Puffermediums auf ihren Einfluss bei der Simulation physiologischer Prozesse im Rutin-Metabolismus untersucht.

### 7.1. Cyclovoltammetrische Messungen

Rutin (Abbildung 34) besitzt aufgrund seiner Flavon-Struktur drei protische Hydroxylgruppen und somit drei  $pK_s$ -Werte ( $pK_{s1}$  7,10;  $pK_{s2}$  9,15;  $pK_{s3}$  11,65) [115]. Um einen ausführlicheren Einblick in das Oxidationsverhalten von Rutin zu bekommen, wurden cyclovoltammetrische Messungen bei fünf verschiedenen pH-Werten von 3,0 bis 11,3 durchgeführt. Bei pH-Werten unter 7 liegt die vollständig protonierte Form vor. Bei einem pH-Wert zwischen 9,15 und 11,65 liegt eine zweifach deprotonierte Form vor, bei pH-Werten um 11,65 wird vorrangig die dreifach deprotonierte Form vorgefunden.

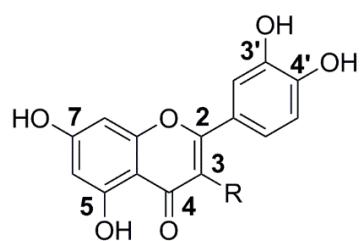


Abb. 34. Struktur von Rutin, R = Rutinose.

Es wurde eine 0,5 mM Rutin-Lösung in einem Britton-Robinson-Puffer (0,04 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 0,04 M AcOH) hergestellt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M NaOH auf fünf verschiedene Werte im Bereich von pH 3,0 bis pH 11,3 eingestellt. Dabei muss jedoch erwähnt werden, dass Rutin nur mäßig gut im Wässrigen löslich ist [145]. Erst ab einem pH-Wert von 8 liegt eine 0,5 mM Rutinlösung in vollständig gelöster Form vor. Für alle pH-Werte unter 8 wurden somit gesättigte Lösungen von Rutin vermessen. Des Weiteren wurden zwei unterschiedliche Siebdruckelektroden, SPCE und SPE-CNF, untersucht. Alle cyclovoltammetrischen Aufnahmen wurden wie in den Versuchen zuvor mit dem  $\mu$ Autolab III (Metrohm) durchgeführt.

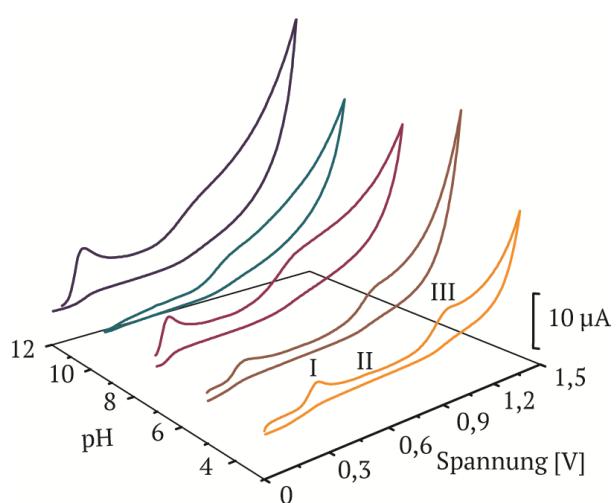


Abb. 35. 3D-Cyclovoltammogramm von Rutin auf SPCE bei verschiedenen pH-Werten: pH 3,0; pH 5,0; pH 7,0; pH 9,25 und pH 11,3. Vorschubgeschwindigkeit: 5 mV/s, Schrittpotential: 50 mV.

Abbildung 35 zeigt zunächst einen Überblick für die Rutin-Oxidation auf einer SPCE für alle fünf pH-Werte, wodurch Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den pH-Bereichen besser charakterisiert werden können. Allgemein lässt sich zeigen, dass bei pH-Werten unter 11,3 drei Oxidationspeaks identifiziert werden konnten. Peak I und Peak III sind dabei quasi-reversibel, Peak II ist irreversibel. Das erste Signal um 0,2 V entsteht durch die Oxidation Rutins zur 3',4'-Dihydroxybenzoësäure-Einheit, einem Zwei-Elektronenprozess. Peak II bei etwa 0,45 V resultiert lediglich aus dem Oxidationsprodukt, welches während der ersten Oxidation gebildet wurde. Die dritte Oxidationsstufe (0,8 V) gehört zur Oxidation der 5-C-OH-Gruppe und der 7-C-OH-Gruppe. Bei Erhöhung des pH-Wertes tritt eine Verschiebung des jeweiligen Oxidationspeaks in die negative Richtung um etwa -60 mV/pH-Einheit auf. Ab einem pH-Wert von 9 ist jedoch zu beobachten, dass Peak I nur unwesentlich ins Negative verschoben wird (ca. -5 mV/pH-Einheit), Peak II um lediglich etwa -20 mV/pH-Einheit, der dritte Oxidationspeak verschiebt sich weiterhin um etwa -56 mV/pH-Einheit. Wird der pH-Wert nun weiter erhöht, tritt sogar eine Verschiebung des Oxidationspeaks I in

die positive Richtung auf (+27 mV/pH-Einheit). Der Oxidationspeak II kann nicht mehr identifiziert werden und Signal III tritt ebenfalls erst bei höheren Potentialen um 0,7 V in Erscheinung, was eine Verschiebung von +64 mV/pH-Einheit bedeutet. Die beobachteten Effekte der Oxidationspeak-Verschiebung zeigen deutlich die pH-Abhängigkeit der Rutin-Oxidation. Die Oxidation der einfach deprotonierten Form ab pH 7 sowie der zweifach deprotonierten Form unterscheiden sich deutlich in ihrem elektrochemischen Verhalten von der vollständig protonierten Rutin-Form unter sauren pH-Bedingungen.

Mit den cyclovoltammetrischen Messungen konnte bestätigt werden, dass Rutin sowohl pH- als auch potentialabhängig mindestens drei Oxidationsprodukte ausbildet. Der signifikante Einfluss des pH-Wertes auf das elektrochemische Verhalten von Polyphenolen und Hydrochinonen wurde bereits mehrfach in der Literatur berichtet [146] und wird in dieser Arbeit bestätigt. Mit diesem Wissen soll nun eine Untersuchung des Oxidationsvorganges mittels Fließzell-Experiment einen ersten Aufschluss über mögliche Oxidationsprodukte geben und eine massenspektrometrische Identifizierung ermöglichen.

## 7.2. Bestimmung der Oxidationsprodukte mit der elektrochemischen Durchflusszelle

Mit Hilfe der elektrochemischen Durchflusszelle (DropSens) kann ein Überblick über mögliche Produkte während der Oxidation von Rutin gewonnen werden. Dazu wurde eine 1 mM Lösung von Rutin in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer (pH 9,25) vollständig gelöst und über eine Spritzenpumpe kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von 6 µl/min in die Durchflusszelle infundiert. Die Oxidation erfolgte in 100 mV-Schritten von 0,1 bis 1,5 V auf einer SPCE. Die massenspektrometrische Detektion wurde sowohl im positiven als auch im negativen Modus durchgeführt.

Im positiven ESI-Modus ist ab einem Potential von 0,4 V ein sichtbarer Anstieg der Intensitäten der Oxidationsprodukte von Rutin zu beobachten (Abbildung 36). Das Signal mit m/z 344 erreicht über die gesamte Messung des Fließzell-Experiments die höchste Intensität. Ein weiteres Oxidationsprodukt mit signifikant erhöhter Intensität stellt das Signal mit m/z 349 dar. Des Weiteren treten drei weitere Oxidationsprodukte mit geringen Intensitätserhöhungen auf (m/z 309, m/z 365, m/z 564). Bei einem Potential von 1,0 V wird für alle gefundenen Oxidationsprodukte die höchste individuelle Intensität erreicht. Anschließend sinkt die Intensität ab. Bei sehr hohen Potentialen um 1,5 V ist wiederum ein Anstieg zu verzeichnen. Bei diesen Potentialen ist jedoch von einer allmählichen Zersetzung des Puffers auszugehen, so dass die Oxidation des Rutins von weiteren Parametern beeinflusst wird.

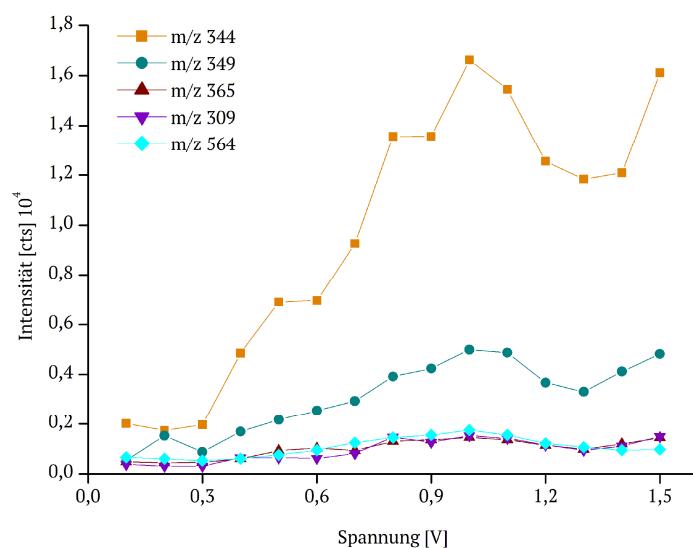


Abb. 36. Die Detektion erfolgte im ESI-positiven Modus. Intensitätsverlauf der Oxidationsprodukte von Rutin bei verschiedenen Spannungen. Fließzellexperiment mit 1 mM Rutin in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer (pH 9,25). Die Oxidation fand an einer SPCE statt.

Aufgrund der negativen Ladung des Rutins unter alkalischen Bedingungen ist es interessant, die Messungen im ESI-negativen Modus zu wiederholen. Die gleiche Rutin-Lösung (1 mM, pH 9,25) wurde dafür in der elektrochemischen Durchflusszelle oxidiert und massenspektrometrisch untersucht. Abbildung 37 zeigt den Intensitätsverlauf der beiden Ausgangsprodukte Rutin und Quercetin sowie der drei identifizierten Oxidationsprodukte mit m/z 517, m/z 323 und m/z 454. Die Verläufe der Intensitäten von Rutin und Quercetin schwanken sehr, was höchstwahrscheinlich auf die relativ schlechte Reproduzierbarkeit der Spritzenpumpengeschwindigkeit zurückzuführen ist. Dennoch ist folgende Grundaussage zu treffen: Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität während der Oxidation erwartungsgemäß absinkt. Der Verlauf des Produkts mit dem m/z-Verhältnis von 517 ist sehr interessant. Die Intensität erreicht ihr Maximum bereits bei 0,2 V und sinkt dann langsam bei weiterer Erhöhung der Oxidationsspannung ab. Im Vergleich zu den Intensitätsverläufen der Oxidationsprodukte, die im ESI-positiven Modus gefunden wurden (Abbildung 36), tritt das Intensitätsmaximum von m/z 517 im ESI-negativen Modus bereits bei einer sehr geringen Spannung auf. Im positiven Modus erreichten alle Oxidationsprodukte ihr Intensitätsmaximum bei 1,0 V. Unter ESI-negativen Messbedingungen treten die beiden Produkte mit m/z 454 und m/z 323 mit nur sehr geringer Intensität auf. Das Signal mit m/z 323 scheint sein Maximum bei 0,4 V zu erreichen, fällt dann wieder auf sein Grundniveau vergleichbar zum Zustand ohne Oxidation ab. Die Signalintensität des Oxidationsproduktes m/z 454 steigt sehr langsam an und erreicht ihre maximale Intensität erst bei 1,4 und 1,5 V.

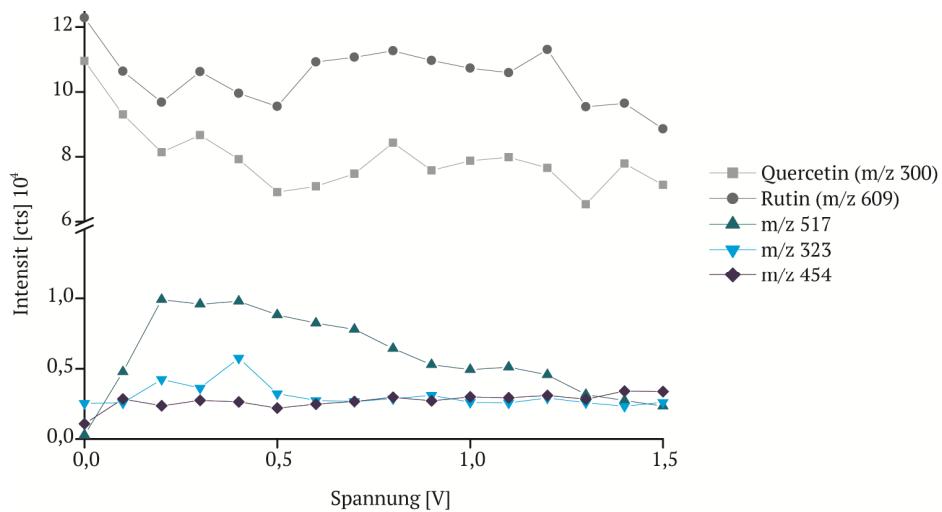


Abb. 37. ESI-negativer Messmodus. Intensitätsverlauf der Ausgangsstoffe und Produkte während der Oxidation von Rutin bei verschiedenen Spannungen von 0,1 bis 1,5 V. Fließzellexperiment mit 1 mM Rutin in 50 mM NH<sub>4</sub>OAc (pH 9,25). Oxidation fand an einer SPCE statt.

### 7.3. EAI-CE-MS

Erste Oxidationsexperimente wurden mittels EAI-CE-MS unter alkalischen Bedingungen (pH 9,25) an einer SPCE durchgeführt. Die Detektion erfolgte im ESI-positiven Modus. Zunächst wurde unter den angegebenen Bedingungen eine kapillarelektrophoretische Trennung bei 15 kV ohne zuvorige Oxidation durch EAI durchgeführt.

Neben dem EOF-Marker Coffein traten drei weitere Signale auf. Zum einen wurde die protonierte Form des Rutins ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$ , m/z 611) mit höchster Intensität detektiert. Diese migriert später als Coffein, womit Rutin unter den gegebenen Bedingungen (pH 9,25) negativ geladen sein muss. Der  $\text{pK}_\text{s}$ -Wert von 7,10 [115] bestätigt dies. Weitere Signale, die mit derselben Migrationszeit auftreten, sind das Natriumaddukt ( $[\text{Rutin}+\text{Na}]^+$ , m/z 633) und die protonierte Form des Quercetins ( $[\text{Quercetin}+\text{H}]^+$ , m/z 303). Quercetin geht aus der Abspaltung des Zuckers Rutinose vom Rutin hervor. Diese Abspaltung erfolgt in der ESI-Quelle. Findet nun eine Oxidation bei 1,0 V für 60 s statt, verringert sich zum einen die Signalintensität der Ausgangsprodukte ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$  (m/z 611),  $[\text{Rutin}+\text{Na}]^+$  (m/z 633) sowie  $[\text{Quercetin}+\text{H}]^+$  (m/z 303)) um etwa ein Drittel gegenüber der Ausgangsintensität ohne Oxidation während des Injektionsschrittes. Zum anderen treten vier Oxidationsprodukte auf, wobei alle die gleiche Migrationszeit wie der EOF-Marker Coffein besitzen (Abbildung 38).

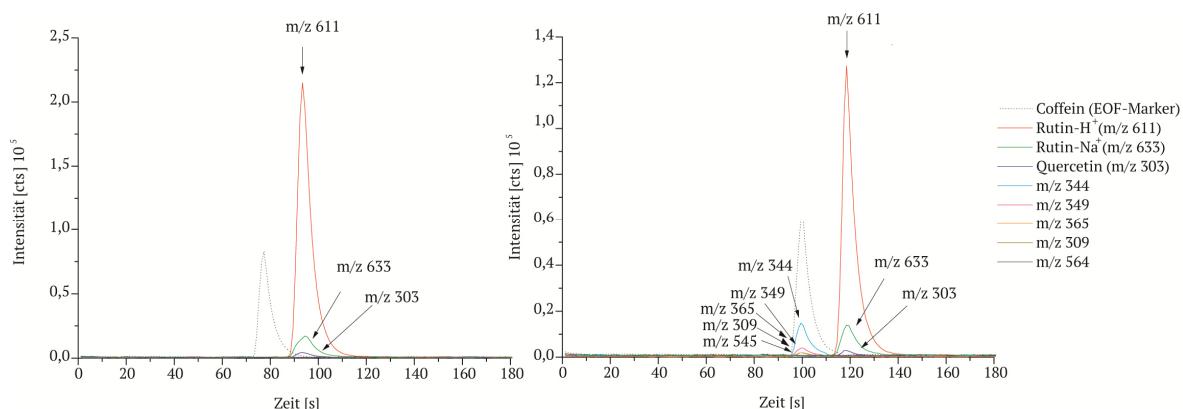


Abb. 38. Elektropherogramme von Rutin im ESI-positiven Modus ohne EAI (links) und mit EAI bei 1,0 V für 60 s (rechts). 1 mM Rutin (in 50 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer, pH 9,25); 15 kV Trennspannung, *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu\text{m}$ , 40 cm).

Die detektierten Verbindungen liegen neutral vor. Das Produkt mit m/z 344 besitzt die höchste Intensität, gefolgt von m/z 349. Die weiteren Peaks (m/z 365 und m/z 309) treten mit etwa gleich starker Intensität auf. Eine Trennung der Signale der Oxidationsprodukte von Rutin nach EAI-CE-MS

kann somit nicht festgestellt werden, da alle unter den alkalischen Pufferbedingungen (pH 9,25) im neutralen Ladungszustand vorliegen. Es wurde versucht, in zwei weiteren Puffersystemen die Messungen zu wiederholen. Doch sowohl unter sauren Bedingungen (50 mM NH<sub>4</sub>OAc-Puffer, pH 4,75) als auch unter neutralen pH-Bedingungen (50 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 7,40) konnte Rutin nicht ausreichend gelöst werden, um eine zufriedenstellende Trennung mit auswertbaren Intensitäten der Ausgangsstoffe und Produkte zu erreichen. Für die Untersuchung des Rutin-Metabolismus ist jedoch ein alkalischer pH-Bereich von großem Vorteil, da die Verstoffwechselung im menschlichen Körper vorrangig im Darm bei einem pH-Wert von etwa 8 erfolgt.

Gegenüber des Fließzell-Experiments (Abbildung 36, Kapitel 7.2.) tritt jedoch ein deutlicher Unterschied auf. Beim Fließzell-Experiment konnte bei einer Spannung von 1,0 V ein fünftes Oxidationsprodukt (m/z 564) detektiert werden. Das Signal besitzt zwar nur eine geringe Intensität, kann aber deutlich vom Rauschen des Hintergrundes unterschieden werden. Es scheint zunächst so, dass das Fließzell-Experiment daher besser geeignet ist, um die Oxidation des Naturstoffs Rutin zu beschreiben. Es treten jedoch beim Fließzell-Experiment relativ große Schwankungen in den Intensitäten auf, was auf die relativ schlechte Kontinuität der Spritzenpumpe zurückzuführen ist. Die Reproduzierbarkeit ist bei EAI-CE-MS-Experimenten signifikant höher. Somit ist EAI-CE-MS vergleichsweise die Methode der Wahl. Weitere Experimente bezüglich der Produktverteilung in Abhängigkeit von der Oxidationsspannung werden im folgenden Kapitel (7.3.1.) diskutiert.

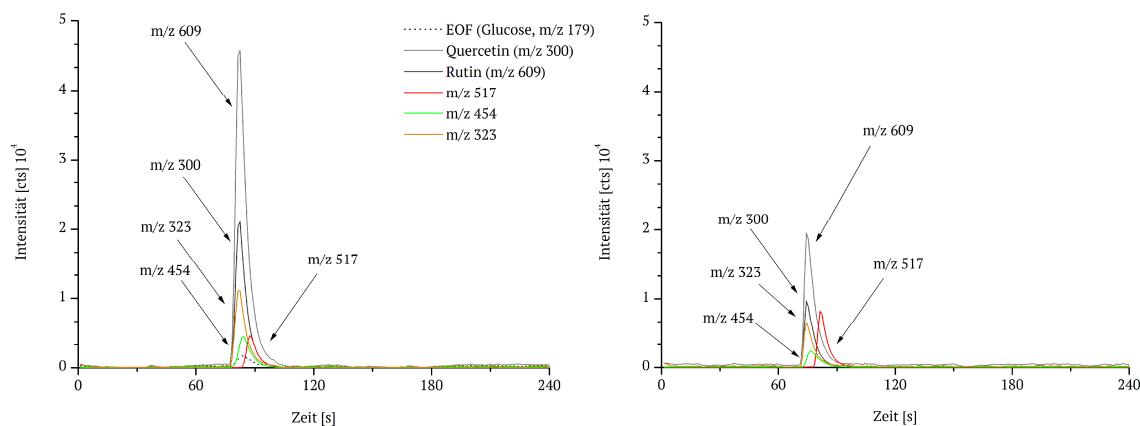


Abb. 39. Oxidation von Rutin mittels EAI-CE-MS im negativen ESI-Modus. (links) ohne EAI, (rechts) Oxidation bei 0,3 V. *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 40 cm)

In einer weiteren Versuchsreihe (Abbildung 39) wurde die massenspektrometrische Detektion im ESI-negativen Modus durchgeführt, um negativ geladene Oxidationsprodukte zu analysieren. Vergleichbar zu den Experimenten mit der elektrochemischen Fließzelle sinken die Intensitäten der

Edukte  $[\text{Rutin-H}]^-$  (m/z 609) und  $[\text{Quercetin-H}]^-$  (m/z 300) deutlich auf etwa ein Drittel der Ausgangsintensität beim Anlegen einer Spannung während der elektrochemisch assistierten Injektion ab. Das Oxidationsprodukt m/z 517 wird bevorzugt bei niedrigeren Spannungen von 0,1 bis 0,4 V gebildet. Der Vergleich der Elektropherogramme ohne und mit EAI bei 0,3 V verdeutlicht, dass das Produkt unter den gegebenen Bedingungen (pH 9,25) eine negative Ladung tragen muss, da es eine längere Migrationszeit als der EOF-Marker Glucose (m/z 179) aufweist. Eine Basislinientrennung des Analyten m/z 517 von den beiden Edukten konnte nicht erreicht werden. Dennoch ist ein Unterschied in den Migrationszeiten mit einer Differenz von 6 s zu erkennen.

### 7.3.1. Potentialabhängigkeit der Produktintensitäten

Um einen Gesamtüberblick darüber zu erlangen, bei welcher Spannung welche Oxidationsprodukte und in welcher Intensität unter den gegebenen Bedingungen, wie Pufferzusammensetzung und Elektrodenmaterial, gebildet werden, wurde ein potentialabhängiges Massenspektrum (Abbildung 40) erstellt. Dabei wurde der Intensitätsverlauf der Massenspektren bei steigenden Oxidationsspannungen von 0 V (ohne EAI) bis 1,5 V in 100 mV-Schritten gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität des Rutins ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$ , m/z 611) ab einer angelegten Spannung von 0,1 V bereits um etwa ein Drittel gegenüber der Ausgangsintensität sinkt. Das Intensitätsniveau hält sich bei steigender Spannung, sinkt noch einmal bei höheren Spannungen um 1,0 V ab und steigt ab 1,4 V leicht wieder an. In diesem Spannungsbereich treten jedoch erste Nebenreaktionen aufgrund der Pufferzersetzung auf. Des Weiteren ist die Intensitätszunahme des Oxidationsprodukts mit m/z 344 ab einer Spannung von 0,6 V zu erkennen. Sie erreicht ihr Maximum bei 1,0 V und fällt dann wieder leicht ab. Um Spannungen von 1,4 V ist ein leichter Anstieg der Intensität zu verzeichnen.

Für eine bessere Darstellung wurde eine Vergrößerung des Massenbereichs von m/z 250 bis m/z 550 vorgenommen. Der Ausschnitt wurde so gewählt, dass der Fokus auf die Intensitäten der Oxidationsprodukte gelegt wird. Wie bereits zuvor erwähnt, bildet m/z 344 das Oxidationsprodukt mit der höchsten Intensität. Nun ist klar zu erkennen, wie der potentialabhängige Intensitätsverlauf erfolgt. Als weiteres Oxidationsprodukt tritt ein Signal mit m/z 349 ebenfalls ab einer angelegten Spannung von 0,6 V auf. Das Intensitätsmaximum ist bei 1,1 V zu finden. Bei höheren Spannungen fällt die Intensität wieder ab, um bei 1,4 V und 1,5 V wieder leicht anzusteigen, wie es schon bei m/z 344 der Fall war. Den gleichen Intensitätsverlauf nimmt das Produkt mit m/z 365. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass mit Hilfe der potentialabhängigen Massenspektren das Oxidationsprodukt mit m/z 564 bereits bei relativ niedrigen Oxidationspotentialen von 0,3 bis 0,6 V

identifiziert werden kann. Mittels Fließzell-Experimenten (Abbildung 36, Kapitel 7.2.) wurde eine maximale Intensität um 1,0 V festgestellt. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Intensität zwar sehr gering ist, sich aber dennoch signifikant vom Hintergrundrauschen unterscheidet. Insgesamt bestätigen sich aber die Ergebnisse des vorangegangenen Fließzell-Experiments.

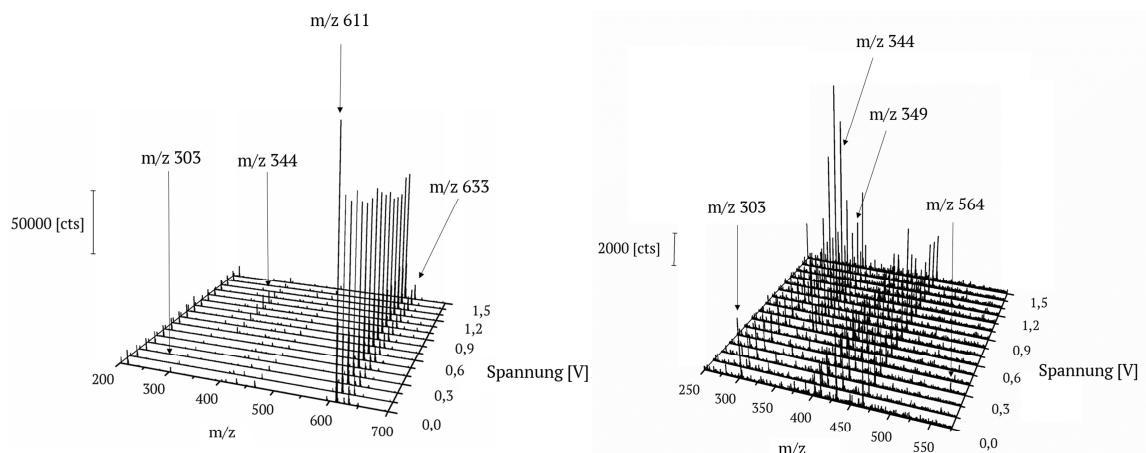


Abb. 40. Potentialabhängigkeit der Massenspektren für die Oxidation von Rutin mittels EAI-CE-MS. Es sind hintergrundreduzierte Massenspektren abgebildet. Die rechte Abbildung zeigt einen Ausschnitt mit Fokus auf die Oxidationsprodukte.

### 7.3.2. Einfluss der Oxidationszeit

Neben der Abhängigkeit der Intensitäten der Oxidationsprodukte von der jeweils angelegten Spannung während des EAI-Prozesses wurde auch ein Augenmerk auf die Oxidationszeiten gelegt (Tabelle 9). Dazu wurde eine 1 mM Rutin-Lösung (pH 9,25) bei 1,0 V für 10 s, 30 s, 60 s, 120 s und 180 s oxidiert. Die Injektion in das Kapillarfließsystem erfolgte jeweils während der letzten 10 s des Oxidationsprozesses. Um eine Aussage über die optimale Oxidationszeit treffen zu können, wurden jeweils die Intensitäten von Rutin ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$ , m/z 611) als Ausgangsprodukt sowie m/z 344 und m/z 349 als Oxidationsprodukte mit den höchsten Intensitäten verglichen. Interessanterweise korreliert die erwartete Intensitätsverringerung des Ausgangsproduktes Rutin (m/z 611) nicht zwangsläufig mit den Intensitätssteigerungen der beiden betrachteten Oxidationsprodukte m/z 344 und m/z 349 bei zunehmender Oxidationszeit. Die stärkste Verringerung der Rutin-Intensität erfolgt bei einer Oxidationszeit von 120 s. Die höchsten Intensitäten der Produkte wurden jedoch bei 60 s beobachtet, wobei hier eine relativ hohe Intensität des Rutins auftritt. Aufgrund der längeren Oxidationszeit von 120 s könnte es zu Folgereaktionen der beiden betrachteten Oxidationsprodukte gekommen sein, was die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen erklären würde. Da jedoch die

Intensitäten der Produkte für die Auswertungen entscheidender sind, wurde eine Oxidationszeit von 60 s gewählt.

Tab. 9. Intensitäten von Rutin ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$ , m/z 611) und den beiden intensitätsstärksten Produkten m/z 344 und m/z 349 während des EAI–CE–MS-Prozesses bei 1,0 V.

Oxidationszeit	Intensität [cts] (m/z 611)	Intensität [cts] (m/z 344)	Intensität [cts] (m/z 349)
10 s	$6,28 \cdot 10^4$	4962	1706
30 s	$4,19 \cdot 10^4$	7400	2432
<b>60 s</b>	$5,97 \cdot 10^4$	<b><math>1,38 \cdot 10^4</math></b>	<b>3516</b>
120 s	<b><math>2,72 \cdot 10^4</math></b>	$1,10 \cdot 10^4$	3116
180 s	$3,88 \cdot 10^4$	7368	2737

## 7.4. Vergleich zweier Elektrodenmaterialien

Einen weiteren einflussreichen Parameter stellt das Elektrodenmaterial der Siebdruckelektrode dar. Alle bisher vorgestellten Messungen wurden mit einer SPCE durchgeführt. Eine Modifizierung der Kohlenstoffelektrode ist mit der SPE-CNF gegeben. Das Material zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität, schnelle Elektronentransfer-Kinetiken und einen größeren Spannungsbereich aus. [147]

Es wurde zunächst die Rutin-Oxidation cyclovoltammetrisch an der SPE-CNF unter gleichen Bedingungen wie bei der SPCE getestet. Abbildung 41 zeigt eine Übersicht der Cyclovoltammogramme bei verschiedenen pH-Werten.

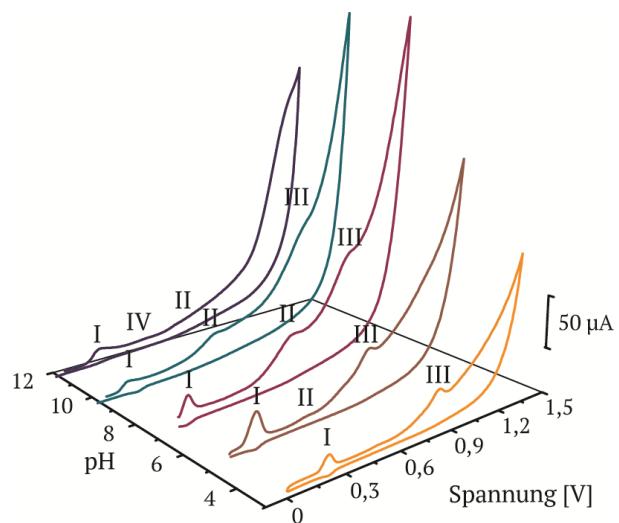


Abb. 41. 3D-Cyclovoltammogramme der Rutin-Oxidation bei fünf verschiedenen pH-Werten an einer SPE-CNF. Vorschubgeschwindigkeit 5 mV/s, Schrittpotential 50 mV.

Es können ebenfalls drei Oxidationspeaks identifiziert werden, von denen Peak I und Peak III wiederum quasi-reversibel sind. Peak II resultiert auch hier aus dem bei der ersten Oxidation gebildeten Oxidationsprodukt ( $3',4'$ -Dihydroxybenzoësäure-Derivat). Die bisher beschriebene Verschiebung zu negativeren Potentialen (ca.  $-40$  mV/pH) wird ebenfalls für den sauren pH-Bereich beobachtet. Wird der pH-Wert auf über 7 erhöht, reduziert sich diese Verschiebung, für die Oxidationssignale II und III findet sogar eine Verschiebung zu positiveren Potentialen statt. Ab pH 11 ist eine Besonderheit zu beobachten. Es tritt im Vergleich zum Cyclovoltammogramm an einer SPCE (vgl. Abbildung 34, Kapitel 7.1.) ein zusätzlicher Peak IV bei einem Potential von  $0,3$  V auf. Peak III ist aufgrund der beginnenden Pufferzersetzung nicht mehr zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich

mit den Beschreibungen von Sokolová et al. [146], deren Arbeit sich mit der pH-Abhängigkeit während der Oxidation von Quercetin auf einer Glas-Kohlenstoff-Elektrode beschäftigt. Demnach resultiert dieses zusätzliche Signal IV aus der Radikal-Dimerisierung der elektrochemisch aktiven Form.

Im elektrochemischen Fließzell-Experiment wurde die Edukt- sowie Produktzusammensetzung unter alkalischen Bedingungen (pH 9,25) ermittelt (Abbildung 42). Rutin ( $[\text{Rutin}+\text{H}]^+$ , m/z 611) wurde selbst nicht detektiert, dafür dessen Aglykon Quercetin ( $[\text{Quercetin}+\text{H}]^+$ , m/z 303). Es ist davon auszugehen, dass der Zuckerrest Rutinose abgespalten wurde.

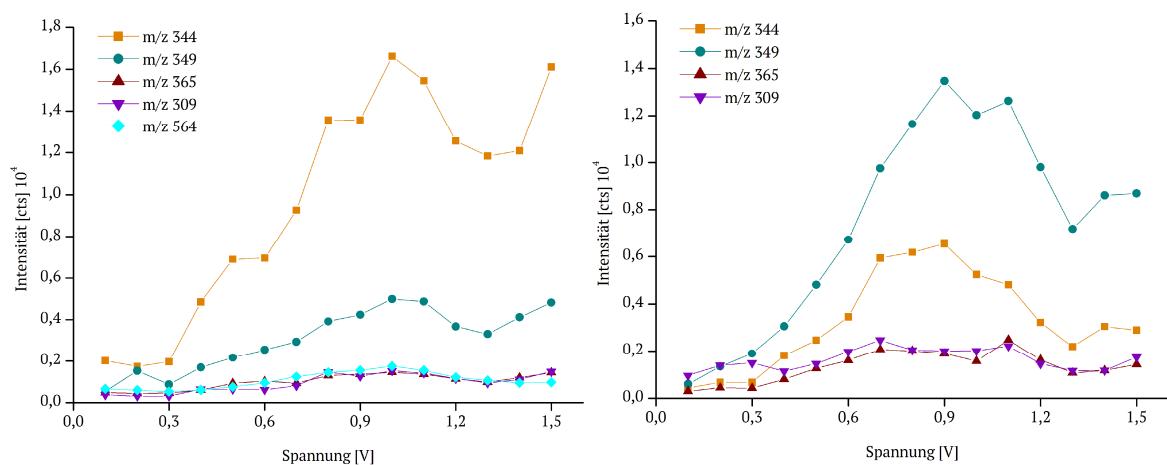


Abb. 42. Vergleich der Intensitätsverläufe der Oxidationsprodukte von Rutin nach Fließzell-Experimenten auf SPCE (links) und SPE-CNF (rechts). Die Detektion erfolgte jeweils im ESI-positiven Modus.

Es konnten vier Produkte identifiziert werden: m/z 309, m/z 344, m/z 349 und m/z 365. Das Produkt mit der höchsten Intensität stellt m/z 349 dar. Die höchste Intensität wird bei einer angelegten Spannung von 0,9 V auf der SPE-CNF erreicht. Ähnlich verhält es sich mit dem Signal von m/z 344, das seine maximale Intensität ebenso bei 0,9 V aufweist. Das Produkt mit m/z 365 erzielt die höchste Intensität bei 1,1 V, während das Signal mit m/z 309 sein Maximum bei 0,7 V erreicht. Die Vermutung, dass ein weiteres Oxidationsprodukt unter stark alkalischen Bedingungen aufgrund des vierten Peaks im Cyclovoltammogramm (Abbildung 41) bei Oxidation auf der SPE-CNF gebildet wird, kann im Rahmen dieses Fließzell-Experiments nicht bestätigt werden. Grund dafür kann zudem sein, dass es sich dabei um ein Produkt handelt, das nicht mittels ESI-MS detektiert werden kann.

Der Vergleich der elektrochemischen Fließzell-Experimente beider Elektrodenmaterialien zeigt folgende Unterschiede: (i) im Experiment mit der SPCE wird ein zusätzliches Oxidationsprodukt (m/z 564) detektiert, (ii) das Produkt mit der höchsten Intensität ist m/z 344 bei Oxidation auf der SPCE, während auf der SPE-CNF das Signal mit m/z 349 die maximale Intensität aufweist, und (iii) die

durch Oxidation auf der SPCE erzeugten Produkte erzielen ihre jeweilige maximale Intensität bei einer Spannung von 1,0 V, während mittels SPE-CNF erzeugte Produkte diesbezüglich variieren.

In den beiden Elektropherogrammen (Abbildung 43) wird die Situation ohne Oxidation (links) und mit Oxidation bei 0,8 V (rechts) an einer SPE-CNF dargestellt. Zum einen wird die Reduktion der Signalintensität des Quercetins deutlich gezeigt. Der Ausgangsstoff [Quercetin+H]<sup>+</sup> migriert nach dem EOF-Marker Coffein und ist somit unter den gegebenen alkalischen Pufferbedingungen negativ geladen. Wird eine Spannung von 0,8 V für eine Dauer von 60 s während des EAI-Prozesses angelegt, so werden vier Oxidationsprodukte detektiert. Alle Produkte migrieren zeitgleich mit Coffein und sind somit neutral geladen.

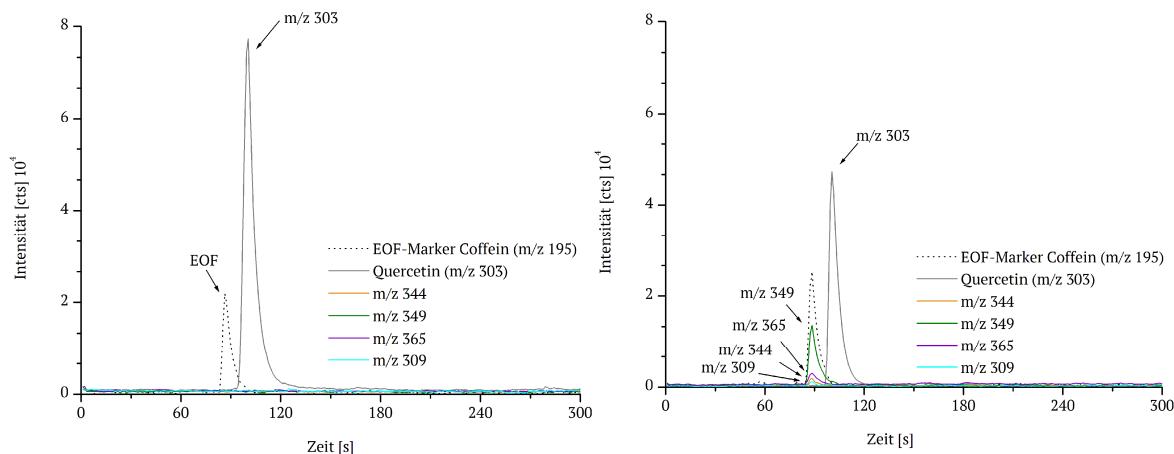


Abb. 43. Elektropherogramme der Rutin-Oxidation auf einer SPE-CNF, positiver ESI-Modus: Ohne Oxidation (links), mit Oxidation bei 0,8 V für 60 s (rechts). Trennspannung 15 kV, *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 40 cm).

Betrachtet man das oxidative Verhalten Rutins über den gesamten Spannungsbereich von 0 bis 1,5 V, so fällt mit beginnender Oxidation die Intensität des Quercetin-Signals deutlich ab. Ihr Minimum erreicht sie bereits bei einer Spannung von 0,3 V. Mit steigender Spannung steigt jedoch auch die Intensität des Signals wieder an und erreicht unter EAI-Bedingungen ein Maximum bei 1,2 V. Anschließend ist ein signifikanter Abfall zu verzeichnen. Für einen genaueren Blick auf das Verhalten der Oxidationsprodukte zeigt Abbildung 44 deren potentialabhängige Intensitätsverläufe. Wie schon im Fließzell-Experiment (Abbildung 42) gezeigt, stellt das Signal mit m/z 349 das Oxidationsprodukt mit der höchsten Intensität dar. Damit liegt ein deutlicher Unterschied zwischen der Oxidation auf einer SPCE und einer SPE-CNF vor. Mittels EAI-CE-MS-Experiment wird jedoch gezeigt, dass das Produkt mit m/z 365 die zweithöchste Intensität aufweist. Im Fließzell-Experiment besetzte diese Position das Produkt mit m/z 344. Ebenso gibt es Differenzen zwischen den erzielten jeweiligen Intensitätsmaxima. Das Produkt mit m/z 349 erreicht sein Maximum bei einer Spannung von 0,8 V

(Fließzelle: 0,9 V), das Produkt mit m/z 344 bei einer Spannung von 1,2 V (Fließzelle: 0,9 V) sowie das Signal mit m/z 365 bei 0,9 V (Fließzelle: 1,1 V) und m/z 309 bei 0,8 V (Fließzelle: 0,7 V).

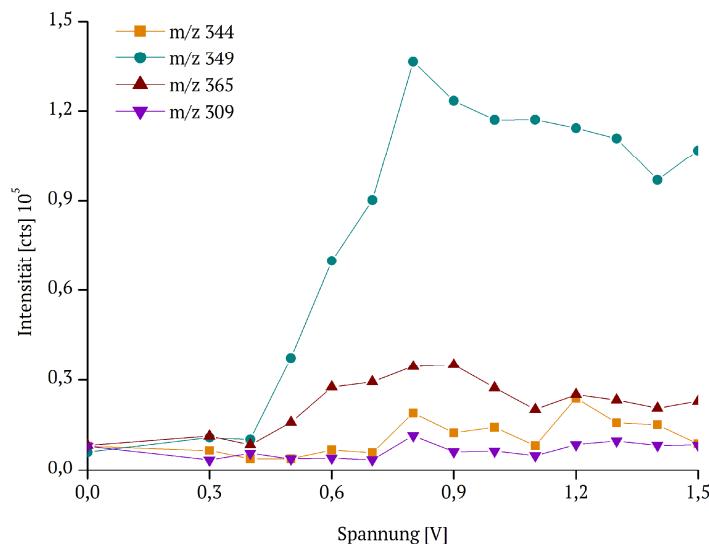


Abb. 44. Positiver ESI-Modus. Intensitätsverlauf der Oxidationsprodukte von Rutin nach EAI-CE-MS auf SPE-CNF. Trennspannung 15 kV, *Fused Silica*-Kapillare (ID 50  $\mu$ m, 40 cm).

Es zeigt sich somit deutlich, welchen großen Vorteil eine Trennung der Analyten vor der Detektion mittels ESI-Tof-MS besitzt: Eine Ionensuppression wird je nach Grad der kapillarelektrophoretischen Trennung verhindert bzw. minimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Fließzell-Experimente eine gute Grundlage bilden, um unbekannte Verbindungen zu bestimmen. Ein reales Verhältnis von Intensitäten kann jedoch nur mit EAI-CE-MS abgebildet werden. Grund dafür sind verschiedene Faktoren, die die elektrochemischen Prozesse in der Fließzelle beeinflussen. So ist der Stofftransport zur Elektrodenoberfläche durch Diffusion aufgrund des kontinuierlichen Zustroms nichtoxidiertes Rutin-Lösung nicht vergleichbar zur elektrochemisch assistierten Injektion. Eine negative Beeinflussung, wie Ionensuppression im Elektrospray, kann mit einer vorweggeschalteten Trennmethode wie der Kapillarelektrophorese vermieden oder reduziert werden.

## 7.5. Identifizierung der Oxidationsprodukte: Ein Vergleich mit anderen Methoden

Betrachtet man bisher publizierte Produkte der Rutin-Oxidation mit den hier dargestellten Ergebnissen, so fällt auf, dass Oxidationsprodukte von Rutin, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, weder mit der elektrochemischen Durchflusszelle noch mittels EAI-CE-MS reproduziert werden konnten. Dafür wurden neue, bisher nicht veröffentlichte Produkte gefunden. Eine Übersicht der in der Literatur veröffentlichten Oxidationsprodukte wird in Abbildung 45 dargestellt.

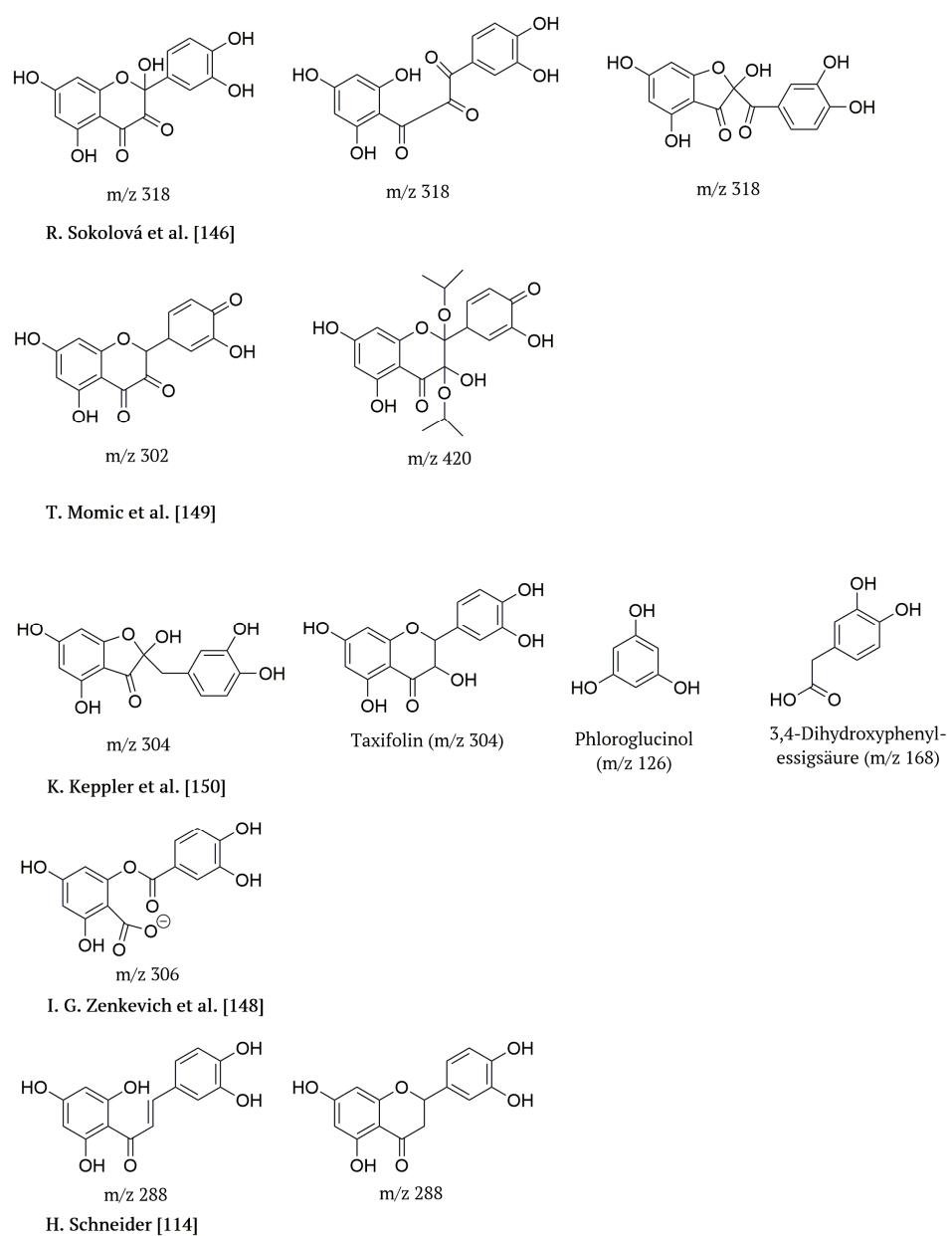


Abb. 45. Auswahl publizierter Oxidationsprodukte von Quercetin und Rutin.

Die konkrete Benennung von Oxidationsprodukten und deren strukturelle Zuordnung wird trotz der Vielzahl an Publikationen zur Thematik der Rutin-Oxidation nur in wenigen Fällen vorgenommen. So führten Sokolová et al. [146] die Oxidation von Quercetin elektrochemisch durch. Die Studie versucht die in der Literatur geführte Kontroverse über die Anzahl der an der Oxidation von Quercetin beteiligten Elektronen zu klären. Sie berichten über eine Instabilität der primär gebildeten Oxidationsprodukte, was eine Detektion erschwert. Daher wurde die Elektrolyse von Quercetin auch *ex situ* unter Luftausschluss durchgeführt. Anschließend erfolgte die Detektion der Produkte über LC-UV/Vis und LC-MS für höhermolekulare Verbindungen, während für niedermolekulare Verbindungen, wie 3,4-Dihydroxyphenylsäure, GC-MS und UV/Vis-Spektroskopie genutzt wurden. Sie identifizierten nur ein Zwischenprodukt ( $m/z$  318) in sehr geringen Spuren mittels LC-MS, konnten jedoch keine konkrete Strukturzuordnung treffen.

Die Empfindlichkeit Quercetins gegenüber Luftsauerstoff nutzten Zenkevich et al. [148], indem sie die Oxidation lediglich durch die Zuführung von Sauerstoff zu einer alkalischen Quercetin-Lösung ( $pH$  8 ~ 10) ausführten. Dabei differenzierten sie zwischen einem wässrigem Medium und einer Wasser-Ethanol-Mischung. Als Produkte wurden Phloroglucinol als auch 3,4-Dihydroxyphenylsäure mittels LC-UV/Vis und GC-MS bestimmt. Nachteilig ist dabei jedoch, dass keine kontrollierte Oxidation erfolgte, wie sie vergleichsweise bei elektrochemischer Oxidation auftritt. Zudem wurde der Einfluss von Luftsauerstoff in den im Rahmen dieser Dissertation erfolgten Oxidationsstudien von Rutin und Quercetin nicht registriert. Unter den Bedingungen des EAI-CE-MS-Experiments wurden ohne Oxidation nur die Ausgangsstoffe Rutin und Quercetin detektiert.

Eine weitere Möglichkeit der Oxidation von Quercetin kann enzymatisch durch Zugabe von Myeloperoxidase erfolgen [149]. Die typische Detektionsart ist wiederum UV/Vis (DAD, Diodenarray-Detektor) aufgrund der guten UV-Eigenschaften der Flavon-Struktur mit  $\pi$ -Elektronenkonfiguration des aromatischen Systems der verschiedenen Produkte. Es wurde in der Studie jedoch lediglich ein polareres Molekül als Quercetin selbst detektiert, eine genaue Strukturaufklärung wurde nicht berichtet.

Mehrere Studien [114, 150] berichten über verschiedene *in vitro*-Modelle, wobei Bakterienstämme aus dem Darm genutzt wurden, um den Verdau von Rutin und dessen Aglykon Quercetin zu simulieren. Auch hier bildeten LC-UV/Vis und GC-FID (Flammenionisationsdetektor) bzw. GC-MS die bevorzugten Analysenmethoden. Beide Studien vermuteten Taxifolin als Zwischenprodukt, wobei

sich jedoch der jeweilige Abbauweg zu Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure unterschied.

Tabelle 10 zeigt eine Zusammenfassung der mittels EAI-CE-MS detektierten Produkte. Eine Strukturzuordnung zu den identifizierten Masse-zu-Ladungsverhältnissen konnte nicht realisiert werden. Für die Oxidationsprodukte mit den höchsten Intensitäten, m/z 344 sowie m/z 349, wurden zwei mögliche Strukturformeln erstellt, wobei es sich jeweils um ein Rutinose-Addukt handelt. Das Ammoniumaddukt von Rutinose weist im vorliegenden Massenspektrum ein m/z von 344,1430 auf, das Natriumaddukt ein m/z von 349,0977. Ihre jeweilige Differenz zu den theoretisch berechneten m/z ist mit ca. -36 ppm relativ hoch, liegt aber im Vergleich zum Quercetin ( $\Delta m$  -39,9 ppm) im selben Bereich der Massenabweichung. Eine Rutinose-Abspaltung hätte jedoch zur Folge, dass neben Rutinose (jeweils als Addukt) ebenso Quercetin bereits vor der Injektion während der elektrochemischen Oxidation gebildet wird. Quercetin ist im Alkalischen negativ geladen und würde sich somit in seinem Migrationsverhalten von Rutin unterscheiden. Es konnte jedoch kein zusätzliches Signal von Quercetin detektiert werden. Rutin und Quercetin migrieren zusammen nach dem EOF, was bedeutet, dass eine Abspaltung nur auf den Elektrospray-Prozess zurückzuführen ist. Trotz der berechneten Übereinstimmung wird es sich bei den beiden intensitätsstärksten Produkten höchstwahrscheinlich nicht um Rutinose-Addukte handeln, da deren Bildung direkt an eine Abweichung der Migrationszeit Quercetins von Rutin gekoppelt wäre.

Tab. 10. Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen und der daraus resultierenden Oxidationsprodukte.

	SPCE (positiv)	SPCE (negativ)	SPE-CNF (positiv)	
<i>Sheath Liquid;</i> -Geschwindigkeit	IP/H <sub>2</sub> O (v/v%) = 50/50 + 0,2% FA; 240 µl/min	MeOH/H <sub>2</sub> O (v/v%) = 80/20 + 0,1% NH <sub>3</sub> ; 240 µl/min	IP/H <sub>2</sub> O (v/v%) = 50/50 + 0,2% FA; 240 µl/min	
EOF-Marker	Coffein (m/z 195)	Glucose (m/z 179)	Coffein (m/z 195)	
Trennspannung; -strom	15 kV; 73 µA	15 kV; 61 µA	15 kV; 59 µA	
Kapillare ( <i>Fused Silica</i> )	ID 50 µm, 40 cm	ID 50 µm, 40 cm	ID 50 µm, 40 cm	
	m/z 344	1,0 V	m/z 349	0,8 V
Oxidationsprodukte (geordnet nach sinkender Intensität) mit Spannungen bei dem jeweiligen Intensitätsmaximum	m/z 349	1,1 V	m/z 365	0,9 V
	m/z 365	1,1 V	m/z 344	1,2 V
	m/z 309	1,1 V	m/z 309	0,8 V
	m/z 564	0,4 V		

Es wird verdeutlicht, wie sehr die Produktzusammensetzung von den verschiedenen Parametern, wie beispielsweise pH-Wert, Elektrolytzusatz, aerobe oder anaerobe Bedingungen und Art der Oxidation abhängt. Vorteile des EAI-CE-MS-Experiments sind die definierten Bedingungen während der Oxidation, die für eine genaue Aufklärung des Mechanismus wichtig sind. Als Fazit lässt sich somit feststellen, dass Rutin, und aufgrund der Zuckerabspaltung während des ESI-Prozesses auch Quercetin, und deren Oxidationsprodukte zwar nur mäßig gut im Electrospray ionisierbar sind, dennoch wurden bisher unveröffentlichte Oxidationsprodukte mit der Methodik EAI-CE-MS identifiziert, auch wenn eine direkte Strukturzuordnung nicht erfolgen konnte. Eine detailliertere Strukturaufklärung könnte in zukünftigen Studien durch die Implementierung eines MS/MS-Experiments vorangebracht werden und neue gewonnene Erkenntnisse in die Metabolismus-Aufklärung eingebracht werden.

## 7.6. Zusammenfassung

Flavonoide stellen aufgrund ihrer Redoxeigenschaften ein interessantes Forschungsfeld dar. Rutin mit seinem Aglykon Quercetin besitzt neben seinen biochemischen und pharmazeutischen Eigenschaften als Antioxidans grundlegende Eigenschaften, die es für eine Kopplung von Elektrochemie und Kapillarelektrophorese zur Aufklärung von oxidativen Mechanismen sehr geeignet erscheinen lassen. Je nach pH-Wert können verschiedene Ladungszustände ausgebildet werden. Ebenso besitzt Rutin besondere Redoxeigenschaften.

Das oxidative Verhalten wurde sowohl mit klassischen Methoden wie der Cyclovoltammetrie als auch mit dem neuen Konzept EAI-CE-MS untersucht. Cyclovoltammetrische Messungen bestätigten die pH-Abhängigkeit der Oxidation des Rutins. Zudem konnte mit dem Einsatz einer modifizierten Kohlenstoffelektrode (SPE-CNF) gegenüber der normalen Kohlenstoffsiebdruckelektrode (SPCE) ein viertes Signal unter stark alkalischen Pufferbedingungen generiert werden.

Sowohl Untersuchungen mit der elektrochemischen Durchflusszelle als auch mit dem EAI-CE-MS-Experiment wurden im positiven als auch im negativen ESI-Modus durchgeführt. Es konnten verschiedene Oxidationsprodukte detektiert werden. Eine Strukturaufklärung konnte jedoch nicht realisiert werden. Der Vergleich mit anderen publizierten Methoden der Untersuchung der Rutin-Oxidation zeigte, dass die Detektion von Oxidationsprodukten mittels ESI-MS aufgrund der mäßig guten Ionisierbarkeit bisher keine herausragende Rolle spielte. Mit dem Konzept EAI-CE-MS wurde erstmalig eine Untersuchung des oxidativen Verhaltens von Rutin mit der Kopplung von einfacher Elektrochemie, (kapillarelektrophoretischer) Trennung und ESI-MS-Detektion unternommen.

Es konnten bisher nicht veröffentlichte Produkte nachgewiesen werden, deren Bildung sowohl vom verwendeten Elektrodenmaterial als auch von der Oxidationsspannung abhängt. Die Vielzahl an Möglichkeiten für Oxidationsstudien von Rutin wird mit dem Konzept EAI-CE-MS vergrößert und bietet neue Chancen der Untersuchung oxidativer Prozesse von Naturstoffen.

## 8. Kapitel

### Zusammenfassung der Forschungsschwerpunkte

Die wissenschaftliche Nachfrage nach einem möglichst hohen Informationsgehalt, in dem sich die vielfältigen analytischen Methoden stark unterscheiden können, kann mit der Kopplung verschiedener Techniken in einem einzigen Experiment bedient werden. Die hervorragende Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese gepaart mit leistungsstarker massenspektrometrischer Detektion bietet eine sehr gute Grundlage, elektrochemische Modifikationen des Analyten oder des Analytgemisches während der Injektion in das Kapillarfließsystem zu vereinen. Mit dem Konzept EAI-CE-MS wurde eine neue Methodik für Redoxstudien eingeführt.

Erste Versuche anhand eines Modellsystems aus vier Ferrocenverbindungen zeigten das große Potential von EAI-CE-MS. Zum einen konnten durch die elektrochemische Umwandlung aus neutralen Analyten ionische Spezies generiert werden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten eine CE-Trennung ermöglichten. Zum anderen waren mechanistische Studien elektrochemischer Reaktionen möglich, wobei die Kapillarelektrophorese als sehr schnelle und effiziente Trenntechnik genutzt werden konnte, um das gebildete Produktgemisch zu untersuchen. Im Kontext von CE-MS-Messungen war weiterhin interessant, dass im Fall der elektrochemischen Konvertierung von Neutralanalyten zu geladenen Produkten das Nachweisvermögen der ESI-MS-Detektion verbessert werden konnte. Gerade hydrophobe Analyten, die im ESI-Prozess eine zu geringe Ionisierungseffizienz zeigten, konnten nach einer elektrochemischen Umwandlung zu Produkten führen, die sich nachweisstark massenspektrometrisch detektieren ließen. Die Untersuchung der Ferrocenverbindungen wurde mit NACE in rein organischem Lösungsmittel durchgeführt. Allgemein bietet EAI-CE-MS jedoch ebenso die Möglichkeit, mit Mischungen aus organischen und wässrigen Lösungsmitteln oder auch nur im rein Wässrigen zu arbeiten, wobei gerade letzteres mit Blick auf bioanalytische Studien von großem Vorteil ist.

In weiteren Untersuchungen wurde oxidativer Stress am Beispiel des Nukleosids Guanosin simuliert. Erstmalig wurde eine bionanalytische Anwendung für das Konzept EAI-CE-MS verwirklicht. Neben vorbereitenden Experimenten mit der Cyclovoltammetrie und einfachen EC-MS-Experimenten wurden die EAI-CE-MS-Messungen mit einer automatischen EAI-Zelle durchgeführt. Gegenüber des ursprünglichen Aufbaus der EAI-Zelle konnte mit bedeutend geringeren Probenvolumina gearbeitet werden. Ebenso konnte das Elektrodenmaterial schnell und unkompliziert gewechselt werden. Beide Eigenschaften der automatischen EAI-Zelle begünstigen die Erweiterung der Anwendbarkeit auf biologische Proben. Sowohl die elektrochemische Konvertierung als auch die CE-Trennung erfolgten ausschließlich in wässrigen Puffern. Damit kann die Simulation oxidativen Stresses nahe an den physiologischen Bedingungen untersucht werden. Die Generierung von Oxidationsprodukten sowie deren massenspektrometrische Detektion konnten erfolgreich realisiert werden. Das elektromigrative Verhalten der Produkte bei unterschiedlichen pH-Werten diente als wertvolles Kriterium, um eine Strukturzuordnung von möglichen Verbindungen mit identischer Summenformel vorzunehmen. Die Untersuchung des oxidativen Verhaltens von 8-Oxoguanosin bestätigte qualitativ die Ergebnisse der Guanosin-Oxidation. Zudem konnte bestätigt werden, dass 8-Oxoguanosin eine entscheidende Rolle als primäres Oxidationsprodukt im Mechanismus der Guanosin-Oxidation spielt.

Eine weitere bioanalytische Anwendung des EAI-CE-MS-Konzepts wurde mit Rutin, einem Antioxidans, durchgeführt. Verschiedene Eigenschaften, wie mehrere Ladungszustände abhängig vom pH-Wert der Umgebung oder relativ niedrige Redoxpotentiale stellen ein gutes Fundament für weiterführende Studien zum Oxidationsverhalten mittels EAI-CE-MS dar. Obwohl die detektierten Oxidationsprodukte ungeladen auftraten, konnte eine Trennung von den negativ geladenen Edukten Rutin und Quercetin realisiert werden. Sechs Produkte wurden massenspektrometrisch identifiziert, auch wenn eine Strukturaufklärung nicht möglich war. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Elektrodenmaterial eine unterschiedliche Produktzusammensetzung auftrat.

Die Wahl der Reaktionsbedingungen, wie Elektrodenmaterial und Elektrolytzusammensetzung, unter denen Oxidationsstudien durchgeführt werden, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Art der Produkte und deren Zusammensetzung. Ebenso spielen ESI-Parameter und Trennbedingungen eine entscheidende Rolle. Um umfangreiche Oxidationsstudien in der Bioanalytik durchzuführen, die in ihren experimentellen Bedingungen nahe an den physiologischen Begebenheiten liegen, wird mit der methodischen Entwicklung des EAI-CE-MS-Konzeptes eine neue und elegante Möglichkeit gegeben.

## 9. Appendix

Im Nachfolgenden sind alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Quellen angegeben. Ebenso wird ein Abkürzungsverzeichnis zum besseren Verständnis wiedergegeben.

Weiterhin sind mein Lebenslauf und eine Publikationsübersicht dargelegt.

## 9.1. Quellenverzeichnis

- [1] "The Nobel Prize in Chemistry 1959". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web. 14. Mai 2014.
- [2] J. Wang: Analytical Electrochemistry. 3. Aufl. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.
- [3] D. C. Harris: Quantitative Chemical Analysis. 8. Aufl. New York: W. H. Freeman & Company, 2011.
- [4] A. J. Bard, G. Inzelt, F. Scholz: Electrochemically Dictionary. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2008.
- [5] M. Otto: Analytische Chemie. 4. überarb. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2011.
- [6] J. Heinze, Angew. Chem. 96 (1984) 823.
- [7] E. Riedel, C. Janiak: Anorganische Chemie. 8. Aufl. Berlin/ New York: Walter de Gruyter und Co. KG, 2011.
- [8] F.-M. Matysik, Electrochem. Commun. 5 (2003) 1021.
- [9] R. Scholz, F.-M. Matysik, Analyst 136 (2011) 1562.
- [10] P. Palatzky, F.-M. Matysik, Electrophoresis 33 (2012) 2689.
- [11] P. Palatzky, A. Zöpfl, T. Hirsch, F.-M. Matysik, Electroanalysis 25 (2013) 117.
- [12] J. C. Giddings: Unified Separation Science. Weinheim: Wiley, 1991.
- [13] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, Angew. Chem. 105 (1993) 659.
- [14] P. Jandik, G. Bonn: Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions. New York: Wiley, 1993.
- [15] H. Shintani, J. Polonský: Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. London: Blackie Academic and Professional, 1997.
- [16] K. L. Rundlett, D. W. Armstrong, Anal. Chem. 68 (1996) 3493.
- [17] S. M. Masselter, A. J. Zemann, Anal. Chem. 67 (1995) 1047.
- [18] Y. Waldbroehl, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 315 (1984) 135.
- [19] F.-M. Matysik, J. Chromatogr. A 802 (1998) 349.
- [20] M.-L. Riekola, Electrophoresis 23 (2002) 3865.
- [21] S. P. Porras, M. Jussila, K. Sinervo, M.-L. Riekola, Electrophoresis 20 (1999) 2510.
- [22] F. Steiner, M. Hassel, Electrophoresis 21 (2000) 3994.
- [23] F. Steiner, M. Hassel, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 131.
- [24] H. Kienitz: Massenspektrometrie. Weinheim, Verlag Chemie, 1968.
- [25] O.D. Sparkman: Mass Spec Desk Reference. 2. Aufl. Pittsburgh, 2006.

- [26] K. D. Kilburn et al., *Anal. Chem.* 51 (1979) 1420.
- [27] J. H. Gross: *Massenspektrometrie – Ein Lehrbuch*. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, 2013.
- [28] E. de Hoffmann, V. Stroobant: *Mass Spectrometry – Principles and Applications*. 3. Aufl. Chichester, Wiley, 2009.
- [29] R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek, M. Busman, H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.* 10 (1991) 359.
- [30] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* 9 (1990) 37.
- [31] J. Zeleny, *Phys. Rev.* 3 (1914) 69.
- [32] G. Taylor, *Proc. R. Soc. Lond. A* 280 (1964) 383.
- [33] J. F. de la Mora et al., *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 939.
- [34] A. T. Blades, M. G. Ikonomou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2109.
- [35] G. J. Van Berkel, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 603.
- [36] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64.
- [37] V. E. Vandell, P. A. Limbach, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 212.
- [38] D. F. Schoener, M. A. Olsen, P. G. Cummings, C. Basic, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 1069.
- [39] T. Karancsi et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 81.
- [40] F. Charbonnier, L. Berthelot, C. Rolando, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1585.
- [41] J. O. Metzger, J. Griep-Raming, *Eur. Mass Spectrom.* 5 (1999) 157.
- [42] C. D. Smith, J. P. Bartley, S. E. Bottle, A. S. Micallef, D. A. Reid, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 607.
- [43] R. J. Cotter, *Anal. Chem. News Features* (1999) 445 A.
- [44] D. L. Buhrman, P. I. Price, P. J. Rudewicz, *Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 1099.
- [45] H. Mei et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 97.
- [46] R. Bonfiglio, R. C. King, T. V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.
- [47] T. M. Annesley, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041.
- [48] L. L. Jessome, D. A. Volmer, *LCGC North America* 24 (2006) 498.
- [49] B. L. Ackermann, M. J. Berna, A. T. Murphy, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 53.
- [50] P. R. Tiller, L. A. Romanyshyn, U. D. Neue, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 788.
- [51] W. A. Korfsmacher, *Drug Dis. Tod.* 10 (2005) 1357.
- [52] M. Constanzer, C. Chavez, B. Matuszewski, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 117.
- [53] S. J. Gardiner, E. J. Begg, *Pharmacogenet. Genom.* 15 (2005) 365.
- [54] Z. J. Lin, W. Li, G. Dai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 330.

- [55] M. Vogeser, U. Spöhrer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 44 (2006) 1126.
- [56] S. Kirsch, J. Widart, J. Louette, J.-F. Focant, E. De Pauw, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 300.
- [57] L. Anderson, C. L. Hunter, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 573.
- [58] H. H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1315.
- [59] M. Vogeser, C. Seger, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 649.
- [60] A. Scalbert et al., *Metabolomics* 5 (2009) 435.
- [61] T. Soga et al., *J. Proteom. Res.* 2 (2003) 488.
- [62] J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1232.
- [63] M. Moini, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 466.
- [64] W. F. Smyth, *Electrophoresis* 26 (2005) 1334.
- [65] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3837.
- [66] R. Scholz, P. Palatzky, F.-M. Matysik, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 687.
- [67] C. W. Klampfl, *Electrophoresis* 30 (2009) S83.
- [68] M. Frommberger, M. Englmann, P. Schmitt-Kopplin: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 384: *Capillary Electrophoresis*, hrsg. P. Schmitt-Kopplin, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [69] C. G. Huber, A. Premstaller, G. Kleindienst, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 175.
- [70] S. Bruckenstein, R. R. Gadde, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 793.
- [71] A. T. Blades, M. G. Ikonomou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2109.
- [72] H. Chang, D. C. Johnson, R. S. Houk, *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 328.
- [73] F. Zhou, G. J. Van Berk, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3643.
- [74] U. Jurva, H. Wikström, L. Weidolf, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 800.
- [75] B. Seiwert, H. Henneken, U. Karst, *J. A. Soc. Mass. Spectrom.* 15 (2004) 1727.
- [76] U. Jurva, H. V. Wikström, A. P. Bruins, *Rap. Commun. Mass. Spectrom.* 16 (2002) 1934.
- [77] W. Lohmann, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1341.
- [78] B. Seiwert, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 181.
- [79] M. Cindric, M. Vojs, F.-M. Matysik, *Electroanalysis* 27 (2015) 234.
- [80] I. Noviandri et al., *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6713.
- [81] J. K. Bashkin, P. J. Kinlen, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 4507.
- [82] B. Neumann et al., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 4705.
- [83] B. Halliwell: *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. Encyclopedia of Life Sciences*, 2005.
- [84] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1.
- [85] E. Cadenas, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 79.

- [86] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 37.
- [87] K. B. Beckman, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19633.
- [88] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, *Free Rad. Biol. Med.* 32 (2002) 1102.
- [89] S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutat. Res.* 488 (2001) 65.
- [90] M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, *J. Lunec, FASEB J.* 17 (2003) 1195.
- [91] M. K. Hailer, P. G. Slade, B. D. Martin, T. A. Rosenquist, K. D. Sugden, *DNA Repair* 4 (2005) 41.
- [92] J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Nitric Oxide* 14 (2006) 109.
- [93] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams: *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.
- [94] H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free Rad. Biol. Med.* 11 (1991) 81.
- [95] L. J. Marnett, *Mutat. Res.* 424 (1999) 83.
- [96] E. R. Stadtman, *Ann. New York Acad. Sci.* 928 (2001) 22.
- [97] R. L. Levine, E. R. Stadtman, *Exp. Gerontol.* 36 (2001) 1495.
- [98] R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996) 15036.
- [99] J. M. Matés, C. Pérez-Gómez, I. Núñez de Castro, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595.
- [100] M. R. McCall, B. Frei, *Free Rad. Biol. Med.* 26 (1999) 1034.
- [101] H. Sies, W. Stahl, A. Sevanian, *J. Nutr.* 135 (2005) 969.
- [102] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganda, *Free Rad. Biol. Med.* 20 (1996) 933.
- [103] H. Schroeter et al., *Neurobiol. Aging* 23 (2002) 861.
- [104] D. F. Birt, S. Hendrich, W. Wang, *Pharmacol. Ther.* 90 (2001) 157.
- [105] P. M. Kris-Etherton et al., *Am. J. Med.* 113 (2002) 71S.
- [106] E. A. Ostrakhovitch, I. B. Afanas'ev, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 743.
- [107] E. Middleton, C. Kandaswami, *Biochem. Pharmacol.* 43 (1992) 1167.
- [108] R. J. Williams, J. P. E. Spencer, C. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.* 36 (2004) 838.
- [109] J. V. Formica, W. Regelson, *Fd. Chem. Toxic.* 33 (1995) 1061.
- [110] A. J. Day et al., *FEBS Lett.* 436 (1998) 71.
- [111] K. Ioku et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 1428.
- [112] A. Serra et al., *Food Chem.* 130 (2012) 383.
- [113] I. B. Jaganath, W. Mullen, M. E. J. Lean, C. A. Edwards, A. Crozier, *Free Rad. Biol. Med.* 47 (2009) 1180.
- [114] H. Schneider, A. Schwierz, M. D. Collins, M. Blaut, *Arch. Microbiol.* 171 (1999) 81.
- [115] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4846.

- [116] M.-E. Ghica, A. M. Oliveira Brett, *Electroanalysis* 17 (2005) 313.
- [117] S. El Deeb, M. Abu Iriban, R. Gust, *Electrophoresis* 32 (2011) 166.
- [118] G. Van Biesen, C. S. Bottaro, *Electrophoresis* 27 (2006) 4456.
- [119] G. W. Somsen, R. Mol, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 953.
- [120] R. Erb, S. Plattner, F. Pitterl, H.-J. Brouwer, H. Oberacher, *Electrophoresis* 33 (2012) 614.
- [121] U. Siemeling, B. Neumann, H.-G. Stammmer, A. Salmon, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 628 (2002) 2315.
- [122] Y. Tadesse, A. Tadesse, R. C. Saini, R. Pal, *Int. J. Electrochem.* (2013) Article ID 849327.
- [123] L. A. Larew D. C. Johnson, *J. Electroanal. Chem.* 262 (1989) 167.
- [124] A. M. Bond, P. A. Lay, *J. Electroanal. Chem.* 199 (1986) 285.
- [125] C. Amatore, C. Pebay, L. Thouin, A. Wang, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 1269.
- [126] X. Xu, S. P. Nolan, R. B. Cole, *Anal. Chem.* 66 (1994) 119.
- [127] J. Fees, M. Ketterle, A. Klein, J. Fiedler, W. Kaim, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1999) 2595.
- [128] A. M. Oliveira Brett, J. A. P. Piedade, S. H. P. Serrano, *Electroanalysis* 12 (2000) 969.
- [129] A. M. Oliveira-Brett, V. Diculescu, J. A. P. Piedade, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 61.
- [130] R. N. Goyal, S. M. Sondhi, A. M. Latoti, *New J. Chem.* 29 (2005) 587.
- [131] V. Verdolino, R. Cammi, B. H. Munk, H. B. Schlegel, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 16860.
- [132] A. M. Fleming, J. G. Muller, A. C. Dlouhy, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15091.
- [133] Y. Ye, J. G. Muller, W. Luo, C. L. Mayne, A. J. Shallop, R. A. Jones, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13926.
- [134] J. E. B. McCallum, C. Y. Kuniyoshi, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16777.
- [135] C. Sheu, P. Kang, S. Khan, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3905.
- [136] P. Kang, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4865.
- [137] H. Murakami, Y. Esaka, T. Nakayama, B. Uno, *Chem. Lett.* 40 (2011) 268.
- [138] W. L. Neeley, J. M. Essigmann, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 491.
- [139] K. J. Volk, R. A. Yost, A. Brajter-Toth, *Anal. Chem.* 64 (1992) 21A.
- [140] A. Baumann, W. Lohmann, S. Jahn, U. Karst, *Electroanalysis* 22 (2010) 286.
- [141] F. Boussicault, M. Robert, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2622.
- [142] N. A. Mautjana, D. W. Looi, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electrochim. Acta* 55 (2009) 52.
- [143] M. A. Keniry, *Biopolymers* 56 (2001) 123 .
- [144] F. Pitterl, J.-P. Chervet, H. Oberacher, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1203.
- [145] C. Aparecida Pedriali, A. Uchoa Fernandes, L. de Cássia Bernusso, B. Polakiewicz, *Quim. Nova* 31 (2008) 2147.
- [146] R. Sokolová et al., *Chem. Commun.* 48 (2012) 3433.

- [147] J. E. Koehne et al., *Analyst* 136 (2011) 1802.
- [148] I. G. Zenkevich et al. *Molecules*, 12 (2007) 654.
- [149] T. Momić, J. Savić, V. Vasić, *Res. Lett. Phys. Chem.* (2009) Article ID 614362.
- [150] K. Keppler, E.-M. Hein, H.-U. Humpf, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 686.
- [151] L. V. Jørgensen, C. Cornett, U. Justesen, L. H. Skibsted, L. O. Dragsted, *Free Rad. Res.* 29 (1998) 339.

## 9.2. Abkürzungsverzeichnis

5-OH-8-oxo-Gs	5-Hydroxy-8-oxoguanosin
8-Oxo-Gs	8-Oxoguanosin
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
APCI	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck
API	Ionisation unter Atmosphärendruck
APPI	Photoionisation unter Atmosphärendruck
CE	Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation
Cof	Coffein
cts	counts
dGh	Dehydroguanidinoimidohydantoin
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAI	elektrochemisch assistierte Injektion
EC	Elektrochemie
EI	Elektronenstoßionisation
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FA	Ameisensäure
FAB	Fast-Atom-Bombardement
Fc	Ferrocen
FcMe10	Decamethylferrocen
FcMeOH	Ferrocenmethanol
FcTMAI	Ferrocenylmethyltrimethylammoniumiodid
FID	Flammenionisationsdetektor
FT-ICR	Fouriertransformationen-Ionenzyklotronresonanz
GC	Gaschromatographie
Gh	Guanidinoimidohydantoin
Gs	Guanosin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWB	Halbwertsbreite

I	Intensität
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ID	Innendurchmesser
IP	Isopropanol
Ip	Diiminopyrimidinon
Iz	Imidazolon
LC	Flüssigchromatographie
LOD	Nachweisgrenze
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation
MCP	Mikrokanalplatten-Detektor
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NACE	nicht-wässrige Kapillarelektrophorese
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
OmPyFc	Octamethyl-5,5'-di-(2-pyridyl)ferrocen
Ox	Oxadiazin
Q-Tof-MS	Quadrupol-Tof-MS
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
SHE	Standard-Wasserstoff-Elektrode
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
Sp	Spiroiminodihydantoin
SPCE	Kohlenstoff-Siebdruckelektrode
SPE	Siebdruckelektroden
SPE-CNF	Kohlenstoff-Nanofaser-Siebdruckelektrode
t <sub>m</sub>	Migrationszeit
Tof-MS	Flugzeitmassenspektrometer
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie

### 9.3. Curriculum Vitae

#### *Persönliche Daten*

Name	Rebekka Scholz
Geburtsdatum, -ort	31.08.1983, Stendal
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

#### *Schulische Ausbildung/ Studium*

08/1994 – 04/2003

Rudolf-Hildebrand-Gymnasium, Stendal

Abschluss: Abitur (Note: 1,1)

10/2003 – 08/2006

Universität Leipzig

Bachelor-Studium in Chemie

Bachelor-Arbeit zum Thema „Quantitative Totalanalyse des Elektrolythaushaltes von *Lycopersicon esculentum*“

Abschluss: B. Sc. (Note 1,6)

10/2006 – 09/2008

Universität Regensburg

Master-Studium in Medizinischer Chemie

Master-Arbeit zum Thema „Synthese und Derivatisierung der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindung Butein“

Abschluss: M. Sc. (Note 1,9)

### *Beruflicher Werdegang*

10/2008 – 05/2010

Universität Regensburg

Dissertation in Analytischer Chemie, Teil 1

06/2010 – 06/2011

Elternzeit

07/2011 – 07/2013

Universität Regensburg

Dissertation in Analytischer Chemie, Teil 2

(Abschluss der praktischen Arbeiten)

07/2013 – 09/2014

Elternzeit

seit 10/2014

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Abteilung für Sicherheit von Pestiziden – Fachgruppe für Rückstände und Analyseverfahren

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

### *Engagement*

10/2005 – 08/2006

Gewählte Vertreterin des Fachschaftsrats Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig

08/2004 – 09/2004

Praktikum im Fachbereich der instrumentellen Analytik

IHU Geologie und Analytik GmbH, Stendal

## 9.4. Publikationen und Präsentationen

### *Beiträge in Fachzeitschriften zur Thematik der Dissertation*

“A novel approach for the separation of neutral analytes by means of electrochemically assisted injection coupled to capillary electrophoresis – mass spectrometry”

**R. Scholz**, F.-M. Matysik, Analyst 136 (2011) 1562.

“Simulation of oxidative stress of guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine by electrochemically assisted injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry”

**R. Scholz**, P. Palatzky, F.-M. Matysik, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 687.

“Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis”

J. Mark, **R. Scholz**, F.-M. Matysik, Journal of Chromatography A 1267 (2012) 45-64.

### *Weiterer Beitrag in einer Fachzeitschrift*

“Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay”

S. Amslinger, N. Al-Rifai, K. Winter, K. Wörmann, **R. Scholz**, P. Baumeister, M. Wild, Org. Biomol. Chem. 11 (2013) 549.

## *Vorträge*

„Elektrochemisch Assistierte Injektion für Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie zur Trennung Neutraler Analyten“

Doktorandenseminar des AK Separation Science, Hohenroda, 2010

„Simulation von oxidativem Stress an Guanosin mittels elektrochemisch assistierter Injektion – Kapillarelektrophorese – Massenspektrometrie“

CE-Forum, Aalen, 2012

„Simulation von oxidativem Stress an Guanosin mittels elektrochemisch assistierter Injektion – Kapillarelektrophorese – Massenspektrometrie“

Anakon, Essen, 2013

## *Posterpräsentationen*

„Ferrocene Derivatives for an Electrochemically Assisted-Injection Protocol for Capillary Electrophoresis of Neutral Analytes“

**R. Scholz**, F.-M. Matysik, Anakon, 2009, Berlin.

„ Electrochemically Assisted-Injection for Capillary Electrophoresis of Neutral Analytes“

**R. Scholz**, F.-M. Matysik, HPLC, 2009, Dresden.

„ Electrochemically Assisted-Injection for Capillary Electrophoresis of Neutral Analytes“

**R. Scholz**, F.-M. Matysik, Wissenschaftsforum, 2009, Frankfurt/M.

„ Electrochemically Assisted-Injection for Capillary Electrophoresis of Neutral Analytes“

**R. Scholz**, F.-M. Matysik, 5. Regensburger Elektrochemietage, 2009, Regensburg.



*Eidesstattliche Erklärung*

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

