

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik

# **Entwicklung von Methoden zur Analyse von *N*-Acyl-Homoserinlactonen durch Kapillartrenntechniken und Massenspektrometrie**

**Moritz Frommberger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Wilfried Huber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. (RO) Antonius Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil. Dr. h. c. (Zonguldak Univ./Türkei) Harun Parlar
3. Priv.-Doz. Dr. agr. Dr. (INPL Vandœuvre-lès-Nancy/Frankreich) Philippe Schmitt-Kopplin

Die Dissertation wurde am 13. Januar 2005  
bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
am 12. April 2005 angenommen.

Ich bedanke mich bei Philippe Schmitt-Kopplin für die Betreuung, freundschaftliche Unterstützung und Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit, seine Aufgeschlossenheit gegenüber allem Neuen, sowie seine kreativen Anregungen und Denkanstöße.

Vielen Dank an Prof. Dr. Dr. A. Kettrup für die Betreuung an der Technischen Universität München und die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu können, sowie an Prof. Dr. W. Huber und Prof. Dr. Dr. H. Parlar für Vorsitz und Koreferat im Prüfungsausschuß.

Danke an alle, die diese Arbeit direkt unterstützt haben:

Prof. Dr. A. Hartmann (GSF, Abteilung Rhizosphärenbiologie) für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Anregungen von mikrobiologischer Seite,

Prof. Dr. T. R. I. Cataldi und Dr. G. Bianco (Università degli Studi della Basilicata, Potenza) für die Möglichkeit zur GC/MS-Messung und die freundliche Aufnahme in Italien,

Dr. M. Witt (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) für die Messungen am FTICR-MS,

Dr. N. Hertkorn (GSF, Institut für Ökologische Chemie) für die NMR-Messungen,

Heinz Frisch für die Hilfe bei der Elektronik und die Bewahrung vor Stromschlägen,

Matthias Englmann (GSF, Institut für Ökologische Chemie) für die Hilfe während der letzten Monate,

Dr. A. Kumar Malik und J. Singh Aulakh (Punjabi University Patiala und Guru Nanak Dev University, Amritsar) für die Gastfreundschaft in Indien sowie Prof. Dr. A. Varma (Jawaharlal Nehru University, Delhi) für neue Ideen und Anregungen,

und natürlich auch ganz besonders allen anderen, die mich während der letzten Jahre unterstützt und begleitet haben:

Ágnes Fekete, István Gebefügi, Brigitte Hai, Eva Holzmann, Sarah Jakoby, Jens Junkers, Brigitte Look, Silvia Thaller, Heidi Neumeir, Guichen Ping...

Diese Arbeit wurde mit Reisemitteln des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (VIGONI/Italien, PPP/Indien) unterstützt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom  
1. Mai 2002 bis zum 30. November 2004 am Institut für Ökologische Chemie  
der GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH  
in Attaching und Neuherberg erstellt.

Science may set limits to knowledge,  
but should not set limits to imagination.

**Bertrand Russell**



# Publikationsliste

## Artikel (erschienen/im Druck, Auswahl)

- FROMMBERGER, M., HERTKORN, N., ENGLMANN, M., JAKOBY, S., HARTMANN, A., KETTRUP, A. & SCHMITT-KOPPLIN, P. (2005). Analysis of *N*-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion exchange solid phase extraction by capillary zone electrophoresis/mass spectrometry. *Electrophoresis*, im Druck.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., PING, G., FRISCH, H., SCHMID, M., ZHANG, Y., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2004). A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration - nano-liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of *N*-acylhomoserine lactones. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 1014.
- CATALDI, T. R. I., BIANCO, G., FROMMBERGER, M. & SCHMITT-KOPPLIN, P. (2004). Direct analysis of selected *N*-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**: 1341.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2004). Analytik bakterieller Signalstoffe in komplexen mikrobiologischen Proben. *GIT Labor-Fachzeitschrift* **4**, 325.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., MENZINGER, F., ALBRECHT, V., SCHMID, M., EBERL, L., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2003). Analysis of *N*-acyl-L-homoserine lactones produced by *Burkholderia cepacia* with partial filling micellar electrokinetic chromatography - electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **24**: 3067.
- SCHMITT-KOPPLIN, P. & FROMMBERGER, M. (2003). Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* **24**: 3837.
- MENZINGER, F., SCHMITT-KOPPLIN, P., FROMMBERGER, M., FREITAG, D. & KETTRUP, A. (2003). Partial-filling micellar electrokinetic chromatography and non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of selected agrochemicals. *Fresenius J. Anal. Chem.* **371**: 25.

**Poster (Auswahl)**

- CATALDI, T. R. I., BIANCO, G., SCHMITT-KOPPLIN, P. & FROMMBERGER, M. (2004). Direct determination of *N*-acyl-L-homoserine lactones by GC/MS. *MASSA - An International Symposium on Mass Spectrometry*, Bari.
- HERTKORN N., BENNER, R., SCHMITT-KOPPLIN, P., WITT, M., KAISER, K., FROMMBERGER, M., KETTRUP, A. & HEDGES, I. J. (2004). Characterization of a major and new refractory component of marine organic matter. CRAM: carboxyl-rich alicyclic molecules. *XII International Meeting of the International Humic Substances Society*, São Pedro.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., BIANCO, G., PING, G., GEBEFÜGI, I., HARTMANN, A., CATALDI, T. R. I. & KETTRUP, A. (2004). New methods for the analysis of bacterial quorum sensing. *International Congress Rhizosphere - Perspectives and Challenges. A Tribute to Lorenz Hiltner*, München.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., WITT, M., GEBEFÜGI, I., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2004). Analysis of quorum sensing in *Burkholderia cepacia* with nano-LC/MS and FTICR-MS: a case study. *ebd.*
- SCHMITT-KOPPLIN, P., JUNKERS, J., FROMMBERGER, M. & HERTKORN, N. (2004). Capillary electrophoretic approaches and corresponding preparative up-scaling for the analysis of natural organic matter and of soil water extractable organic carbon. *HPCE - 17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis*, Salzburg.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., PING, G., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2004). Approaches to the analysis of bacterial quorum sensing with MEKC/MS and nano-LC/MS. *ebd.*
- SCHMITT-KOPPLIN, P., JUNKERS, J., FROMMBERGER, M., HERTKORN, N. & KETTRUP, A. (2003). Hyphenated electromigration techniques and corresponding preparative up-scaling options for the analysis of natural organic matter and of soil dissolved organic carbon with a molecular level resolution. *Mechanisms and Regulation of Organic Matter Stabilisation in Soils*, Hohenkammer/München.

# Abkürzungsverzeichnis

**ACP** *Acyl carrier protein*

**AHL** *N-Acyl-Homoserinlacton*

**AI** *Autoinducer*

**AIR** *Aerosol ionic redistribution*

**BBMA** *Butylacrylat-/Butylmethacrylat-/Methacrylat-Kopolymer*

**CCD** *Charge-coupled device*

**CE** *Capillary electrophoresis*, Kapillarelektrophorese

**CEC** *Capillary electrochromatography*, Kapillare Elektrochromatographie

**CID** *Collision induced dissociation*, kollisionsinduzierte Dissoziation

**CMC** *Critical micellar concentration*, kritische micellare Konzentration

**CZE** *Capillary zone electrophoresis*, Kapillar-Zonenelektrophorese

**DC** *Dünnschichtchromatographie*

**EI** *Electron ionization*, Elektronenionisierung

**EOF** *Electroosmotic flow*, elektroosmotischer Fluß

**ES** *Elektrospray*

**ESI** *Elektrospray-Ionisierung*

**FT** *Fourier-Transformation*

**FTICR** *Fourier transform ion cyclotron resonance*

**GC** *Gaschromatographie*

**HPLC** *High performance liquid chromatography*, Hochdruck-Flüssigchromatographie

**HS** *N-Acyl-Homoserin*

- HSL** *N*-Acyl-Homoserinlacton
- IT** *Ion trap*, Ionenfalle
- LC** *Liquid chromatography*, Flüssigchromatographie
- LOD** *Limit of detection*, Detektionslimit
- LOQ** *Limit of quantification*, Quantifizierungslimit
- MAX** *Mixed mode anion exchanger*, Gemischter Anionenaustauscher
- MECC** *Micellar electrokinetic capillary chromatography*, Micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie
- MEKC** *Micellar electrokinetic capillary electrophoresis*, Micellare elektrokinetische Kapillarelektrophorese
- MS** Massenspektrometer, Massenspektrometrie
- NB** *Nutrient broth*
- NMR** *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Kernresonanzspektroskopie
- OD** Optische Dichte
- PEEK** Polyether-Etherketon
- PTFE** Polytetrafluorethen («Teflon»)
- QS** *Quorum sensing*
- SAM** *S*-Adenosyl-L-Methionin
- SAX** *Strong anion exchanger*, starker Anionenaustauscher
- SDS** *Sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat
- SIM** *Single ion monitoring*
- SPE** *Solid phase extraction*, Festphasenextraktion
- SRM** *Single reaction monitoring*
- TIC** *Total ion current*, Gesamtionenstrom
- TLC** *Thin layer chromatography*, Dünnschichtchromatographie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsliste</b>	<b>vi</b>
<b>1. Bakterielle Kommunikation</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung	1
1.2 Bedeutung und Vorkommen	5
1.3 <i>N</i> -Acyl-Homoserinlactone	6
1.4 Dynamik und Interferenz	7
1.5 Existierende analytische Verfahren	11
1.6 Analytische Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
<b>2. Analytische Techniken</b>	<b>19</b>
2.1 Elektrospray-Ionisierung	19
2.1.1 Theoretischer Hintergrund	19
2.1.2 Praktische Realisierung	21
2.2 Charakteristika miniaturisierter Systeme	24
2.2.1 Miniaturisierte Chromatographie	24
2.2.2 Miniaturisierung und Elektrospray	25
2.3 Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie	27
2.3.1 Hydrodynamische Injektion	28
2.3.2 Elektroosmose	28
<b>3. Experimenteller Teil</b>	<b>33</b>
3.1 Neukonstruktion der Elektrospray-Ionisierungseinheit	33
3.1.1 Positionierung und Betrieb der CE und Nano-LC	34
3.1.2 Aufbau der Ionisierungseinheit	35
3.1.3 Ionisierung mit Kontaktflüssigkeit	36
3.1.4 Ionisierung ohne Kontaktflüssigkeit	40
3.1.5 Ergebnisse und zusammenfassende Bewertung	44
3.2 Micellare Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie	45
3.2.1 Grundlagen der MEKC	45
3.2.2 MEKC und MEKC/MS	47
3.2.3 Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten der Analyten	48
3.2.4 Erprobung unterschiedlicher Tenside	49
3.2.5 <i>Partial-filling</i> -MEKC/MS	54
3.2.6 Quantifizierung in der <i>Partial-filling</i> -MEKC/MS	57
3.2.7 Realprobenmessungen in der <i>Partial-filling</i> -MEKC/MS	57

3.3	Nano-LC/Massenspektrometrie . . . . .	61
3.3.1	Herstellung von Trennkapillaren . . . . .	61
3.3.2	Aufbau der Nano-LC-Anlage . . . . .	64
3.3.3	Optimierung der MS-Bedingungen . . . . .	65
3.3.4	Optimierung der Trennbedingungen . . . . .	66
3.3.5	Realproben . . . . .	67
3.3.6	Quantifizierung . . . . .	67
3.3.7	Modifikationen und Weiterentwicklungen . . . . .	73
3.4	Kapillarzonenlektrophorese/Massenspektrometrie von Hydrolysaten . . . . .	76
3.4.1	Vorversuche zur Hydrolyse von HSL-Standards . . . . .	76
3.4.2	Vollständigkeit der Hydrolyse . . . . .	76
3.4.3	Extraktion der Homoserine . . . . .	78
3.4.4	Optimierung der Detektionsbedingungen . . . . .	82
3.4.5	Optimierung der Trennbedingungen . . . . .	84
3.4.6	Reproduzierbarkeit, Probenstabilität und Quantifizierung . . . . .	87
3.4.7	Realprobenmessungen . . . . .	92
3.5	Gaschromatographie/Elektronenionisierungs-Massenspektrometrie . . . . .	97
3.5.1	Optimierung der GC-Bedingungen . . . . .	97
3.5.2	Realprobenmessungen mit GC/EI-MS . . . . .	98
3.6	Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	102
<b>4.</b>	<b>Anwendungsbeispiele</b>	<b>107</b>
4.1	Identifikation von HSL durch Nano-LC/MS und FT-MS . . . . .	107
4.2	Produktions- und Abbaukinetik von HSL . . . . .	109
<b>5.</b>	<b>Schlußfolgerungen und Ausblick</b>	<b>121</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>A</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien und Geräte</b>	<b>175</b>
<b>B</b>	<b>Analytische Techniken</b>	<b>177</b>
B1	Massenspektrometrie . . . . .	177
B2	Nano-LC/MS . . . . .	177
B3	CZE/MS und MEKC/MS . . . . .	178
B4	Gaschromatographie/Massenspektrometrie . . . . .	179
B5	NMR-Spektroskopie . . . . .	179
B6	Extraktion von Homoserinen durch Anionenaustauscher-SPE . . . . .	180
<b>C</b>	<b>Mikrobiologische Techniken</b>	<b>183</b>
C1	Verwendete Stämme und Kulturbedingungen . . . . .	183
C2	Dichlormethanextraktion . . . . .	183
<b>D</b>	<b>Untersuchte Verbindungen</b>	<b>185</b>

<b>E</b>	<b>Literaturübersicht Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie</b>	<b>193</b>
----------	----------------------------------------------------------------------	------------



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Literaturübersicht zu Bakterieller Kommunikation . . . . .	3
1.2	Schema des Quorum Sensing bei <i>Vibrio fischeri</i> . . . . .	4
1.3	Übersicht über bakterielle Signalverbindungen . . . . .	6
1.4	HSL-Biosynthese . . . . .	8
1.5	Klassische HSL-Analytik . . . . .	13
1.6	Übersicht <i>B. cepacia</i> LA-5 (Kulturextrakt, FTMS) . . . . .	15
2.1	Schematischer Aufbau einer ESI-Ionenquelle . . . . .	21
2.2	Mechanismus der Ionenbildung in der ESI . . . . .	22
2.3	Typen von ESI-Interfaces . . . . .	23
2.4	Nano-LC mit Probenaufkonzentrierung . . . . .	26
2.5	CE: Hoher und niedriger pH-Wert . . . . .	31
2.6	CE und HPLC: Flußprofile . . . . .	32
3.1	Vorhandene Ionenquelle . . . . .	34
3.2	Modifikation der Kapillarenführung . . . . .	35
3.3	Praktische Realisierung der ESI-Quelle (1) . . . . .	37
3.4	Praktische Realisierung der ESI-Quelle (2) . . . . .	38
3.5	Praktische Realisierung der ESI-Quelle (3) . . . . .	39
3.6	Schematische Darstellung CE/MS und LC/MS . . . . .	41
3.7	Spektrum bei Anwesenheit von Gasblasen . . . . .	42
3.8	CE-Lauf bei Anwesenheit von Gasblasen . . . . .	43
3.9	Elektrolyseapparatur . . . . .	43
3.10	Kinetik der Micellenbildung . . . . .	46
3.11	Mechanismen bei der MEKC . . . . .	48
3.12	AIR-Modell und Übertragung auf die ESI . . . . .	49
3.13	Fragmentierung von C8-HSL in der ESI . . . . .	50
3.14	Fragmentierung von C8-HSL in der ESI (Schema) . . . . .	51
3.15	Optimierung der Temperatur für die MEKC/MS . . . . .	52
3.16	MEKC/MS: Trennung mit Gallensäuren . . . . .	53
3.17	MEKC/MS: Schema der <i>partial filling</i> -Technik . . . . .	54
3.18	<i>Partial-filling</i> -MEKC/MS: Einfluß der SDS-Konzentration . . . . .	56
3.19	<i>Partial-filling</i> -MEKC/MS: Einfluß der Kapillarenfüllung . . . . .	58
3.20	<i>Partial-filling</i> -MEKC/MS: Trennparameter . . . . .	59
3.21	<i>Partial-filling</i> -MEKC/MS: Realprobe . . . . .	60

3.22	Nano-HPLC (schematisch) . . . . .	62
3.23	Nano-HPLC (praktische Umsetzung) . . . . .	63
3.24	Temperaturstabilität der HSL in der Nano-LC . . . . .	66
3.25	Methanolgehalte in der Nano-LC (mobile Phase) . . . . .	68
3.26	Methanolgehalte in der Nano-LC (Matrix) . . . . .	69
3.27	Bestimmung von C8-HSL (Nano-LC/MS, Realprobe, MS/MS) . . . . .	70
3.28	Bestimmung von C10-HSL (Nano-LC/MS, Realprobe, MS/MS) . . . . .	71
3.29	Bestimmung von C8- und C10-HSL (Nano-LC/MS, Realprobe, SRM) . . . . .	72
3.30	Quantifizierung in der Nano-LC/MS . . . . .	72
3.31	Reproduzierbarkeitsdaten von Nano-LC-Säulen . . . . .	74
3.32	Hydrolysekinetik der HSL in Ammoniak . . . . .	77
3.33	Hydrolysekinetik von C8-HSL in Natronlauge . . . . .	79
3.34	Hydrolysekinetik von C4-HSL in Natronlauge . . . . .	80
3.35	Optimierung der HS-Extraktion . . . . .	82
3.36	Einfluß des Extraktionsvolumens in der SPE . . . . .	83
3.37	Matrixeffekt nach SPE . . . . .	83
3.38	LogD-Werte der untersuchten Homoserine . . . . .	85
3.39	Einfluß der Trennspannung auf die CZE . . . . .	85
3.40	Pufferwechsel in der CZE . . . . .	86
3.41	Einfluß der Temperatur der Heizkapillare in der CZE . . . . .	86
3.42	Injektionszeit in der CZE . . . . .	87
3.43	Trennung eines Standardgemisches in der CZE . . . . .	88
3.44	Fragmentierungsenergie in der CZE/MS . . . . .	89
3.45	Fragmentierungsmechanismus der Homoserine . . . . .	89
3.46	Spektren in der CZE bei 20% <i>source fragmentation</i> . . . . .	90
3.47	Linearität der Standarddeichung in der CZE/MS . . . . .	91
3.48	Reproduzierbarkeit der HS-Bestimmung durch CZE/MS . . . . .	93
3.49	Probenstabilität bei der HS-Bestimmung durch CZE/MS . . . . .	94
3.50	Responsefaktoren in der CZE (Matrixextraktion) . . . . .	95
3.51	Realprobenmessung in der CZE (Spektren) . . . . .	95
3.52	Realprobenmessung in der CZE (Läufe) . . . . .	96
3.53	Analyse von HSL-Standards durch GC/EI-MS . . . . .	99
3.54	Spektrum von C6-HSL in der GC/EI-MS . . . . .	99
3.55	Fragmentierungsschema von C6-HSL in der GC/EI-MS . . . . .	100
3.56	Realprobenmessung in der GC/EI-MS . . . . .	101
4.1	Vergleich zwischen IT- und FTICR-Massenspektrometrie . . . . .	108
4.2	Bestätigung des Fragmentierungsschemas der HSL durch FTICR . . . . .	108
4.3	Nano-LC/Ionenfallen-MS: ( <i>B. cepacia</i> sp. LA-5) . . . . .	110
4.4	Nano-LC/Ionenfallen-MS ( <i>Acidovorax</i> sp. N-35) . . . . .	111
4.5	Fragmentierung von <i>m/z</i> 272 . . . . .	112
4.6	Identifizierung von HSL durch FTICR-Massenspektrometrie . . . . .	113
4.7	Quantifizierung im FTICR . . . . .	114
4.8	Produktionskinetik von HSL und HS (Summenparameter) . . . . .	115

4.9	Quantifizierung durch CZE/MS und Nano-LC/MS . . . . .	116
4.10	Produktionskinetik von HSL und HS (Einzelbestimmung) . . . . .	117
4.11	Wachstumskurven und pH-Verlauf von <i>B. cepacia</i> -Kulturen . . . . .	119
4.12	Produktionskinetik von HSL und HS von <i>B. cepacia</i> -Kulturen . . . . .	120
B1	Füllstation zur Herstellung von HPLC-Kapillaren . . . . .	178
B2	Schema der SPE-Extraktion . . . . .	181
D1	LogP-Werte der Homoserinlactone und der Hydrolyseprodukte . . . . .	192
E1	Applikationsübersicht CE/MS: Kategorien . . . . .	194
E2	Chronologische Entwicklung der CE/MS-Applikationen . . . . .	195
E3	Verwendete Massenspektrometer bei CE/MS-Applikationen . . . . .	195





# Tabellenverzeichnis

1.1	Übersichtsartikel zu Bakterieller Kommunikation . . . . .	2
1.2	Vorkommen von <i>N</i> -Acyl-Homoserinlactonen (1) . . . . .	9
1.3	Vorkommen von <i>N</i> -Acyl-Homoserinlactonen (2) . . . . .	10
1.4	Nachgewiesene Konzentrationen von <i>N</i> -Acyl-Homoserinlactonen . . . . .	17
2.1	Einteilung der HPLC . . . . .	24
2.2	Charakteristika von HPLC-Säulen . . . . .	25
2.3	Injektionsvolumen in der CE . . . . .	29
2.4	Flußraten in der CE . . . . .	32
3.1	Optimierte Fragmentierungsenergien in der LC-MS . . . . .	66
3.2	Eichung mit internem Standard in der Nano-LC . . . . .	75
3.3	Optimierung der HS-Extraktion . . . . .	81
3.4	Linearität der Standard Eichung in der CZE/MS . . . . .	91
3.5	Interner Standard in der CZE (Matrixextraktion) . . . . .	92
4.1	Übersicht zu den FTICR-Messungen . . . . .	114
D1	<i>m/z</i> -Werte der Homoserine und ihrer Hydrolyseprodukte . . . . .	185
D2	Untersuchte Standards . . . . .	186
D3	3- <i>hydroxy-N</i> -Acyl-Homoserinlactone . . . . .	187
D4	3- <i>oxo-N</i> -Acyl-Homoserinlactone . . . . .	188
D5	Einfach ungesättigte, unsubstituierte <i>N</i> -Acyl-Homoserinlactone . . . . .	189
D6	Einfach ungesättigte 3- <i>hydroxy-N</i> -Acyl-Homoserinlactone . . . . .	190
D7	Einfach ungesättigte 3- <i>oxo-N</i> -Acyl-Homoserinlactone . . . . .	191
E1	Übersichtsartikel zu CE/MS . . . . .	196
E2	Historische Entwicklung der CE/MS . . . . .	197
E3	Literaturübersicht CE/MS: Bioanalytik (Proteine und Peptide) . . . . .	201
E4	Literaturübersicht CE/MS: Bioanalytik (Saccharide, Kohlenhydrate) . . . . .	203
E5	Literaturübersicht CE/MS: Bioanalytik (DNA, RNA und Nucleotide) . . . . .	204
E6	Literaturübersicht CE/MS: Naturstoffe und Lebensmittelchemie . . . . .	204
E7	Literaturübersicht CE/MS: Pharmazeutika (nichtenantioselektiv) . . . . .	205
E8	Literaturübersicht CE/MS: Pharmazeutika (enantioselektiv) . . . . .	207
E9	Literaturübersicht CE/MS: Noxen- und Umweltanalytik . . . . .	207

E10	Literaturübersicht CE/MS: forensische Analytik . . . . .	209
E11	Literaturübersicht CE/MS: Nichtkategorisierbare Anwendungen . . . .	209

# 1. Bakterielle Kommunikation

## 1.1 Einführung

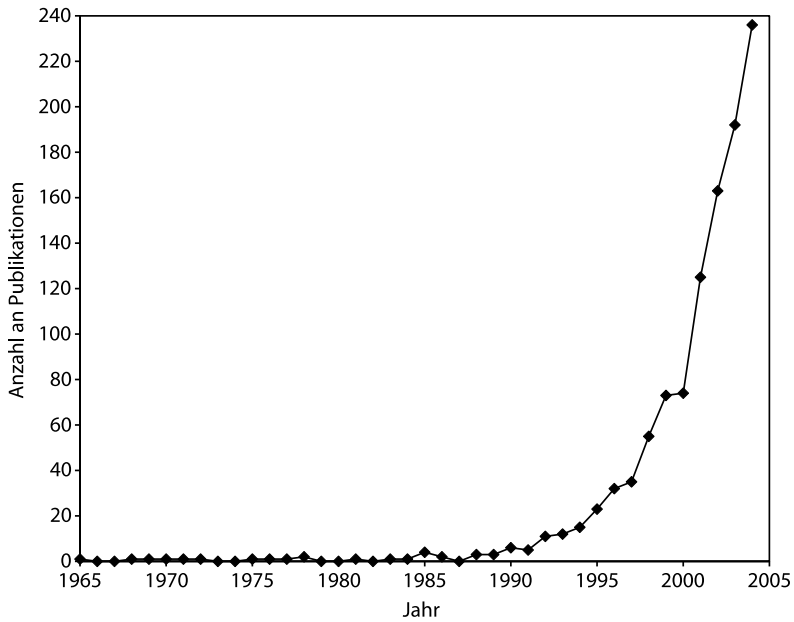
Die Tatsache, daß bestimmte Bakterien neben einer rein passiven *Reaktion* auf chemische oder physikalische Umweltreize auch in der Lage sind, *aktiv* innerhalb der eigenen Art und über Artgrenzen hinweg zu kommunizieren und im Ergebnis physiologische Reaktionen zu steuern, wurde ursprünglich zwar bereits vor über dreißig Jahren erkannt; die Bedeutung und der volle Umfang dieser Erkenntnis beginnt jedoch erst seit den letzten Jahren offensichtlich zu werden. Die Literatur im Umfeld der bakteriellen Kommunikation ist mittlerweile außerordentlich umfangreich und hat im Verlauf des letzten Jahrzehnts explosionsartig zugenommen (Abbildung 1.1). Jede Darstellung des aktuellen Wissensstandes muß daher unvollständig bleiben und kann lediglich einen Überblick über Trends und zentrale Erkenntnisse vermitteln. Tabelle 1.1 gibt eine Zusammenfassung einiger wichtiger Übersichtsartikel zum Thema.

Die Untersuchung heute mit dem Begriff *Quorum Sensing* (QS) bezeichneter Phänomene der chemischen Ökologie begann in den späten sechziger Jahren am marinen Leuchtbakterium *Photobacterium fischeri* (heute *Vibrio fischeri*). *V. fischeri* existiert in der Natur entweder in einer freilebenden, planktonischen Form oder aber als Symbiont bestimmter luminiszenter Fische und Weichtiere (RUBY & NEALSON, 1976; RUBY & MCFALL-NGAI, 1999), wobei in letzterem Fall spezialisierte »Lichtorgane« im Wirt kolonisiert werden. Der ökologische Sinn der Symbiose liegt in der Anlockung von Beutefischen im Dunklen oder der Tarnung: So vermeidet der nachtaktive Tintenfisch *Euprymna scolopes* durch die Lichtproduktion einen durch Mondlicht hervorgerufenen Schattenwurf auf dem Meeresgrund (VISICK & MCFALL-NGAI, 2000).

Ein augenfälliger Befund ist die Tatsache, daß die Lichtproduktion durch *V. fischeri* offensichtlich erst dann einsetzt, wenn die Zellen in Lichtorganen eingeschlossen sind und dort (oder in Laborkultur) in ausreichend hoher Dichte vorliegen (GREENBERG, 1997); die planktonischen Formen (oder junge Laborkulturen) zeigen hingegen keine Luminiszenz. Diese Tatsache wurde zunächst auf nicht näher definierte »Luminiszenzinhibitoren« im Medium zurückgeführt, die erst durch eine ausreichende Anzahl von Zellen abgebaut werden sollten (KEMPNER & HANSON, 1968). Die Hypothese wurde dadurch gestützt, daß offensichtlich in Kulturmedium, das bereits einmal mit Bakterien in Kontakt gekommen, und damit »konditioniert« worden war, die Luminiszenz bereits bei niedrigen Zelldichten induziert wurde. Wenige Jahre später konnte allerdings gezeigt werden, daß die Luminiszenz nicht durch den *Abbau* eines Inhibitors, sondern vielmehr durch die *Produktion* und *Akkumulation* eines »Aktivatormoleküls« oder *autoinducers* eingeleitet wird (NEALSON *et al.*, 1970; EBERHARD, 1972). Der Autoinducer wird konstitutiv von den Bakterien produziert und diffundiert frei durch

**Tabelle 1.1.** Ausgewählte Übersichtsartikel zu Bakterieller Kommunikation und *Quorum Sensing* (QS) in chronologischer Reihenfolge.

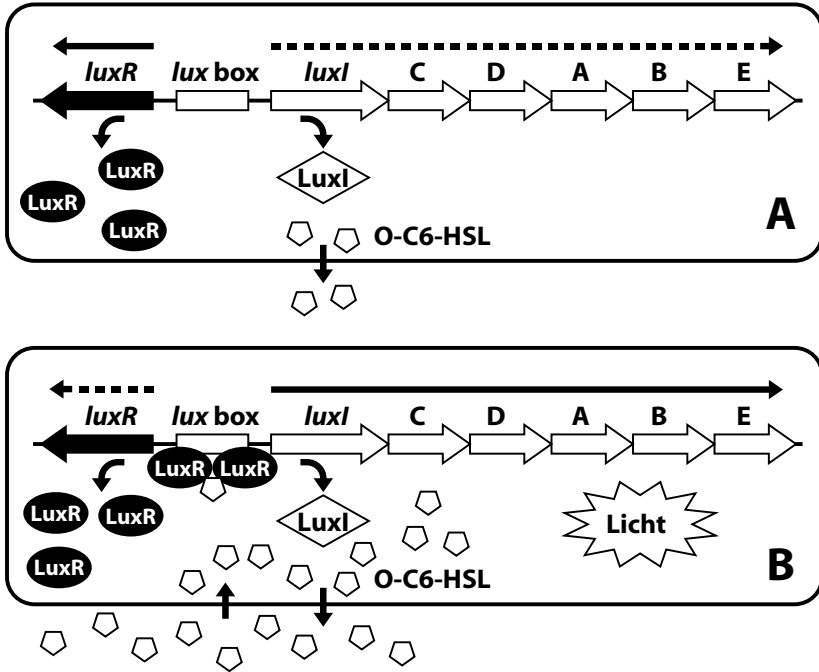
Thema	Referenz
Antworten von Pflanzen auf QS-Signale	BAUER & MATHESIU (2004)
QS im <i>Burkholderia cepacia</i> -Komplex	VENTURI <i>et al.</i> (2004)
QS bei <i>Erwinia</i> und <i>Agrobacterium</i>	NEWTON & FRAY (2004)
LuxR-Proteine	LAZDUNSKI <i>et al.</i> (2004)
QS und Infektionstherapie	SCHMIDT (2004)
QS und Lebensmittelverderb	SMITH <i>et al.</i> (2004)
Pharmakologische Inhibition des QS	HENTZER & GIVSKOV (2003)
QS bei <i>Vibrio cholerae</i>	KRUKONIS & DIRITA (2003)
QS bei stickstofffixierenden Rhizobien	GONZÁLEZ & MARKETON (2003)
QS bei Infektionen durch Staphylokokken	YARWOOD & SCHLIEVERT (2003)
QS bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SMITH & IGLEWSKI (2003)
QS und Infektionskrankheiten	DONABEDIAN (2003)
QS bei Pflanzenpathogenen	BECK V. BODMAN <i>et al.</i> (2003)
Biofilme von Gram-Negativen	SCHEMBRI <i>et al.</i> (2002)
Pflanzen-Mikroben-Interaktionen	LUGTENBERG <i>et al.</i> (2002)
QS durch Peptide bei Gram-Positiven	STURME <i>et al.</i> (2002)
QS-Disruption durch höhere Organismen	BAUER & ROBINSON (2002)
QS in Biofilmen	KJELLEBERG & MOLIN (2002)
QS bei <i>Rhizobium</i>	WISNIEWSKI-DYÉ & DOWNIE (2002)
QS und Nahrungsmittelverderb	GRAM <i>et al.</i> (2002b)
QS bei pflanzenassoziierten Bakterien	LOH <i>et al.</i> (2002)
QS als Ziel der Infektionstherapie	WILLIAMS (2002)
QS bei <i>Erwinia carotovora</i>	WHITEHEAD <i>et al.</i> (2002)
Ausgewählte QS-Systeme	SWIFT <i>et al.</i> (2001)
QS bei Pathogenen	WINZER & WILLIAMS (2001)
Regulationsnetzwerke	WITHERS <i>et al.</i> (2001)
Thermotoleranz bei <i>Escherichia coli</i>	ROWBURY & GOODSON (2001)
QS durch Peptide in Gram-Positiven	KLEEREBEZEM & QUADRI (2001)
QS bei Gram-Negativen	WHITEHEAD <i>et al.</i> (2001)
HSL-Analytik	BRELLES-MARINO & BEDMAR (2001)
Überblick über QS	BROWN & JOHNSTONE (2001)
QS und Virulenz	WILLIAMS <i>et al.</i> (2000)
QS und Pathogenese	DE KIEVIT & IGLEWSKI (2000)
Pathogene <i>in vivo</i>	SMITH (2000a)
QS und höhere Organismen	PARSEK & GREENBERG (2000)
QS bei <i>Escherichia coli</i>	GRUENHEID & FINLAY (2000)
Regulation der Genexpression durch QS	BASSLER (1999)
Carpabenbiosynthese	MCGOWAN <i>et al.</i> (1999)
QS bei Gram-Negativen	EBERL (1999)
Biogene Furanone	SLAUGHTER (1999)
QS bei pflanzenassoziierten Bakterien	PIERSON <i>et al.</i> (1998)
Überblick über QS	FUQUA & GREENBERG (1998)
Biosurfactants	SULLIVAN (1998)
QS und Pathogenese	WINANS (1998)
QS und Genexpression	HARDMAN <i>et al.</i> (1998)
LuxI/LuxR-Systeme	FUQUA <i>et al.</i> (1996)
Genetische Regulation bakterieller Lumineszenz	MEIGHEN (1994)



**Abbildung 1.1.** Literatur im Umfeld der bakteriellen Kommunikation (Recherche ISI und PubMed: Suchbegriffe *(acyl)homoserine lactone(s)*, *ahl*, *hsl*, *quorum sensing*, *autoinducer(s)*; falsch-positive Resultate eliminiert). Daten für 2004 extrapoliert.

die Zellwand (KAPLAN & GREENBERG, 1985; zur Diffusion anderer Signalmoleküle und die Beteiligung aktiver Transportvorgänge vgl. PEARSON *et al.*, 1999). Korrespondierend mit einer bestimmten Zelldichte erreicht seine Konzentration einen kritischen Schwellenwert, ab der die Luminiszenz (oder eine andere physiologische Reaktion) einsetzt. Der Autoinducer (AI-1) von *V. fischeri* wurde 1981 durch EBERHARD *et al.* als 3-oxo-*N*-Hexanoylhomoserinlacton (O-C6-HSL, vgl. Abschnitt 1.3 und Anhang D) identifiziert; die genetische Regulation wurde erstmals 1983 durch ENGBRECHT *et al.* untersucht; spätere Arbeiten führten zum grundlegenden Modell des QS bei *V. fischeri* (Abbildung 1.2), das analog (jedoch mit unterschiedlichen Enzymen, Signalmolekülen und Zielgenen) bei einer Reihe von Arten verwirklicht ist:

Bei niedrigen Zelldichten werden die »Luminiszenzgene« *luxCDABE* auf niedrigem Level transkribiert. Gleichzeitig kommt es zur Expression der Autoinducer-Synthase LuxI (vgl. Abschnitt 1.3) und des LuxR-Proteins. Der durch LuxI in geringer Menge synthetisierte Autoinducer (O-C6-HSL) diffundiert durch die Zellwand und wird lokal akkumuliert. Bei ausreichender Konzentration bindet der Autoinducer als Ligand an das hierdurch dimerisierte LuxR (zur Dimerisierung und Ligandenbindung vgl. EGLAND



**Abbildung 1.2.** Grundschemata des Quorum Sensing am Beispiel der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*: **A** niedrige Zelldichte. **B** hohe Zelldichte. Zu Details vgl. Text. Abbildung nach WHITEHEAD *et al.* (2001), verändert.

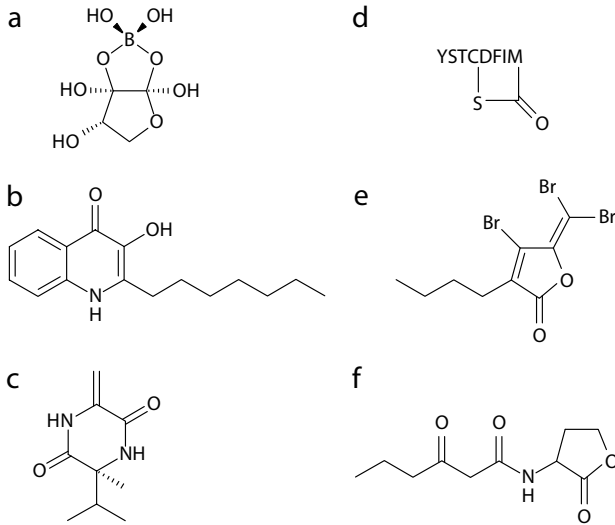
& GREENBERG, 1999; QIN *et al.*, 2000; ZHU & WINANS, 2001; LEWIS *et al.*, 2001; VANNINI *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2003). Der LuxR/O-C6-HSL-Komplex bindet an eine spezielle Region der DNA (*lux box*, vgl. ZHANG *et al.*, 2002) und induziert hierdurch einerseits eine erhöhte Bildung von LuxI (Autoinduktion) und andererseits eine gesteigerte Transkription der *luxCDABE*-Gene.

Obwohl der Begriff *Pheromon* in der Literatur umfassend für QS-Moleküle verwendet wird, bezeichnet der Terminus im ursprünglichen Definitionssinn (KARLSON & LÜSCHER, 1959) eine Substanz, die von einem Individuum einer Art ausgeschüttet wird und bei einem anderen Individuum *derselben* Art eine spezifische Reaktion auslöst. Wie vor allem neuere Arbeiten zum Thema zeigen (vgl. Tabelle 1.1 und Abschnitt 1.4) ermöglichen QS und analoge Prozesse jedoch auch eine Kommunikation zwischen unterschiedlichen Arten, Stämmen und Klassen, weshalb im folgenden der allgemeinere Begriff *Semiochemikalien* (LAW & REGNIER, 1971) verwendet wird.

## 1.2 Bedeutung und Vorkommen

Bis etwa 1990 schien QS auf wenige »exotische« Arten wie *V. fischeri* und *V. harveyi* aus spezialisierten marinen Symbiosen beschränkt und fand schon alleine deswegen nur geringe Resonanz in der wissenschaftlichen Öffentlichkeit. Erste Hinweise für eine universalere Bedeutung stammen aus der Untersuchung von *Erwinia carotovora*, einem Pflanzenpathogen, bei dem die Synthese von Carpabenem-Antibiotika (wie auch bei *V. fischeri*) durch O-C6-HSL gesteuert wird (BAINTON *et al.*, 1992a,b). In *Pseudomonas aeruginosa*, einem Humanpathogen, wurde zunächst ebenfalls ein QS-System vom *V. fischeri*-Typ (GAMBELLO & IGLEWSKI, 1991, Signalmolekül O-C6-HSL) als verantwortlich für die Produktion von Elastase, einem wichtigen Virulenzfaktor, identifiziert. Ein zweites System (mit dem Signalmolekül C4-HSL, WINSON *et al.*, 1995) wurde unabhängig voneinander durch LATIFI *et al.* (1995) und OCHSNER & REISER (1995) charakterisiert (u. a. verantwortlich für die Produktion von Rhamnolipiden und Haemolysin, und damit ebenfalls wichtiger Virulenzfaktoren). Mittlerweile sind mehr als fünfzig Arten bekannt, bei denen physiologische Reaktionen durch QS gesteuert sind, die entsprechende Signale produzieren, oder die zumindest auf diese reagieren; es sind entsprechende Befunde immer dort nicht auszuschließen, wo Bakterien in großer Zahl vorkommen und mit höheren Organismen vergesellschaftet sind. In Bakterienkolonien kommt es häufig zu einem simultanen Austausch unterschiedlichster Signale, und letztlich zu einer Ausbildung auch interspezieller Signalkaskaden hochkomplexer Natur (vgl. Abschnitt 1.4). QS wird in der Regel über niedermolekulare Verbindungen vermittelt: Bei den Gramnegativen steht die Stoffklasse der *N*-Acyl-Homoserinlactone (AHL, HSL, *N*-Acyl-HSL etc.; vgl. Tabelle D2 bis D7) im Vordergrund; bei den Grampositiven erfolgt die Kommunikation hingegen überwiegend über kurzkettige, teilweise zyklische Peptide (zu Übersichtsartikeln siehe Tabelle 1.1). Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über einige aus der Literatur bekannte Verbindungen.

Die praktische Bedeutung der bakteriellen Kommunikation ist vielfältig und überschreitet häufig die Grenzen der einzelnen Fachdisziplinen: In der Medizin kommt dem QS als einem Regulativ bei der Ausprägung wichtiger Virulenzfaktoren entscheidende Bedeutung zu (siehe auch oben); die koordinierte Einleitung der Pathogenese in der Lunge immundefizienter Patienten oder die Besiedelung von Brandwunden wird durch HSL-gestützte Kommunikation zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und Mitgliedern der *Burkholderia cepacia*-Gruppe gesteuert. Die Pathogenität einer Reihe weiterer Organismen steht möglicherweise unter QS-Kontrolle (WILLIAMS *et al.*, 2000). Zu Humanpathogenen eng verwandte Stämme der Pseudomonaden und *Burkholderia cepacia* sind andererseits auch effektive Besiedler der Wurzeln von Reis- und Tomatenpflanzen. HSL-Moleküle spielen eine Rolle bei der Ausbildung der Symbiose zwischen Leguminosen und stickstofffixierenden Rhizobien (siehe oben); Kolonisten von Wurzeloberflächen wie *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* können als Biokontrollorganismen eingesetzt werden, da sie - auch hier QS-reguliert - eine gegen pflanzenpathogene Pilze gerichtete Antibiotikaproduktion induzieren können (Allelopathie). Das zunehmende Wissen um die beim QS ablaufenden Prozesse sollte es in der Zukunft erlauben, diese gezielt zu beeinflussen, um hierdurch z. B. alternative Ansatzmöglich-



**Abbildung 1.3.** Überblick über unterschiedliche bakterielle Semiochemikalien. **a)** »Autoinducer II« (AI-II, *Vibrio harveyi*, borhaltig; CHEN *et al.*, 2002); **b)** Chinolon (PESCI *et al.*, 1999) und **c)** cyclisches Dipeptid aus *Pseudomonas aeruginosa* (OTTO *et al.*, 2001); **d)** cyclisches Peptid aus *Staphylococcus aureus*; **e)** halogeniertes Furanon aus *Delisea pulchra* (Rhodophyceae, vgl. Abschnitt 1.4); **f)** 3-oxo-N-Acyl-Homoserinlacton.

keiten für die Therapie von Infektionen zu schaffen; eine Perspektive, die vor allem vor dem Hintergrund der Antibiotikaproblematik und der zunehmenden Ausbildung multipler Resistenzen in der Zukunft mehr und mehr an Bedeutung gewinnen wird (BALABAN *et al.*, 1998, vgl. auch Abschnitt 1.4).

Neben ihrer Bedeutung als bakterielle Semiochemikalien besitzen bestimmte Signalverbindungen und synthetische Analoga pharmazeutische Aktivität (und können damit *per se* als Virulenzdeterminanten wirken: TELFORD *et al.*, 1998). Hierzu zählen immunomodulatorische Eigenschaften (TELFORD *et al.*, 1998; CHHABRA *et al.*, 2003) bzw. die Induktion der Interleukinproduktion (IL-8) in Lungeneithelien (Zelllinien) durch Exoprodukte von *B. cepacia* (DI MANGO *et al.*, 1995; PALFREYMAN *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2001a), sowie die Cyclooxygenase- und Prostaglandininduktion (SMITH *et al.*, 2002).

### 1.3 N-Acyl-Homoserinlactone

Die am besten untersuchte QS-Systeme bei Gram-Negativen (zu Gram-Positiven vgl. Abschnitt 1.2 und KLEEREBEZEM & QUADRI, 2001) werden durch Semiochemikalien vom N-Acyl-Homoserinlacton-Typ vermittelt. Gemeinsames Strukturmerkmal

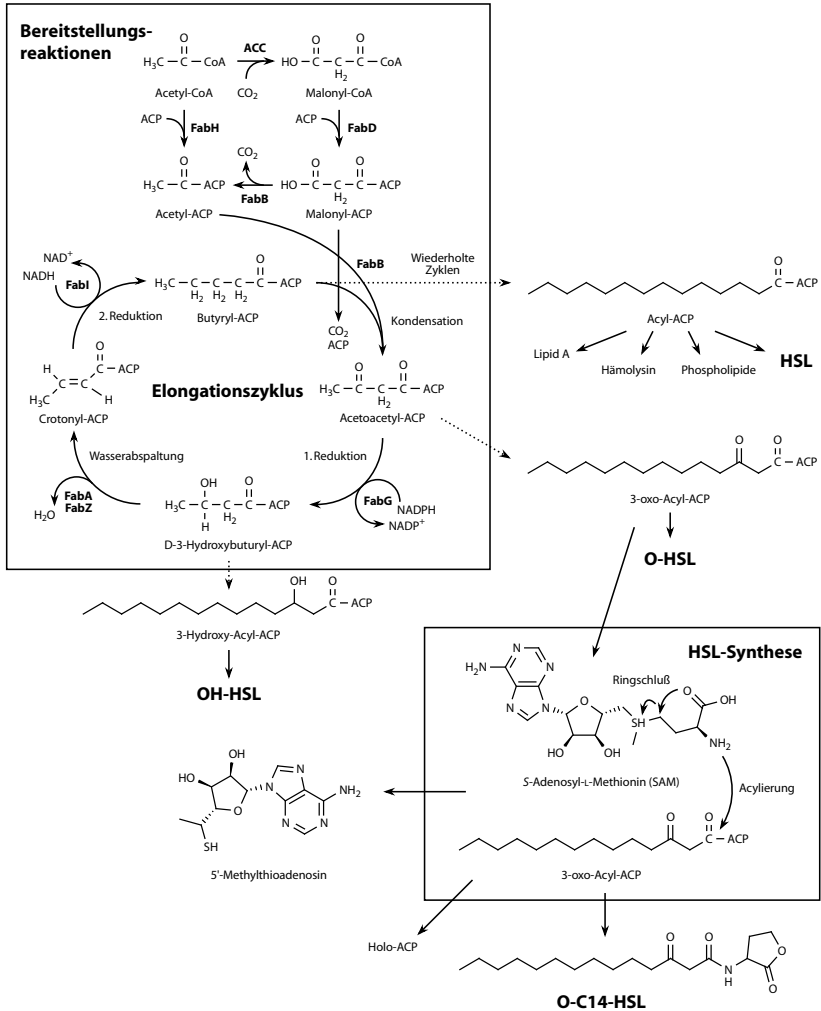


der *N*-Acyl-Homoserinlactone ist ein  $\gamma$ -Lactonring mit einer *N*-acylierten Seitenkette, die je nach Art der Synthese eine unterschiedliche Länge, Sättigung und Substitution am C3 (fakultative *oxo*- oder Hydroxyfunktion) aufweist. Grundlegende Untersuchungen zur Biosynthese wurden an Proteinextrakten aus *V. fischeri* (SCHAEFER *et al.*, 1996) und Aminosäure-auxotrophen *Escherichia coli*-Mutanten (HANZELKA & GREENBERG, 1996), weitere *in vitro*-Versuche mit der HSL-Synthase LuxI aus *V. fischeri* und dem LuxI-homologen Enzym RhlI aus *P. aeruginosa* vorgenommen; als Quelle für die Homoserinlactoneinheit des HSL-Moleküls kommt hiernach nur *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) in Frage. Die Seitenkette des Moleküls stammt aus Zwischenprodukten der Fettsäurebiosynthese (acyliertes *Acyl Carrier Protein*, acyl-ACP), wobei eine bestimmte Strukturspezifität der Synthese hinsichtlich der »geeigneten« Kettenlänge zu beobachten ist (SCHAEFER *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1998). Die Synthese (z. B. Esal: WATSON *et al.*, 2002) zeigt entsprechend auch deutliche Strukturhomologien zu *N*-Acetyltransferasen aus der Fettsäurebiosynthese. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die HSL-Biosynthese nach gegenwärtigem Kenntnisstand. Eine wichtige Konsequenz des vorgestellten Synthesewegs ist die Restriktion in der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette: acyl-ACP überträgt immer C2-Untereinheiten; entsprechend sollte die Seitenkette auch aus einer geradzahligen Anzahl von Kohlenstoffatomen bestehen. Das durch LITHGOW *et al.* (2000) bzw. HORNG *et al.* (2002) bei *Rhizobium leguminosarum* und *Serratia marcescens* u. a. durch ESI-MS nachgewiesene C7-HSL stellt somit auch den Ausnahmefall dar und muß aus einer nachträglichen Modifikation der Seitenkette stammen. Die Tabellen 1.2 und 1.3 geben einen Überblick über bisher nachgewiesene Verbindungen vom HSL-Typ und die zugehörigen Arten.

## 1.4 Dynamik und Interferenz

Ein in wichtigen Details noch wenig verstandener Aspekt der Interaktion zwischen Bakterien, vor allem aber auch der Interaktion von Mikroben und höheren Organismen ist die Regulation des bakteriellen QS und die Interferenz durch Abbau der Signalmoleküle oder Ausschüttung von strukturanalogen Verbindungen (*Quorum quenching*: Übersicht bei ZHANG, 2003), von denen im folgenden nur einige wenige Beispiele angeführt werden sollen:

Bestimmte *Bacillus*- (WANG *et al.*, 2004; DONG *et al.*, 2001, 2002, 2004; REIMMANN *et al.*, 2002) und *Arthrobacter*-Arten (PARK *et al.*, 2003) produzieren HSL-Lactonasen; bei *P. aeruginosa* (einem HSL-Produzenten!) kommt offensichtlich wie auch bei bestimmten *Ralstonia*-Stämmen (LIN *et al.*, 2003) neben einer Lactonase gleichzeitig eine HSL-Acylase vor (HUANG *et al.*, 2003). Die Inaktivierung von Semiochemikalien vom HSL-Typ durch Acylasen und Lactonasen dient wohl einerseits der Unterdrückung der Kommunikation von Nahrungskonkurrenten, andererseits wird hierdurch offensichtlich auch eine Selbstregulation HSL-gesteuerter Vorgänge erreicht (zu *A. tumefaciens* vgl. ZHANG *et al.*, 2004). Respiratorische Epithelien im Menschen vermögen offensichtlich selektiv HSL bestimmter Kettenlänge (u. a. O-C12-HSL, nicht jedoch C4-HSL) durch oberflächenassoziierte Enzyme zu inaktivieren (CHUN *et al.*, 2004). Dieser Be-



**Abbildung 1.4.** Biosynthese von *N*-Acyl-Homoserinlactonen am Beispiel von *P. aeruginosa*: Bereitstellung der Ausgangsverbindungen (entsprechend beladenes ACP) durch die Fettsäurebiosynthese (zu weiteren Synthesewegen vgl. CRONAN & ROCK, 1996). Die HSL-Synthase (»I-Enzym«) bewirkt die Zyklisierung von SAM und die Übertragung der Seitenkette vom acylierten ACP. Abbildung nach HOANG *et al.* (2002) und WATSON *et al.* (2002), verändert.

**Tabelle 1.2.** Vorkommen unsubstituierter, gesättigter *N*-Acyl-Homoserinlactone (Auswahl). Zu den Kurzbezeichnungen vgl. Tabelle D2 bis D7.

Verbindung	Art	Referenz
<b>C4-HSL</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Escherichia coli</i>	WINSON <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PEARSON <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CHIN-A-WOENG <i>et al.</i> (2001)
	<i>Serratia liquefaciens</i>	EBERL <i>et al.</i> (1996)
<b>C6-HSL</b>	<i>Vibrio harveyi</i>	CAO & MEIGHEN (1989)
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Burkholderia cepacia</i>	GOTTSCHLICH <i>et al.</i> (2001)
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	ULRICH <i>et al.</i> (2004)
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	CHERNIN <i>et al.</i> (1998)
	<i>Escherichia coli</i>	WINSON <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WINSON <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	WOOD <i>et al.</i> (1997)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CHIN-A-WOENG <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LAUE <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	ELASRI <i>et al.</i> (2001)
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	FLAVIER <i>et al.</i> (1997)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RODELAS <i>et al.</i> (1999)
	<i>Serratia liquefaciens</i>	EBERL <i>et al.</i> (1996)
	<i>Serratia marcescens</i>	HORNG <i>et al.</i> (2002)
<i>Vibrio anguillarum</i>	MILTON <i>et al.</i> (2001)	
<i>Vibrio fischeri</i>	KUO <i>et al.</i> (1994)	
<i>Vibrio salmonicida</i>	FIDOPIASTIS <i>et al.</i> (1999)	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	THROUP <i>et al.</i> (1995)	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATKINSON <i>et al.</i> (1999)	
<b>C7-HSL</b>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	LITHGOW <i>et al.</i> (2000)
<b>C8-HSL</b>	<i>Serratia marcescens</i>	HORNG <i>et al.</i> (2002)
	<i>Burkholderia cepacia</i>	LEWENZA <i>et al.</i> (1999)
<b>C10-HSL</b>	<i>Burkholderia thailandensis</i>	ULRICH <i>et al.</i> (2004)
	<i>Escherichia coli</i>	KUO <i>et al.</i> (1994)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	CHIN-A-WOENG <i>et al.</i> (2001)
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	FLAVIER <i>et al.</i> (1997)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WISNIEWSKI-DYÉ <i>et al.</i> (2002)
	<i>Serratia marcescens</i>	HORNG <i>et al.</i> (2002)
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MARKETON <i>et al.</i> (2002)
	<i>Vibrio fischeri</i>	KUO <i>et al.</i> (1994)
<b>C12-HSL</b>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATKINSON <i>et al.</i> (1999)
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	VALADE <i>et al.</i> (2004)
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	ULRICH <i>et al.</i> (2004)
	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	GOTTSCHLICH <i>et al.</i> (2001)
<b>C14-HSL</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LAUE <i>et al.</i> (2000)
	<i>Brucella melitensis</i>	TAMINIAU <i>et al.</i> (2002)
<b>C16-HSL</b>	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	GOTTSCHLICH <i>et al.</i> (2001)
	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	GOTTSCHLICH <i>et al.</i> (2001)
<b>C18-HSL</b>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	SCHAEFER <i>et al.</i> (2002)
<b>C18-HSL</b>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MARKETON <i>et al.</i> (2002)

**Tabelle 1.3.** Vorkommen modifizierter (substituierter und/oder ungesättigter) *N*-Acyl-Homoserinlactone (Auswahl). Zu den Kurzbezeichnungen vgl. Tabelle D2 bis D7.

Verbindung	Art	Referenz
<b>O-C6-HSL</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1997)
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1993)
	<i>Erwinia carotovora</i>	BAINTON <i>et al.</i> (1992b)
	<i>Erwinia stewartii</i>	BECK V. BODMAN & FARRAND (1995)
	<i>Hafnia alvei</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1993)
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	BATCHELOR <i>et al.</i> (1997)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JONES <i>et al.</i> (1993)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	ELASRI <i>et al.</i> (2001)
	<i>Rahnella aquatilis</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1993)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RODELAS <i>et al.</i> (1999)
	<i>Serratia marcescens</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1993)
	<i>Serratia proteamaculans</i>	FLODGAARD <i>et al.</i> (2003)
	<i>Vibrio fischeri</i>	SHADEL <i>et al.</i> (1990)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	THROUP <i>et al.</i> (1995)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATKINSON <i>et al.</i> (1999)	
<b>O-C8-HSL</b>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	FLODGAARD <i>et al.</i> (2003)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	ELASRI <i>et al.</i> (2001)
<b>O-C10-HSL</b>	<i>Vibrio anguillarum</i>	MILTON <i>et al.</i> (1997)
<b>O-C12-HSL</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PEARSON <i>et al.</i> (1994)
<b>O-C14-HSL</b>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MARKETON <i>et al.</i> (2002)
<b>O-C16-HSL</b>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MARKETON <i>et al.</i> (2002)
<b>OH-C6-HSL</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SHAW <i>et al.</i> (1997)
	<i>Vibrio anguillarum</i>	MILTON <i>et al.</i> (2001)
<b>OH-C8-HSL</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SHAW <i>et al.</i> (1997)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WISNIEWSKI-DYÉ <i>et al.</i> (2002)
<b>OH-C10-HSL</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SHAW <i>et al.</i> (1997)
<b>OH-C14:1-HSL</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LAUE <i>et al.</i> (2000)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	SCHRIPSEMA <i>et al.</i> (1996)
<b>C16:1-HSL</b>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	MARKETON <i>et al.</i> (2002)

fund könnte ein Hinweis auf eine zielgerichtete Störung der QS-Regulationskaskade (ein O-C12-HSL-System aktiviert hierbei ein C4-HSL-System) in *P. aeruginosa* sein (HASTINGS, 2004).

Die marine Rotalge *Delisea pulchra* produziert halogenierte Furanone (vgl. Abbildung 1.3 und SLAUGHTER, 1999), die im Laborexperiment das QS einer Reihe von Stämmen beeinflussen (GIVSKOV *et al.*, 1996; RASMUSSEN *et al.*, 2000; MANEFIELD *et al.*, 2000; REN *et al.*, 2001; MANEFIELD *et al.*, 2001; HENTZER *et al.*, 2002). Als Konsequenz wird die Oberfläche der Alge nicht oder nur kaum von Biofilmen besiedelt. Der molekulare Mechanismus der Inhibition beruht auf einer kompetitiven Hemmung des Rezeptors (MANEFIELD *et al.*, 1999). Die natürlich auftretende Hemmung des QS lässt sich auch durch synthetische Furanone erreichen (WU *et al.*, 2004) und führt zu einer deutlich verringerten Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* im Mausmodell. Ver-

gleichbare Effekte haben Metaboliten des marinen Bryozoen *Flustra foliacea* (PETERS *et al.*, 2003) und bestimmter Pflanzen (Prof. Dr. Leo Eberl, persönl. Mittlg.). Abhängig vom pH-Wert der Lösung, der Temperatur und der Länge der Seitenkette reagieren die HSL während des Wachstums von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa* durch Ringöffnung zum jeweiligen Homoserin (YATES *et al.*, 2002); ähnliche Befunde wurden beim O-C6-HSL von *Erwinia carotovora* beobachtet. Tabakpflanzen reagieren auf einen Befall durch Bakterien bereits lange vor feststellbaren Läsionen mit der Aktivierung von Protonenpumpen (NACHIN & BARRAS, 2000); der pH-Wert der Rhizosphäre wird hierdurch drastisch von < 6,4 auf > 8,2 erhöht (BAKER *et al.*, 1990, 1986), ein Befund, der mit der Instabilität der HSL bei hohem pH-Wert in Zusammenhang stehen könnte. Bereits eine mild-alkalische Umgebung kann den Kommunikationsweg über HSL unterbinden; diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür liefern, warum Darmbakterien wie *E. coli* (pH 7,6/37 °C) für ihre Kommunikation auf andere Semiochemikalien (hier Furanoderivate) zurückgreifen (SCHAUDER *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu kommuniziert eine Reihe von marinen Bakterien ungeachtet des hohen pH-Werts im Meerwasser (pH 7,8 bis 8,2; HAWLEY, 1981) über HSL (GRAM *et al.*, 2002a); die Lebensdauer der Moleküle ist aufgrund der niedrigen Temperatur (gegenüber den vorgenannten 37 °C) um das ca. 4-8fache verlängert. Vor allem die Dynamik der HSL (Produktion und enzymatischer/nichtenzymatischer Abbau) ist durch existierende analytische Ansätze kaum untersucht (vgl. Abschnitt 1.5), da mit den existierenden bioanalytischen Techniken in der Regel nur *bioaktive*, d. h. intakte HSL detektiert werden können.

## 1.5 Existierende analytische Verfahren

Ungeachtet der Bedeutung der bakteriellen Kommunikation im medizinischen, ökologischen und landwirtschaftlichen Bereich (s. o.) erscheint die Bandbreite der Verfahren zur Untersuchung von HSL eingeschränkt: Die überwiegende Mehrzahl der veröffentlichten Untersuchungen verwendet eine Methode, die ursprünglich auf SHAW *et al.* (1997) zurückgeht (ein Vorscreening kann auch durch einen Kreuzstrichtest erfolgen): Zu untersuchendes Material (das in ausreichender Menge vorliegen muß, üblicherweise 50-500 ml) wird mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt, die organische Phase wird eingengt; der Extrakt wird anschließend durch Dünnschichtchromatographie (DC, i. d. R. Umkehrphase) aufgetrennt. Die entwickelten DC-Platten werden mit Agar überschichtet und mit sensitiven Reporterstämmen bebrütet. Je nach verwendetem Reporterkonstrukt reagieren die Bakterien bei Anwesenheit bestimmter HSL mit detektierbaren physiologischen Reaktionen wie Licht- oder Pigmentproduktion (MC-CLEAN *et al.*, 1997). Die Nachteile der DC-Analytik und des nachfolgenden Bioassays sind bereits in der Originalarbeit (SHAW *et al.*, 1997) diskutiert und bedürfen auch heute kaum einer Ergänzung (Hervorhebungen eingefügt):

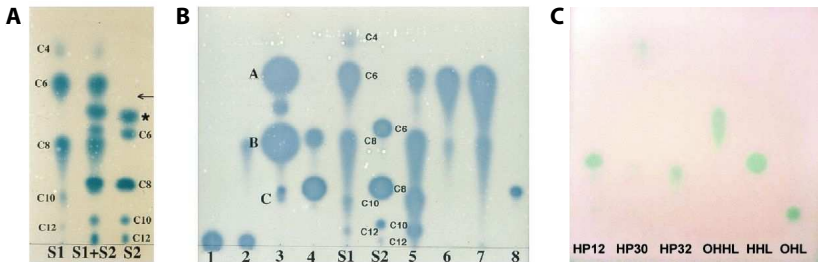
The assay must be used with caution. First, *detection is limited to those acyl-HSLs to which the bioindicator will respond*. In this regard, the *A. tumefaciens traG::lacZ/traR* reporter detects 3-oxo-substituted HSL deriva-

tives with acyl chain lengths from 4 to 12 carbons as well as 3-hydroxy derivatives with acyl chain lengths of 6, 8, and 10 carbons. The reporter also can detect signal molecules with acyl chain lengths longer than 12. Extracts from cultures of the two *Rhizobium meliloti* strains tested contained an active compound that chromatographed with a mobility slower than that of either C12 standard. While the structures of these molecules are unknown, their presence is consistent with a report by Gray [ ... ] describing a highly nonpolar acyl-HSL activity in culture supernatants of *R. meliloti* strain Rm1021.

Second, *the signal must be present at levels detectable by the reporter*. The R proteins are highly specific for their cognate acyl-HSL signals but will respond to analogs if present at sufficiently high concentrations [ ... ] Consistent with this, members of each carbon 3 substitution series were detected with lessening sensitivity the farther they diverged from the C8 chain length of the cognate *Agrobacterium* signal [ ... ] While it is extremely sensitive to the 3-oxo derivatives, and to the one 3-hydroxy derivative for which we have quantitative data [ ... ] the *A. tumefaciens* reporter responds less well to most of the 3-unsubstituted acyl-HSLs, and it does not respond at all to *N*-butanoyl-L-HSL. The use of reporters that respond optimally to other acyl-HSL signals could extend the range as well as improve the sensitivity of the assay to certain of these signal molecules. However, in our hands, the *A. tumefaciens* strain is the most versatile single reporter available.

Third, *although the shapes of the spots differ, the 3-oxo- and the 3-hydroxy derivatives of the same chain length migrate with indistinguishable mobilities in the methanol/water solvent system*. In an extract containing both substitution types having the same acyl chain length, the presence of one, especially at amounts that result in high reporter activity, *will mask that of the other*. Moreover, a strongly active compound of one type may obscure the presence of a weakly active species that migrates with a similar but nonidentical  $R_f$ .

Finally, *one cannot conclude from the absence of a signal that the tested bacterium does not produce one or more acyl-HSLs*. Such organisms may produce signals that are not detectable by the reporter, or they may produce detectable molecules at levels below the threshold of the reporter. Modulation of acyl-HSL production by other regulatory circuits, as well as by the medium and culture conditions used to grow the bacteria being tested, also may influence whether these signal molecules are produced in amounts sufficient for detection by the reporter. For these reasons, *the assay gives a minimum estimate of the complement of signal molecules that can be produced by a given microorganism*. Nevertheless, the TLC assay is well suited to screening even complex acyl-HSL complements produced by bacteria.



**Abbildung 1.5.** Beispiele für die »klassische« HSL-Analytik durch Dünnschichtchromatographie und Biodetektion. **A** und **B** nach SHAW *et al.* (1997), **C** nach GRAM *et al.* (2002b).

In Abbildung 1.5 ist die »klassische« HSL-Analytik durch Dünnschichtchromatographie dargestellt. Eine Quantifizierung der HSL kann durch Auftrag entsprechender Standards in der DC und Vergleich der Spots, oder durch Inkubation mit Indikatorstämmen in Flüssigkultur erreicht werden; Tabelle 1.4 am Ende dieses Abschnitts gibt einen Überblick über nachgewiesene Konzentrationen aus der Literatur.

Zwar wurde für die strukturchemische Charakterisierung einzelner Verbindungen wiederholt auf instrumentelle analytische Verfahren wie Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie (unter anderem auch nach präparativer oder analytischer HPLC) zurückgegriffen (vgl. u. a. CAO & MEIGHEN, 1989; HWANG *et al.*, 1994; PEARSON *et al.*, 1994, 1995; SCHRIPSEMA *et al.*, 1996; SWIFT *et al.*, 1997; LITHGOW *et al.*, 2000; MICHELS *et al.*, 2000; DONG *et al.*, 2001; DE NYS *et al.*, 2001; MIDDLETON *et al.*, 2002), die jedoch allesamt bisher keinen Eingang in die Routineanalytik fanden. Zu Beginn der hier vorzustellenden Arbeit existierten lediglich zwei näher beschriebene und teilvalidierte Verfahren zur Analyse von HSL:

Eine GC/MS-Methode (CHARLTON *et al.*, 2000) beruht auf der Derivatisierung des  $\beta$ -Ketons von 3-oxo-*N*-Acyl-Homoserinlactonen (O-HSL, vgl. Tabelle D7) mit Pentafluorbenzylhydroxylamin zum Oxim (PFBO-Derivatisierung). Für jedes O-HSL-Derivat werden zwei chromatographische Peaks detektiert (Bildung zweier Enantiomere: CANCELLA & QUE HEE, 1992). Die Methode ist hochsensitiv (Signal-Rausch-Verhältnis  $> 10$  für 1 ng/Probe), spezifisch, und ermöglicht die Detektion der HSL im Nanomolbereich (vgl. Tabelle 1.4). Aufgrund der spezifischen Derivatisierung des  $\beta$ -Ketons ist ihre Anwendung jedoch auf O-HSL beschränkt; die aufwendige Derivatisierung (nach umfangreicher Probenvorbereitung) erschwert zudem eine schnelle *in-situ*-Analyse. Eine weitere Arbeit (MICHELS *et al.*, 2000) verwendet HPLC mit UV-Detektion; aufgrund des ungünstigen Absorptionsmaximums der HSL ( $< 200$  nm) sind für die Bestimmung der hier jedoch sehr hohe Probenkonzentrationen notwendig, die ebenfalls die Anwendbarkeit auf Spezialfälle beschränken.

Erst nach Abschluß der hier dargestellten Arbeiten zur Analytik mit Nano-LC (vgl. Abschnitt 3.3) wurde eine universaler anwendbare LC/MS-Methode für die Analytik von HSL veröffentlicht (MORIN *et al.*, 2003). Detektiert wurden unter anderem C4- bis

C14- und O-C6- bis O-C14-HSL, die Probenaufarbeitung umgeht jedoch nicht die aufwendige Extraktion mit Dichlormethan; es sind zudem relativ lange Meßzeiten zu verzeichnen (Elution von C14-HSL nach mehr als 40 min). Die Detektionslimits erreichen 0,3 (C12- und O-C10-HSL) bis 9 pmol (C4-HSL) pro injizierter Probe (20 µl dotierte Matrix); die relativen Standardabweichungen schwanken zwischen 9 und 20%.

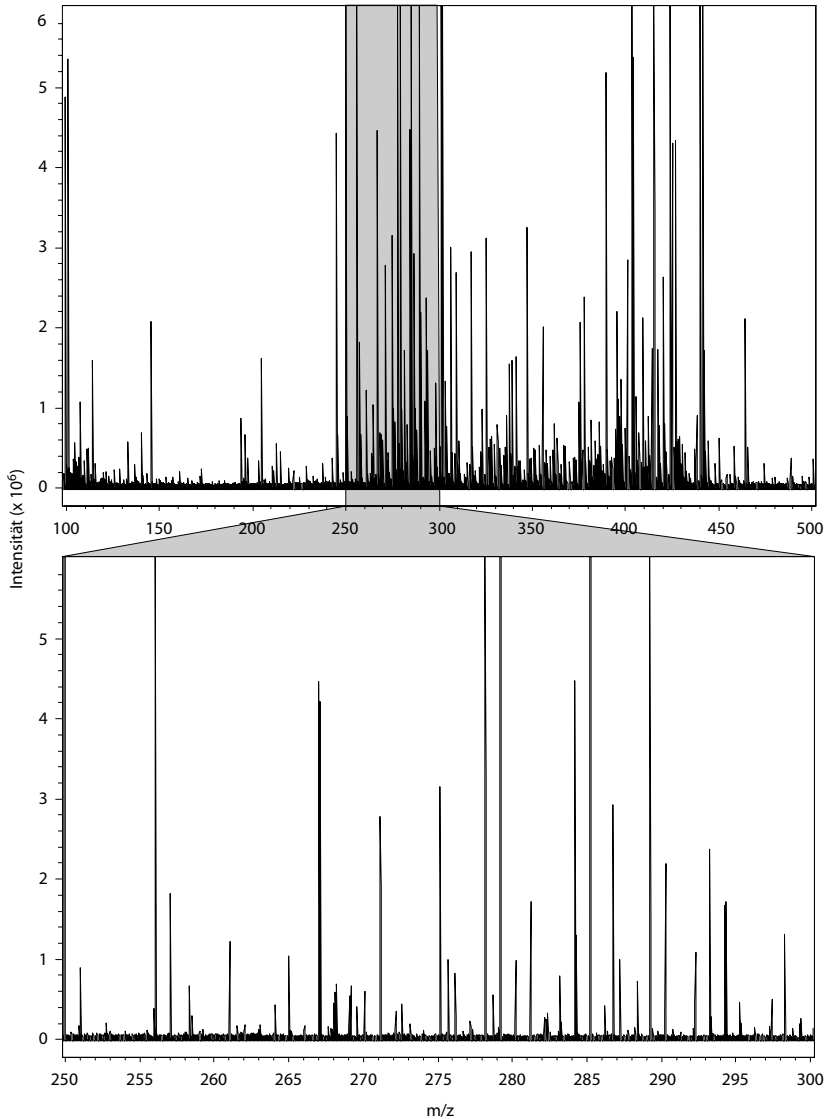
## 1.6 Analytische Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Hauptanwendung der zu entwickelnden Methoden wird zunächst in der Untersuchung von Bakterienkulturen liegen. Mikrobiologische Kulturmedien sind komplexe Mischungen (die typischerweise verwendete »Nutrient Broth«, NB, enthält 5 g/l Pepton, 3 g/l Rindfleischextrakt und 8 g/l Kochsalz), wobei die Komplexität des Mediums durch bakterielle Aktivität (Abbau des Mediums und Ausschüttung von Sekundärsubstanzen) eher noch zunehmen dürfte: Abbildung 1.6 zeigt im Vorgriff auf den Ergebnisteil die Messung eines *B. cepacia*-Kulturextraks (Isolat LA-5) mittels ESI-FTICR-Massenspektrometrie (Positivmodus, 7 T). Im Massenbereich von  $m/z$  250-300 ist nahezu jedes Masseninkrement (teilweise mehrfach) besetzt. Die hohe Komplexität der Matrix und die ungünstige Absorption der Analyten im Ultravioletten (s. o.) erfordert eine sensitive und hochspezifische Detektion; Massenspektrometrie stellt hierbei das Mittel der Wahl dar. Vor allem die Komplexität der Probe erfordert die Ausarbeitung eines geeigneten Extraktionsprotokolls, und/oder leistungsfähige Trennverfahren, um Einflüsse auf die Massenspektrometrie (Ionenunterdrückung) zu minimieren. Kritischer Punkt bei der Extraktion ist dabei der große Hydrophobizitätsbereich der Analyten (vgl. Abb. D1) und ihre strukturellen Verwandtschaft zu Matrixkomponenten (die Analyten stellen im weitesten Sinne Aminosäurederivate dar, die von den Aminosäuren und Peptiden der Matrix nach Möglichkeit abgetrennt werden müssen).

Ein Hauptschwerpunkt derzeitiger und künftiger Arbeiten an der GSF liegt in der Untersuchung der bakteriellen Kommunikation (zwischen Mikroorganismen und mit Pilzen/höheren Pflanzen); Fernziel ist daher auch die Anwendbarkeit der zu entwickelnden Methoden auf die *in-situ*-Analytik aus axenischen Wurzelkulturen oder Rhizotronen (vgl. GÖTTLEIN *et al.*, 2001). In beiden Fällen ist die Probenmenge stark limitiert und die Probe zusätzlich verdünnt; eine *offline* Aufkonzentrierung und umfangreiche Probenaufarbeitung (Derivatisierung!) ist daher kaum möglich. Vor diesem Hintergrund ist ein Schwerpunkt der Arbeit auf Techniken der online-Aufkonzentrierung zu legen, wobei allerdings davon ausgegangen werden kann, daß die Komplexität der Matrix bei den letztgenannten Realproben eine geringere Rolle spielt.

Zur Erhöhung der Aussagekraft der einzelnen Methoden wurde ein vergleichender und orthogonaler Ansatz mit verschiedenen chromatographischen und elektrophoretischen Techniken angestrebt, um die Ergebnisse jeweils gegenseitig durch unabhängige Messungen abzusichern. Die Frage nach der erforderlichen Sensitivität der zu entwickelnden Methoden ist dabei nicht ohne weiteres zu beantworten. In Tabelle 1.4 sind Literaturdaten zur HSL-Produktion (bzw. zur Induktion physiologischer Reaktionen) bei unterschiedlichen Stämme zusammengefaßt. Die Daten stammen in der Regel





**Abbildung 1.6.** Positive ESI eines *B. cepacia* LA-5-Kulturextrakt, Detektion durch 7 T-FTICR. Aufgenommener Massenbereich  $m/z$  100-500. **Oben:** Übersicht über gesamten Massenbereich. **Unten:** Ausschnitt. Im Massenbereich  $m/z$  250-300 ist nahezu jedes Masseninkrement besetzt

aus Untersuchungen von Bakterienkulturen; wenig Klarheit herrscht über die tatsächlich anzutreffenden Konzentrationen in natürlichen Habitaten. Eine gewisse Ausnahme stellen in diesem Zusammenhang die Befunde von CHARLTON *et al.* (2000) dar (nachgewiesene Konzentration 632 bzw. 40  $\mu\text{M}$  O-C12-HSL/O-C14-HSL in Biofilmen von *P. aeruginosa*). Generell läßt sich festhalten, daß die Konzentrationen an *produzierten* HSL mit wenigen Ausnahmen (Kulturüberstände von *V. anguillarum*; MILTON *et al.*, 2001) durchweg im unteren bis mittleren  $\mu\text{M}$ -Bereich liegen; bereits in sehr viel geringeren Konzentrationen (nM) erfolgt die Induktion bestimmter Enzyme *in vitro*.

**Tabelle 1.4.** Literatordaten zu Konzentrationen von N-Acyl-Homoserinlactonen. Zu den Kurzbezeichnungen vgl. Tabelle D2 bis D7.

Konzentration	Produktion/hervorgeführte Reaktion	Referenz
10/200 nM	minimale/maximale Induktion der Lumineszenz bei <i>V. fischeri</i>	KAPLAN & GREENBERG (1985)
3-8 µM	$K_d$ von OH-C4-HSL bzw.	CAO <i>et al.</i> (1995)
77/53 µM	KI von OH-C6-/OH-C7-HSL bei <i>V. harveyi</i>	
0,5/10 µM	Halbmaximale Induktion der Rhamnolipidsynthese bei <i>P. aeruginosa</i> (C4-HSL/O-C6-HSL)	OCHSNER & REISER (1995)
> 100 nM	O-C6-HSL in Lichtorganen von <i>Euprymna scolopes</i> und <i>Euprymna morsei</i>	BOETTCHER & RUBY (1995)
1 µM	Halbmaximale Induktion von <i>lasB::lacZ</i> in <i>P. aeruginosa</i>	PEARSON <i>et al.</i> (1995)
10 µM	Induktion der Chitinaseproduktion bei <i>C. violaceum</i> -Mutanten durch C6-HSL	CHEMNIN <i>et al.</i> (1998)
10 µM	Exoproteaseproduktion bei <i>A. hydrophila</i>	SWIFT <i>et al.</i> (1999)
10/5 µM	ATP- und UTP-induzierte Sekretion durch HTGS-Zellen	SALEH <i>et al.</i> (1999)
0,3/0,4 pM	(50% inhibitorische Konzentration durch C4-/C6- bzw. O-C10-/O-C6-HSL)	
1-30 µM	Kontraktion der glatten Muskulatur im Schwein durch O-C10-HSL	LAWRENCE <i>et al.</i> (1999)
1,8 µM	$K_d$ von O-C6-HSL (Rezeptor CarR) bei <i>Erwinia</i>	WELCH <i>et al.</i> (2000)
632/40 µM	Biofilme von <i>P. aeruginosa</i> (O-C12-HSL/O-C14-HSL) und	CHARLTON <i>et al.</i> (2000)
14/1,5 nM	Efflux hinaus	
8,5/9,5/0,3 nM	Kulturbedingungen von <i>V. anguillarum</i> (O-C10-/OH-C6-/C6-HSL)	MILTON <i>et al.</i> (2001)
1-5 nM	Halbmaximale Induktion von SdiA in <i>S. enterica</i> (O-C6, O-C8-HSL)	MICHAEL <i>et al.</i> (2001)
5 nM	Induktion eines <i>gfp</i> -basierten Sensorsystems	ANDERSEN <i>et al.</i> (2001)
> 20 µM	Produktion von C10-HSL durch <i>B. vietnamiensis</i>	CONWAY & GREENBERG (2002)
150 nM	O-C6-HSL bei <i>S. proteamaculans</i> ,	FLODGAARD <i>et al.</i> (2003)
3 µM	O-C6-HSL+O-C8-HSL bei <i>E. agglomerans</i>	



## 2. Analytische Techniken

Der in Abschnitt 1.6 propagierte Ansatz mit unabhängigen Methoden erfordert eine vergleichende Betrachtung der verwendeten Trenn- und Detektionstechniken. GC/EI-MS wurde im Rahmen der vorgestellten Arbeit als ergänzende Methode eingesetzt; ihre routinemäßige Verwendung seit beinahe 50 Jahren (GOHLKE & MCLAFFERTY, 1993) bietet in der Standardkonfiguration nurmehr wenige Möglichkeiten zu manuellem Eingriff und zur Optimierung. Die nachfolgenden Abschnitte konzentrieren sich daher auf wesentliche Aspekte des Elektrosprays als mittlerweile wichtigster Ionisierungstechnik in der Massenspektrometrie und einige Charakteristika miniaturisierter Systeme. Ein Schwerpunkt der Darstellung liegt bei der Kopplung der Kapillarelektrophorese zur Massenspektrometrie; ein Teil der Aspekte läßt sich hierbei (teilweise vereinfacht) auf die miniaturisierte Flüssigkeitschromatographie übertragen, da bei beiden Methoden vergleichbare Flußraten zum Einsatz kommen. Wesentliche Unterschiede sind in Abschnitt 2.3 diskutiert.

### 2.1 Elektrospray-Ionisierung

Die Elektrospray-Ionisierung (*Electrospray ionization*, ESI) hat sich im Verlauf des letzten Jahrzehnts zur bedeutendsten Ionisierungstechnik in der Massenspektrometrie entwickelt; die zugrundeliegenden Prinzipien sind jedoch bereits sehr viel länger bekannt und finden breite Anwendung bei Lackierarbeiten, der Vernebelung von Medikamenten in Inhalationsgeräten (TANG & GOMEZ, 1994), in Düsen von Raumfahrzeugen (ZAFRAN *et al.*, 1975) und in der Plasmadesorption (NCNEAL *et al.*, 1979). Der physikalische Effekt eines elektrostatischen Feldes auf eine Flüssigkeitsoberfläche wurde vermutlich erstmals im 18. Jahrhundert von Abbé Nollet im Rahmen von Versuchen zur Auswirkung von Elektrizität auf den menschlichen Körper beschrieben (FELICI, 1959); die erste theoretische Darstellung ist so alt wie die Massenspektrometrie selbst (Arbeiten von THOMSON, 1913) und geht auf ZELENY (1917) zurück. Grundlagen für die Nutzung der ESI als Ionenquelle für die Massenspektrometrie entstammen den Arbeiten von DOLE *et al.* (1968), die Weiterentwicklung (YAMASHITA & FENN, 1984; FENN *et al.*, 1989) führte zur Vergabe des Nobelpreises für Chemie im Jahr 2002 an J. B. Fenn (»Molekulare Elefanten lernen das Fliegen«: FENN, 2003).

#### 2.1.1 Theoretischer Hintergrund

Der schematische Aufbau einer ESI-Ionenquelle ist in Abbildung 2.1 dargestellt: Wird auf eine flüssigkeitsgefüllte Kapillare gegenüber einer geerdeten Gegenelektrode Hochspannung (typischerweise  $\pm 0,5\text{-}4$  kV) angelegt, bildet sich an der Spitze der Kapillare

unter dem wechselseitigen Einfluß von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und der Viskosität ein Flüssigkeitskonus (*Zeleny-Taylor Cone*, *Taylor Cone*, Taylor-Konus; theoretische Darstellung bei TAYLOR, 1964) aus, dessen Spitze sich als instabiler Bereich in einen Flüssigkeitsjet verlängert (zu dessen Radius vgl. Abschnitt 2.2.2; IKONOMOU *et al.*, 1991). Unter dem Einfluß von Viskosität und Oberflächenspannung bilden sich Sinusschwingungen aus, deren Amplitude sich mit zunehmendem Abstand vergrößert, bis einzelne, geladene Mikrotropfen gleichen Volumens (RAYLEIGH, 1945; KEBARLE, 2000) abgetrennt werden. Durch Verdampfen des Lösungsmittels vergrößert sich das Ladungs-Oberflächenverhältnis der Tropfen bis zu einem kritischen Wert (Rayleighsches Stabilitätslimit; RAYLEIGH, 1882), bei dem die Coulombsche Abstoßung die Oberflächenspannung übersteigt. Mit  $\epsilon_0$  der Durchlässigkeit des Vakuums,  $\gamma$  der Oberflächenspannung und  $R$  dem Tropfenradius errechnet sich der Ladungsüberschuß auf der Tropfenoberfläche zu

$$Q = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (2.1)$$

Nach Überschreitung des Stabilitätslimits kommt es zur asymmetrischen Desintegration (Fission) der Tropfen (Coulomb-Explosion; photographische Darstellung durch GOMEZ & TANG, 1994). Die entstehenden Mikrotröpfchen erleiden mit zunehmendem Lösungsmittelverlust weitere Fissionen, aufgrund der gleichnamigen Oberflächenladung werden sie zudem voneinander abgestoßen; es kommt zu einer Auffächerung des entstehenden Sprays (zu praktischen Konsequenzen vgl. Abschnitt 2.2.2).

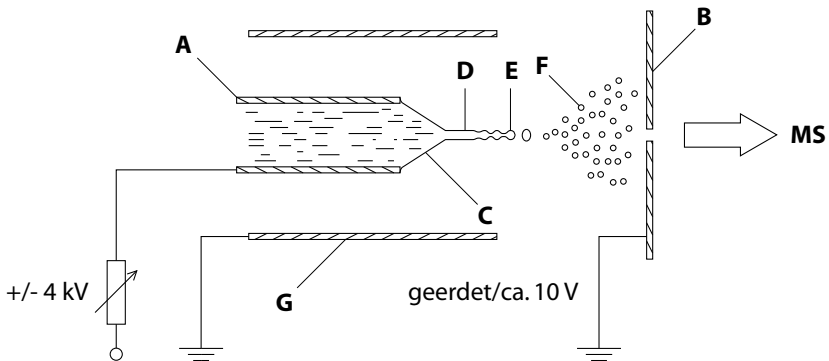
Der Stromfluß zwischen Ionisierungskapillare und Gegenelektrode ist ein Maß der verfügbaren und zu Gasphasenionen konvertierbaren Ladungen; er ist aufgrund der zunächst entstehenden Einzeltröpfchen gepulst und eine Funktion des elektrischen Feldes. Der Betrag der Stromstärke kann durch die Hendricks-Gleichung beschrieben werden:

$$I = H\nu\sigma E \quad (2.2)$$

wobei  $H$  eine Konstante aus Dielektrizitätskonstante und Oberflächenspannung,  $\nu$  die Flußrate,  $\sigma$  die spezifische Leitfähigkeit und  $E$  das elektrische Feld.  $E$  errechnet sich aus der Spannungsdifferenz  $V$ , dem Abstand  $d$  zwischen Ionisierungsnadel und Gegenelektrode und dem Kapillarenradius  $r$ :

$$E = \frac{V}{r \ln\left(\frac{Ad}{r}\right)} \quad (2.3)$$

Die Bildung von Gasphasenionen aus Mikrotröpfchen kann sowohl durch das Ionenevaporationsmodell (IEM) als auch durch das *Charge Residue*-Modell (CRM) beschrieben werden. In der Praxis sind wahrscheinlich sowohl IEM und CRM an der Ionisierung beteiligt, wobei zu den Details und der relativen Bedeutung noch Unklarheit herrscht (CONSTANTOPOULOS *et al.*, 2000; LABOWSKY *et al.*, 2000); der jeweilige Beitrag hängt von verschiedenen experimentellen Bedingungen und den Substanzeigenschaften der Analyten (Masse, Konformation, Ladung) ab. Ein Schema der Ionenbildung in verschiedenen Größenskalen ist in Abbildung 2.2 dargestellt. In der ESI spielt neben der »reinen« Ionisierung eine Reihe elektrochemischer Prozesse eine Rolle, die



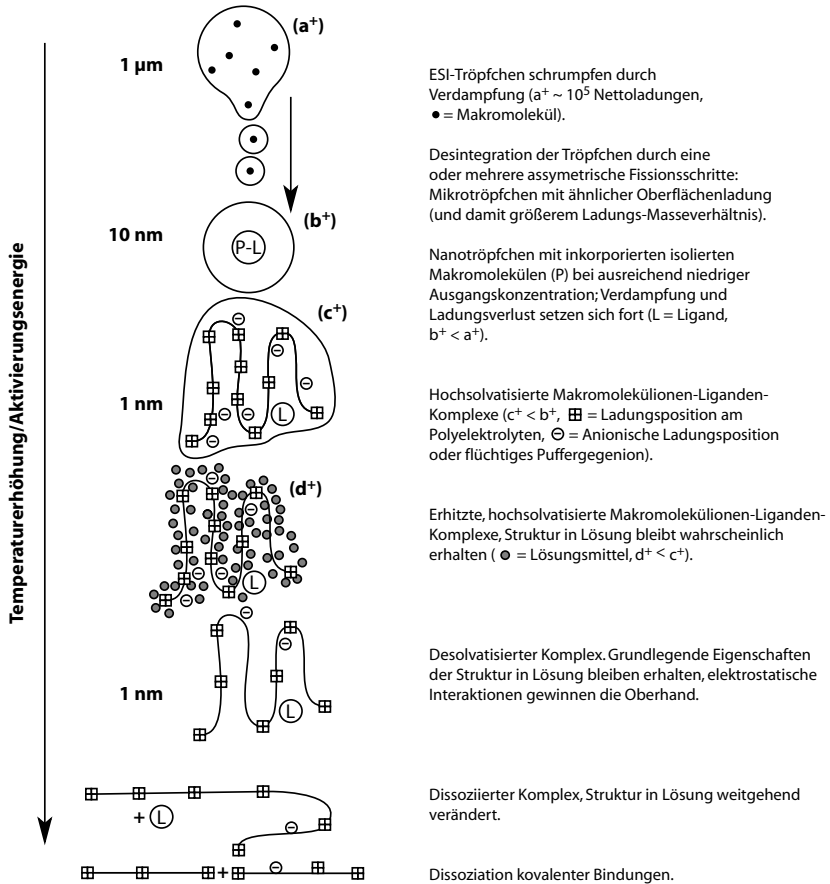
**Abbildung 2.1.** Schematischer Aufbau einer ESI-Ionenquelle. **A** flüssigkeitsgefüllte Kapillare, **B** Gegenelektrode und Eingangsöffnung des Massenspektrometers, **C** Taylor-Konus, **D** Flüssigkeitsjet, **E** Sinusschwingungen und sich bildende Tropfen, **F** Tropfenwolke (Fissionen und Abstoßung), **G** Koaxialrohr für Vernebelungsgas (optional).

oft nur schwer kontrolliert werden können (vgl. [BATEMAN, 1999](#); [SMITH & MOINI, 2001a](#); [SMITH et al., 2001b](#)) und eine Optimierung der jeweiligen Trenn- und Ionisationsbedingungen erfordern.

### 2.1.2 Praktische Realisierung

Die wesentliche Herausforderung bei der Kopplung von Flüssigtrenntechniken an die Massenspektrometrie ist die gezielte Applikation von Spannung auf den Inhalt einer oftmals isolierenden Trennkapillare. Für die Realisierung sind im wesentlichen zwei Konzepte verwirklicht (Abbildung 2.3): In *flüssigkeitsunterstützten* Systemen erfolgt die Spannungsapplikation über eine leitende Kontaktflüssigkeit; bei *flüssigkeitslosen* Systemen (*sheathless*, miniaturisiert als *nanospray*) direkt auf den Eluenten der Trennkapillare.

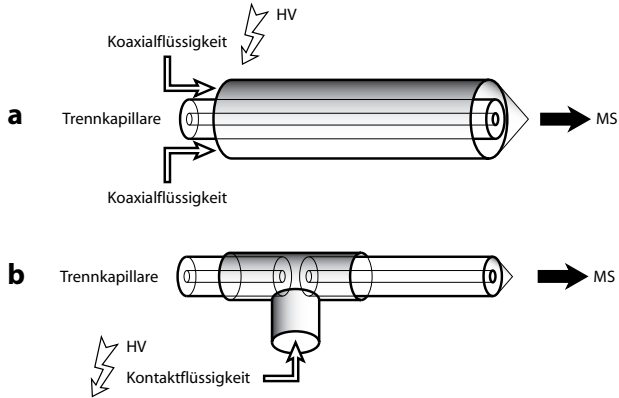
Das am häufigsten verwendete System bedient sich einer Kontaktflüssigkeit geeigneter Viskosität und Leitfähigkeit (*sheath-flow*, *sheath liquid*), die durch eine koaxial zur Trennkapillare angeordneten Nadel bereitgestellt wird (externe Pumpe oder hydrodynamischer Fluß) und sich mit dem Eluenten direkt im Taylor-Konus mischt. Die Spannung wird dabei in der Regel auf die Koaxialnadel appliziert. Hauptsächlich bei höheren Flußraten (wie in der LC/MS) kann das *sheath liquid*-System durch ein weiteres Koaxialrohr umgeben sein, durch das Vernebelungsgas (*sheath gas*) strömt. Flüssigkeitsbrücken-Systeme bestehen entweder in einfachen, distal zum Kapillarenende angebrachten T-Stücken, durch die Kontaktflüssigkeit beigemischt wird, oder in mehr oder weniger aufwendigen Mikrodialyseeinrichtungen oder Kapillaren mit geätzten (und damit spannungsdurchlässigen) Bereichen. Die direkte Spannungsapplikation in Systemen ohne Kontaktflüssigkeit wird in der Regel durch Kopplung der Trennkapillare an



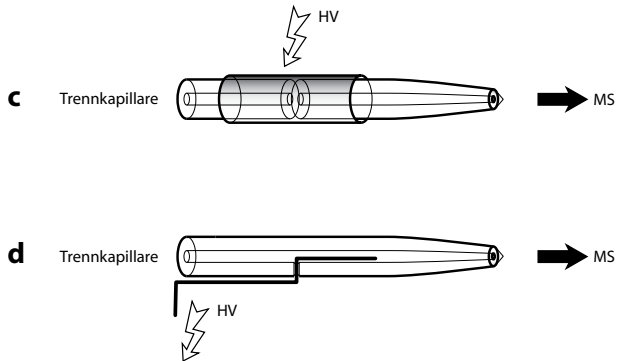
**Abbildung 2.2.** Mechanismus der Ionenbildung in der ESI. Mit zunehmender Energie geht Lösungsmittel und überschüssige Ladung verloren. Der Verlust höherer Struktur und nichtkovalenter Assoziationen (z. B. mit dem Liganden L) hängt primär mit dem Ausmaß der energetischen Aktivierung und der Ladungsabstoßung zusammen (nach SMITH, 2000b, verändert).



## Flüssigkeitsunterstützte Systeme



## Direkte Spannungsapplikation



**Abbildung 2.3.** Typen von ESI-Interfaces. **a**) System mit Koaxialflüssigkeit (*sheath liquid*): Spannungsapplikation über äußeres Metallrohr und Kontaktflüssigkeit auf das Ende der Trennkapillare (Typischer Durchmesser ca. 1 mm). **b**) Flüssigkeitsbrücke (*liquid junction*): Spannungsapplikation distal zum Kapillarenende. **c**) *Sheathless*-System (hierzu *Nanospray*): Spannungsapplikation distal zum Kapillarenende oder über konduktive Beschichtung der Ionisierungsnadel. **d**) Spannungsapplikation über Platinelektrode in der Trennkapillare (*in-column*-Elektrode). Abbildung nach SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER (2003), verändert.

**Tabelle 2.1.** Einteilung der HPLC-Modi nach dem Säulennendurchmesser (nach [ABIAN, 1999](#), verändert).

	Bezeichnung	Innendurchmesser	Flußrate
<b>Normale Säulen</b>	Präparativ	> 4,6 mm	> 3 ml/min
	Analytisch	3-4,6 mm	0,5-3 ml/min
	<i>Narrow Bore</i>	1-2 mm	0,02-0,3 ml/min
<b>Kapillarsäulen</b>	Mikro-LC	0,15-0,8 mm	2-20 µl/min
	Nano-LC	20-100 µm	0,1-1 µl/min

metallbeschichtete, Ganzmetall- oder leitfähige Polymernadeln oder durch Einführen einer Platinelektrode in die Trennkapillare erreicht (für eine Übersicht zu Entwicklungen in der Ionisierung nach der CE vgl. Tabellen [E1](#) und [E2](#) im Anhang).

Flüssigkeitsunterstützte Ionenquellen bieten die Möglichkeit (vor allem in der CE), Einschränkungen in der massenspektrometrischen Kompatibilität des Eluenten zu umgehen und die Leitfähigkeit oder Oberflächenspannung einzustellen; andererseits wird durch die zusätzliche Flüssigkeit der Eluent verdünnt, die Flußrate erhöht, und damit die Sensitivität negativ beeinflusst (siehe Abschnitt [2.2.2](#)). Stabile ESI-Bedingungen erfordern die Optimierung einer Reihe von Parametern wie der Position der Kapillare, der Flußrate und Zusammensetzung der Kontaktflüssigkeit, dem Gasfluß und der Spannung ([GALE & SMITH, 1993](#)). Es ist allerdings nicht ohne weiteres davon auszugehen, daß z. B. experimentelle Parameter, die optimale Stabilität im Stromfluß gewährleisten, auch optimale Sensitivität und Auflösung bieten ([VARGHESE & COLE, 1993](#)).

## 2.2 Charakteristika miniaturisierter Systeme

Neben der in Abschnitt [1.6](#) angesprochenen Forderung nach minimalen Probenvolumina spricht eine Reihe chromatographischer und massenspektrometrischer Aspekte für die Verwendung miniaturisierter Trennverfahren. Während die Kapillarelektrophorese und die Gaschromatographie bereits *per se* miniaturisierte Techniken darstellen, haben sich Kapillar- und Nano-LC erst im Verlauf der letzten Jahre entwickelt; die Mehrzahl der LC/MS-Anwendungen in der Literatur bis 1997 (82%) verwenden konventionelle oder *Narrow Bore*-Säulen ([ABIAN, 1999](#)). Für die Einteilung der HPLC-Systeme existieren unterschiedliche Vorschläge ([CHERVET et al., 1996](#); [TOMER et al., 1994](#)); die folgende Darstellung richtet sich nach [ABIAN \(1999\)](#) und ist in [Tabelle 2.1](#) zusammengefaßt.

### 2.2.1 Miniaturisierte Chromatographie

Konventionelle LC kann mit der ESI entweder über Flußsplitter oder unter Verwendung angepaßter Interfaces gekoppelt werden (Flußraten von bis zu 2 ml/min: [HOPFGARTNER et al., 1993b](#)). Obwohl ein Splitting unvermeidliche Verluste an Probenmaterial mit sich bringt, sind jedoch auch bei Anwendung dieser *megaflow*-Einrichtungen

**Tabelle 2.2.** Charakteristika von HPLC-Säulen unterschiedlicher Innendurchmesser und einer gemeinsamen Länge von 25 cm. (nach TOMER *et al.*, 1994 aus ABIAN, 1999; verändert). **ID** Innendurchmesser, **V** Säulenvolumen, **V<sub>inj</sub>** Typisches Injektionsvolumen, **C<sub>rel</sub>** Relative Konzentration am Detektor, **K<sub>bel</sub>** Relative Beladungskapazität. Zu Details vgl. Text.

ID	V	FR	V <sub>inj</sub>	C <sub>rel</sub>	K <sub>bel</sub>
4,6 mm	4,1 ml	1 ml/min	100 µl	1	8469
2,0 mm	783 µl	0,2 ml/min	19 µl	5,3	1598
1,0 mm	196 µl	47 µl/min	4,7 µl	21,2	400
320 µm	20 µl	4,9 µl/min	485 nl	206	41
50 µm	490 nl	120 nl/min	12 nl	4859	1

keinen nennenswerten Sensitivitätsgewinne zu verzeichnen. Eine Verringerung des Säulendurchmessers führt in der Chromatographie unmittelbar zu einer Erhöhung der Probenkonzentration im Detektor - die maximale Peakkonzentration  $C_{\max}$  errechnet sich gemäß PURNELL (1962) zu

$$C_{\max} = \frac{mN^{1/2}}{(2\pi)^{1/2}V_0(1+k)} \quad (2.4)$$

$C_{\max}$  hängt damit von der Absolutmenge an Probe  $m$  und der Säuleneffizienz  $N$  ab, und ist indirekt proportional zum Totvolumen  $V_0$  und dem Retentionsfaktor  $k$ . Da  $V_0$  eine Funktion des Innendurchmessers der Säule darstellt, errechnet sich das Verhältnis der  $C_{\max}$ -Werte zweier Säulen aus den Quadratwurzeln ihrer Innendurchmesser (Beispiele in Tabelle 2.2). Nur durch die Reduktion des Innendurchmessers auf etwa ein Zehntel (4,6 mm/320 µm) kann damit die theoretische Konzentration im Detektor um mehr als zwei Größenordnungen erhöht werden.

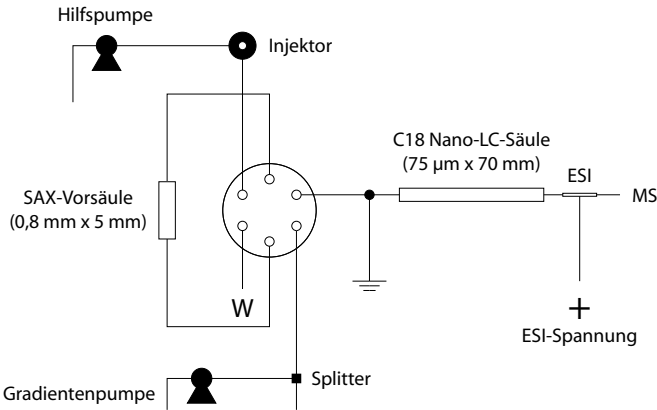
Die Detektionslimits, die durch eine Erhöhung der maximalen Peakkonzentration und die Senkung der Flußrate (siehe Abschnitt 2.2.2) erreicht werden können, sind in der Praxis durch das optimale Injektionsvolumen und die Beladungskapazität der verwendeten Säule beschränkt. Beide Größen reduzieren sich in der Theorie proportional zum Quadrat des Säulendurchmessers. Für Durchmesser  $< 1$  mm liegt das Injektionsvolumen damit  $< 1$  µl; derart geringe Mengen limitieren den Einsatz normaler Injektoren. Eine Lösung des Problems besteht im Einsatz von Vorsäulen zur Probenaufkonzentrierung (Abbildung 2.4), im Ergebnisteil ist ein System zur online-Aufkonzentrierung durch Injektion einer Probenzone geringerer elutroper Stärke vorgestellt.

### 2.2.2 Miniaturisierung und Elektrospray

Im Gegensatz zu *konzentrationsabhängigen* Detektoren (z. B. UV), bei denen das Detektorsignal (Response,  $R$ ) direkt proportional zur Probenkonzentration  $C_{\max}$  ist

$$R \propto C_{\max} \quad (2.5)$$

handelt es sich beim Massenspektrometer (wie auch bei der Flammenionisation oder



**Abbildung 2.4.** Typische Konfiguration eines Standard-Nano-LC-Systems für die Proteinanalytik mit zwischengeschalteter Vorsäule zur Probenaufkonzentrierung (Injektion größerer Volumina möglich). Abbildung nach OOSTERKAMP *et al.* (1998a) aus ABIAN (1999); verändert.

der amperometrischen Detektion) *theoretisch* um ein massenflußabhängiges System, d. h. das Detektorsignal ist proportional zu der Menge an Substanz, die pro Zeiteinheit den Detektor passiert. Gleichung 2.5 ist daher um die Flußrate  $F$  und einen eventuell zu verwendenden Splitfaktor  $S$  zu erweitern:

$$R \propto C_{\max}FS \quad (2.6)$$

In der Konsequenz sollte das Detektorsignal im Massenspektrometer nicht proportional zur maximalen Peakkonzentration zunehmen und die Verringerung der Flußrate bei niedrigerem Durchmesser zunächst theoretisch auf Kosten des Sensitivität gehen (vgl. HOPFGARTNER *et al.*, 1993b). In sehr vielen Fällen ergibt sich in der praktischen Anwendung jedoch ein gegensätzliches Bild (vgl. u. a. OOSTERKAMP *et al.*, 1998b; BANKS, 1996): So sinkt das Detektorsignal bei einer Erhöhung der Flußrate von 1 µl auf 1 ml um 30%, obwohl im letzteren Fall die 1000fache Probenmenge verbraucht wird (BANKS, 1996). Die Erklärung für dieses Phänomen liegt in der sehr unterschiedlichen Effizienz in der Ionenproduktion und der Anzahl an Ionen, die nach der ESI tatsächlich ins Massenspektrometer gelangt (HOPFGARTNER *et al.*, 1993a); beide Parameter sind bei niedrigen Flußraten erhöht. Im Ergebnis kann sich daher der *theoretisch* massenflußabhängige Detektor ESI-MS (bzw. IonSpray-MS) *praktisch* wie ein konzentrationsabhängiger Detektor verhalten (BRUINS, 1991; HOPFGARTNER *et al.*, 1993b,a); bzw. kann bei reduzierter Flußrate sogar ein überproportional erhöhtes Detektorsignal beobachtet werden.

In der Elektrospray-Ionisierung hängt die Anzahl an Ionen, die ins Massenspektrometer gelangt (*sampling efficiency*) stark vom Durchmesser der produzierten Tröpfchen-

wolke (vgl. Abschnitt 2.1.1) ab: die Abstoßung der einzelnen Tröpfchen limitiert die maximale Dichte an Ladungsträgern im Spray; bei hohen Flußraten steigt damit, vollständige Ionisierung vorausgesetzt, ihr Durchmesser. Eine theoretische Betrachtung (SMITH *et al.*, 1990a) geht für ein klassisches Elektrospray-Interfache (3–6  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) von einer Gesamtionenausbeute von 1/100 000 aus; von den produzierten Ionen gelangt lediglich 1/10 000 tatsächlich zum Massenspektrometer. Niedrigfluß-ESI-Nadeln können sehr viel dichter am MS positioniert werden, weitere Optimierungsschritte umfassen die verwendeten Flußraten und die Durchmesser der Ionisierungsnadeln (KEBARLE & TANG, 1993). Eine formelmäßige Beschreibung der Tröpfchenbildung in der ESI wurde durch WILM & MANN (1994) vorgenommen. Hiernach errechnet sich der Radius der Region der Tröpfchenbildung an der Spitze des Taylor-Konus (Durchmesser des Flüssigkeitsjets, vgl. Abschnitt 2.1.1),  $r_e$ , zu

$$r_e = \left\{ \frac{\rho}{4\pi^2\gamma \tan\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \left[\left(\frac{U_T}{U_A}\right)^2 - 1\right]} \right\}^{\frac{1}{3}} \left(\frac{dV}{dt}\right)^{\frac{2}{3}} \quad (2.7)$$

mit  $\gamma$  der Oberflächenspannung der Lösung,  $\theta$  dem Spraywinkel (im üblichen Fall gilt  $\theta = 49,3^\circ$ ),  $\rho$  der Dichte der Lösung,  $U_T$  der Grenzspannung (*threshold voltage*),  $U_A$  der tatsächlich angelegten Spannung und  $\frac{dV}{dt}$  der Flußrate. Wird die Flußrate gesenkt, werden als Konsequenz des verringerten  $r_e$  kleinere Tröpfchen emittiert, die aufgrund ihres höheren Oberflächen-/Volumenverhältnisses die Desorption der Ionen in die Gasphase erleichtern. Um die Stabilität des Taylor-Konus zu gewährleisten, sollte der Kapillarendurchmesser parallel zur Flußrate reduziert werden. Beispiele für miniaturisierte Ionisierungssysteme sind in Abschnitt 2.1.2 vorgestellt; durch Verwendung eines entsprechenden *Nanospray*-Systems kann die Ionenausbeute auf bis zu 1/390 gesenkt werden (WILM & MANN, 1996). Der universellen Verwendung von *Nanospray*-Systemen stehen jedoch in der praktischen Anwendung vor allem in der CE Hindernisse entgegen, die sich unter anderem in der Anzahl der entsprechenden Literaturzitate niederschlagen (vgl. Anhang E).

### 2.3 Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie

Seit ersten Versuchen zu Beginn der 1980er Jahre und der ersten Publikation von OLIVARES *et al.* (1987) wurde die Kapillarelektrophorese (CE) an verschiedene Massenspektrometersysteme gekoppelt. Tabelle E1 gibt einen Überblick über wichtige Übersichtsartikel zum Thema, in Tabelle E2 (jeweils im Anhang) ist die historische Entwicklung zusammengefaßt. Für die CE/MS-Kopplung kamen Magnetsektor- (PERKINS & TOMER, 1994), Quadrupol-, Ionenfallen- (MARCH, 1997), Flugzeit- (CHERNUSHEVICH *et al.*, 2001) und Fourier-Transform-Ionencyclotron-Massenspektrometer (MARSHALL, 2000; SEVERS *et al.*, 1996a; HOFSTADLER *et al.*, 1993, 1994, 1996a,c) zum Einsatz. Anhang E und die Tabellen E3 bis E11 geben einen Überblick über die Anteile der einzelnen Gerätetypen an veröffentlichten CE/MS-Applikationen. Die verwendeten Ionisierungssysteme umfassen CFAB (REINHOUD *et al.*, 1990; VERHEIJ *et al.*,

1991), Laserverdampfung (CHANG & YEUNG, 1997) und *sonic spray* (HIRABAYASHI *et al.*, 1999); offensichtlich konnte sich jedoch keine dieser Techniken routinemäßigen Analytik durchsetzen: Ausnahmslos alle im Rahmen einer umfangreichen Literaturrecherche bis zum Jahr 2003 erfaßten Applikationen verwenden eine Form des Elektrosprays. Eine Sonderrolle spielt hier die CE/MALDI-Ionisierung (vgl. FORET & PREISLER, 2002a; GUSEV, 2000; MURRAY, 1997), die jedoch kein *online*-System im engeren Sinn darstellt.

Die CE/MS weist einige zentrale Charakteristika auf, die sie von der mehr routinemäßig verwendeten LC/MS unterscheidet, und die für einen erfolgreichen Betrieb berücksichtigt werden müssen. Im Gegensatz zu letzterer liegen die Injektionsvolumen in der CE im Nanoliterbereich; das tatsächlich injizierte Volumen stellt eine Funktion des angelegten Drucks, der Kapillarendimensionen und der Pufferviskosität dar. Es existiert in üblicherweise verwendeten Instrumenten keine Möglichkeit zur Injektion absoluter Volumina (wie durch Mikroliter-Injektionsschleifen in der HPLC). Die Flußrate in der CE liegt im Bereich von ca. 150 nl/min bis ca. 2 µl/min (vgl. Tabelle 2.4), ist variabel, und hängt von der Zusammensetzung des Trennpuffers sowie der Behandlung der Kapillaroberfläche ab (es existiert kein konstanter, pumpengetriebener Fluß wie in der HPLC).

### 2.3.1 Hydrodynamische Injektion

Die hydrodynamische Injektion ist (im Gegensatz beispielsweise zur elektrokinetischen Injektion) die am häufigsten angewandte Probenaufgabetechnik in der CE. Sie kann durch eine Variante der Hagen-Poiseuille-Gleichung (mit  $\Delta P$  dem Druckabfall in Pa,  $d$  dem Kapillarrinnendurchmesser,  $t$  der Zeit,  $\eta$  der Viskosität und  $L$  der Kapillarlänge) beschrieben werden:

$$V_{\text{inj}} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} 10^3 \quad (2.8)$$

Übermäßig lange Injektionszeiten (mit Probenzonen von  $\gg$  3-4% der Kapillarlänge) resultieren in der CE in einer Verzerrung der Signale, da die Probenzonen vor der Detektion nicht vollständig getrennt werden können. Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht über Injektionszeiten und Probenvolumina. Eine Beachtung ist insbesondere bei der Übernahme von Literaturmethoden (mit unterschiedlichen Injektionsdrucken und Kapillarendurchmessern) von Bedeutung. Identische Injektionszeiten mit unterschiedlichen Säulendurchmessern führen nicht nur zu unterschiedlichen Probenvolumina, sondern auch zu unterschiedlichen *lokalen Konzentrationen* im Detektor (für die Bedeutung in der Massenspektrometrie vgl. Abschnitt 2.2.2).

### 2.3.2 Elektroosmose

Im Regelfall bildet eine feste Oberfläche bei Kontakt mit einer Elektrolytlösung eine Nettoladung aus, die z. B. durch Ionisierung der funktionellen Gruppen auf der

**Tabelle 2.3.** Effekt der Säulenlänge (Innendurchmesser 50  $\mu\text{m}$ ) auf das Gesamtvolumen (**GV**) und das Injektionsvolumen (**IV, oben**) sowie die damit korrespondierende Probenmenge (**unten**) in der CE bei 10 s Injektion (0,5 psi) eines Analyten mit 300 g/mol und einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$ .

	ID 50 $\mu\text{m}$		ID 75 $\mu\text{m}$		ID 100 $\mu\text{m}$	
<b>Säulenlänge</b> [cm]	<b>GV</b> [ $\mu\text{l}$ ]	<b>IV</b> [nl]	<b>GV</b> [ $\mu\text{l}$ ]	<b>IV</b> [nl]	<b>GV</b> [ $\mu\text{l}$ ]	<b>IV</b> [nl]
40	0,8	16,6	1,7	84	3,1	264
50	1	13,2	2,2	67	3,9	211
60	1,2	11	2,6	56	4,7	176
70	1,4	9,5	3,1	48	5,4	151
80	1,6	8,3	3,5	42	6,3	132
90	1,8	7,3	3,9	37	7,1	117
<b>Säulenlänge</b> [cm]	<b>Menge</b> [fmol]	[pg]	<b>Menge</b> [fmol]	[pg]	<b>Menge</b> [fmol]	[pg]
40	55	16,6	280	84	883	264
50	44	13,2	224	67	706	211
60	37	11	186	56	589	176
70	32	9,5	159	48	504	151
80	28	8,3	140	42	441	132
90	25	7,3	124	37	392	117

Oberfläche, Adsorption von Ionen oder durch Lösungseffekte bewirkt wird; die Oberflächenladung ist eine thermodynamische Eigenschaft der jeweils beteiligten Partner (RUSSEL *et al.*, 1989; ISRAELACHVILI, 1992).

Bei einer *fused silica*-Kapillare kommt es bei alkalischem pH des Kapillareninhalts zur Deprotonierung der Silanolgruppen auf der Oberfläche ( $\text{pK}_a$  je nach Charge zwischen 3 und 5) zu Silanationen ( $\text{SiO}^-$ ), an die sich Pufferkationen anlagern und eine vergleichsweise immobile, monomolekulare Schicht (Stern-Schicht) ausbilden. Die Stern-Schicht wird durch überschüssige, solvatisierte Ionen überlagert (diffuse Schicht, Gouy-Schicht), die sich in Richtung der Kapillarenachse ausdehnt. Die Konzentration von Ionen in der Doppelschicht, und korrespondierend hierzu das (ladungsdichteabhängige) elektrische Potential, fällt von der Kapillaroberfläche in Richtung der Kapillarachse exponentiell ab. Das elektrische Potential an der Grenze zwischen der Stern- und der Gouy-Schicht wird als Zeta-Potential bezeichnet, sein Wert liegt bei 0-100 mV.

Die entstehende Potentialverteilung kann theoretisch durch das Gouy-Chapman-Modell (analog zum Debye-Hückel-Modell) durch Vereinigung der Energieverteilung nach Boltzmann und der Poisson-Gleichung (Beziehung zwischen Potential und Ladungsdichte; VERWEY & OVERBEEK, 1948) beschrieben werden (FISCHER & KENNDLER, 1997). Für eine flache Oberfläche errechnet sich das Potential  $\psi$  im Abstand  $x$  von der Oberfläche (mit  $\psi_0$  dem Potential für  $x = 0$ ) zu

$$\psi = \psi_0 e^{-\kappa x} \quad (2.9)$$

wobei

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi n z^2 e^2}{\epsilon k T}} \quad (2.10)$$

mit  $n$  der Anzahl an Ionen,  $z$  ihrer Valenz,  $e$  der Elementarladung,  $\epsilon$  der Dielektrizitätskonstante,  $k$  der Boltzmann-Konstante und  $T$  der Temperatur in K. Das Potential  $\psi$  fällt im Abstand  $x = \kappa^{-1}$  auf  $\psi_0/e$ ;  $x = \kappa^{-1}$  wird als Dicke der diffusen Doppelschicht oder Debye-Länge bezeichnet. Aus Gleichung 2.10 ergibt sich eine Abhängigkeit von  $\kappa^{-1}$  von der Ionenstärke  $J$  (mit  $m_i$  der Molarität der Ionen):

$$J = 0,5 \sum z_i^2 m_i \quad (2.11)$$

und damit

$$1/\kappa \sim J^{-1/2} \quad (2.12)$$

Für verdünnte Elektrolyten ( $10^{-5}$  M- $10^{-6}$  M) ergibt sich aus Gleichung 2.10 eine Dicke der Doppelschicht zwischen 1 000 und 100 nm, für konzentriertere Systeme (1 M-0,1 M) zwischen 1 und 0,1 nm.

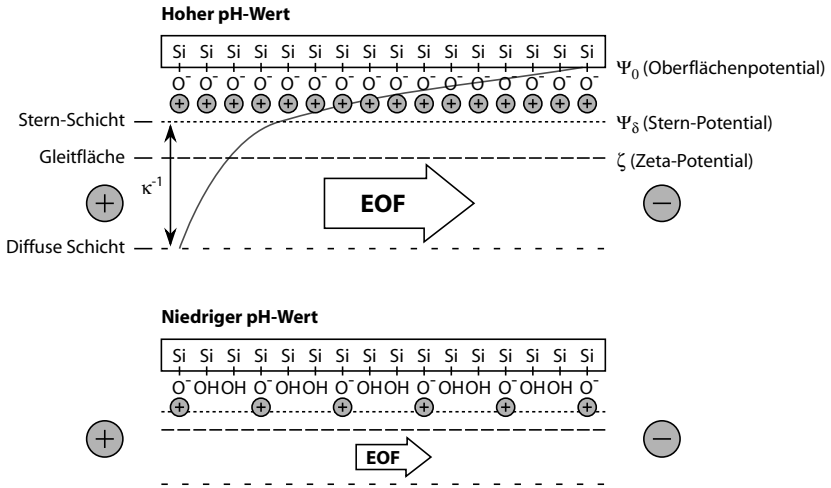
Ein extern angelegter tangentialer Fluß des Mediums entlang der Oberfläche führt zu einem *Strömungspotential*. Dieser Prozess ist auch umgekehrt möglich: Wird Spannung angelegt wird, migrieren die Gegenionen des Puffers und die solvatisierenden Wassermoleküle zur Kathode, die Bewegung von Ionen und assoziierten Wassermolekülen generiert einen Fluß der Lösung zum Detektor. Die Mobilität dieses *elektroosmotischen Flusses* (EOF),  $\mu_{eo}$ , ist direkt abhängig von der Viskosität  $\eta$  und der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ :

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (2.13)$$

Da  $\zeta$  umgekehrt proportional zur Ladung pro Flächeneinheit (Gleichungen 2.9 und 2.10), der Anzahl an Valenzelektronen und der Quadratwurzel der Elektrolytkonzentration ist, bewirkt eine Erhöhung der Elektrolytkonzentration eine Reduktion im EOF (stark an die Oberfläche adsorbierende Ionen haben denselben Effekt). Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über Flußraten in Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers und bei unterschiedlichen Mobilitäten des EOF. Bei saurem pH (vgl. Abbildung 2.5) ist das Oberflächenpotential  $\psi_0$  (und damit die Flußrate) aufgrund der zunehmenden Protonierung der Silanolgruppen stark reduziert, bei sehr niedrigen Werten kommt der EOF zu Erliegen. Anstelle der ionischen Wechselwirkung an der Oberfläche kommen bei geringem  $\psi_0$  andere Oberflächeneffekte zum Tragen (s. o.) und es kann zur Anlagerung von organischen Ionen oder Komplexen an die Kapillaroberfläche kommen.

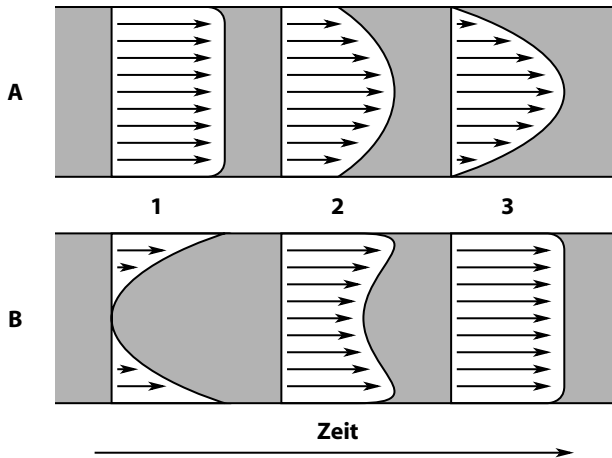
Eine wichtige Konsequenz der Tatsache, daß der Fluß in der CE aus einer Mobilitätsänderung an der Oberfläche der Kapillare zustandekommt, ist das resultierende Strömungsprofil (Abbildung 2.6): Während in der (pumpengetriebenen) HPLC durch Scherkräfte an der Säulenwand ein hyperbolischer Fluß entsteht, halten sich in der CE





**Abbildung 2.5.** Ausprägung der elektrischen Doppelschicht in einer *fused silica*-Kapillare bei hohem und niedrigem pH-Wert. Zu Details vgl. Text. Abbildung nach SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER (2003), verändert.

Reibung und die treibende Kraft des EOF die Waage; das Flußprofil in der CE ist daher im Idealfall sehr viel flacher. Hieraus resultiert eine sehr viel höhere Auflösung (aufgrund geringerer Radialdiffusion) benachbarter Peakpaare und damit eine sehr viel höhere theoretische Bodenzahl.



**Abbildung 2.6.** Flußprofile in der HPLC (A) und in der CE (B). Zu Details vgl. Text.

**Tabelle 2.4.** Flußraten in der Kapillarelektrophorese mit Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers und bei unterschiedlichen Mobilitäten des EOF ( $t_{\text{eof}}$ , siehe Text). ID Innendurchmesser

$t_{\text{eof}}$ [min]	ID 100 $\mu\text{m}$ [nl/min]	ID 75 $\mu\text{m}$ [nl/min]	ID 50 $\mu\text{m}$ [nl/min]	ID 20 $\mu\text{m}$ [nl/min]
2,0	1964	1105	491	79
2,5	1571	884	393	63
3,0	1309	736	327	52
3,5	1122	631	280	45
4,0	982	552	245	39
4,5	873	491	218	35
5,0	785	442	196	31
5,5	714	402	178	29
6,0	655	368	164	26
6,5	604	340	151	24

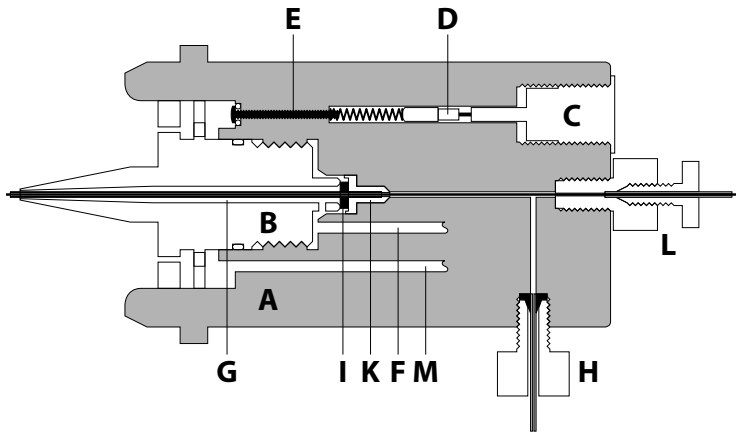
## 3. Experimenteller Teil

### 3.1 Neukonstruktion der Elektrospray-Ionisierungseinheit

Die Motivation zur vollständigen Neukonstruktion der Elektrospray-Ionisierungseinheit entstammte den konzeptuellen sowie operationellen Unzulänglichkeiten der vorhandenen Ionenquelle des Massenspektrometers (Abbildung 3.1). Ein Hauptnachteil der meisten kommerziell erhältlichen Konstruktionen ist die Verwendung *proprietärer*, d. h. hochpreisiger und mitunter patentgeschützter Bauteile; in der Regel sind diese Anordnungen zudem auf *eine* Analysemethode beschränkt, d. h. sie erlauben entweder *nur Sheathless*-Betrieb, *nur* Betrieb mit Koaxialflüssigkeit oder *nur* Nanospray und dies zudem entweder *nur* in orthogonaler oder *nur* in koaxialer Anordnung.

Die eigentliche Ionisierungsnadel wurde in der bestehenden Konfiguration in einem massiven Kunststoffblock montiert, der wiederum durch ein Metallgehäuse am Massenspektrometer fixiert war. Diese Bauart erlaubt lediglich eine axiale Ausrichtung der Ionisierungseinheit, und dies in nur drei Stufen; eine visuelle Kontrolle und Optimierung des entstehenden Sprays ist nicht möglich. Bereits vor Beginn der hier vorgestellten Arbeiten wurde die Ionisierungseinheit daher modifiziert: Das Metallgehäuse wurde entfernt und durch eine horizontale Plattform (vgl. auch Abbildung 3.5) ersetzt. Die Ionenquelle wurde durch eine mit Mikrometerschrauben in horizontaler, vertikaler und axialer Richtung bewegliche Justiereinheit axial vor dem Eingang des Massenspektrometers befestigt. Zur Kontrolle des gebildeten Sprays diente eine CCD-Kamera mit Mikroskopobjektiv. Die beschriebene Konfiguration ist ausführlich bei SCHMITT-KOPPLIN (2002) dokumentiert.

Trotz der hierdurch erzielten Verbesserungen bestand vor allem hinsichtlich der Methodenflexibilität weiterhin Optimierungsbedarf. Durch die Verwendung des Kunststoffblocks ist man weiterhin auf die *Sheath liquid*-Ionisierung beschränkt, darüberhinaus ergaben sich weitere Unzulänglichkeiten: Vor allem in der CE ist es erforderlich, die ESI-Spannung erst dann anzulegen, wenn die Trennspannung bereits appliziert ist, um einen reversen EOF (vgl. Abschnitt 2.3.2) und hierdurch einen unreproduzierbaren Verlust an Probenmaterial zu verhindern. Hierdurch kommt es in dem vorhandenen Interface sehr häufig zu einem Zurückfließen der Kontaktflüssigkeit in den Metallkonus (Abbildung 3.1 B bzw. G). Wird Spannung angelegt, wandert die überschüssige Flüssigkeit an die Spitze der Ionisierungsnadel und führt zu Unregelmäßigkeiten im Flüssigkeitsstrom. Unvermeidbare Undichtigkeiten (vor allem in der Dichtung der Ionisierungsnadel und unter Druck beim Spülen der Zuleitung; vgl. Abbildung 3.1 K und Abschnitt 3.1.3) verursachen Kriechströme, die die Ionisierung nahezu zum Erliegen bringen. Ziel der Überlegungen war daher die Schaffung einer flexiblen, einfach zu konstruierenden und zu bedienenden Basiseinheit, die den Betrieb in unterschiedlichen ES-



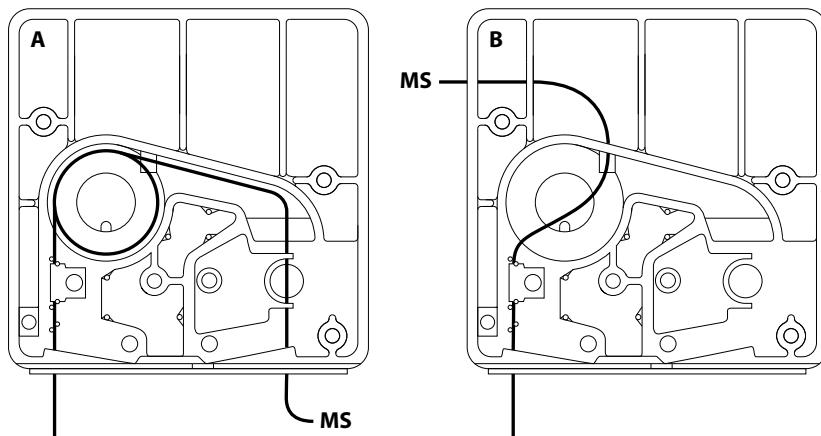
**Abbildung 3.1.** Zu Beginn der Arbeit existierende Ionenquelle der Firma Thermoquest (triaxiale Anordnung mit Koaxialflüssigkeit, Koaxialgas und Hilfsgas). In einem Polymerblock (PEEK, **A**) wird der Ionisierungskonus (Edelstahl, **B**) eingeschraubt. Die Hochspannung wird über einen Stecker (**C**) zugeführt und hat über einen Widerstand (**D**, 15 k $\Omega$ ), eine Schraube mit Feder (**E**) und eine weitere Feder (nicht dargestellt) Kontakt mit **B**. Vernebelungsgas (**F**, Zuleitung nicht dargestellt, aber analog zu **H**) wird durch einen koaxial zur Ionisierungsnadel angeordneten Kanal (**G**) bis an die Spitze der Ionisierungsnadel geführt. Die Kontaktflüssigkeit wird über den Anschluß **H** in die in **A** befestigte Spritzennadel (22 ga) **I** geleitet, die Nadel ist gegenüber **G** mit einem Teflonring (**K**) abgedichtet. Die Trennkapillare wird über eine Klemmvorrichtung (**L**) axial fixiert.

Modi sowie einen möglichst raschen Austausch der verwendeten Bauteile ermöglicht. Weitere Zielsetzung war ein möglichst schneller Wechsel zwischen den Analysetechniken (Kapillarelektrophorese und Nano-LC).

### 3.1.1 Positionierung und Betrieb der CE und Nano-LC

Die durch die Herstellerfirma vorgesehene Realisierung der CE/MS-Kopplung erfolgt mittels einer unveränderten CE-Kartusche (Abbildung 3.2 A) unter Einbeziehung der vorhandenen UV-Detektion, bei der das Austrittsende der Kapillare verlängert ist und statt in ein zweites Puffergefäß aus dem Instrument heraus und direkt in die Ionenquelle geleitet wird. Die CE wird hierbei von vorne gesehen links vom Massenspektrometer positioniert. Der Hauptnachteil dieser Aufstellung besteht in der minimal verwendbaren Kapillarenlänge von 80 cm, wodurch die Laufzeiten gegenüber kürzeren Kapillaren überproportional verlängert werden; die verlängerten Analysezeiten resultieren hierdurch regelmäßig in einer Peakverbreiterung durch Lateraldiffusion.

Für den Betrieb mit einer kürzeren Kapillare (45 – 50 cm) wurden Öffnungen in die von vorne gesehen linke obere Ecke und in die Querverstrebungen der Kapillarkartusche gefräst und die Kapillare unter Umgehung der UV-Detektion nach links aus



**Abbildung 3.2.** Modifikation der Kapillarenführung für die CE/MS. **A** Originalkonfiguration, **B** Modifikationen. In die (von vorne gesehen) linke obere Ecke und in die Querverstreben der Kartusche wurde eine Öffnung gebohrt und die Kapillare in entgegengesetzter Richtung aus dem Gerät geleitet.

dem Instrument geführt. Das Massenspektrometer wurde um 180° gedreht und die CE rechts vom Instrument aufgestellt. In dieser Anordnung war eine Kühlung der Kapillare nicht mehr möglich und auch nicht mehr erforderlich, weshalb der Kühlkreislauf des Instruments stillgelegt wurde. Für die untersuchten Analyten ist eine UV-Detektion wertlos (vgl. Abschnitt 1.5).

Um einen weitestmöglich totvolumenfreien Betrieb der Nano-LC zu ermöglichen, war es erforderlich, die Zuleitung vom Injektionsventil zur Säule und von der Säule zum Interface so kurz als möglich zu halten. Daher wurde die massenspektrometerseitig vorhandene Ansteuerungsleitung aus dem Gerät heraus geführt; das Ventil wurde auf der horizontalen Plattform vertikal befestigt (vgl. Abbildung 3.5). In der Regel endete die Trennsäule mit ihrer Endfritte direkt im ESI-Interface; ventiltseitig wurde die Säule (unter Erhaltung eines maximal 10 cm langen packungsfreien Bereichs) direkt im Injektionsventil befestigt.

### 3.1.2 Aufbau der Ionisierungseinheit

In Abbildung 3.3 sind Ansätze zur Realisierung der unterschiedlicher Ionisierungsmodi unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Standardbauteilen schematisch dargestellt (vgl. auch FROMMBERGER *et al.*, 2004). Wie auch anderenorts diskutiert (SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003; HUIKKO *et al.*, 2002a), führt die Verwendung von Vernebelungsgas (*sheath gas*) in der ESI vor allem bei niedrigen Flußraten zu einer Verringerung der Sensitivität und bei Verwendung ungepackter Kapillaren

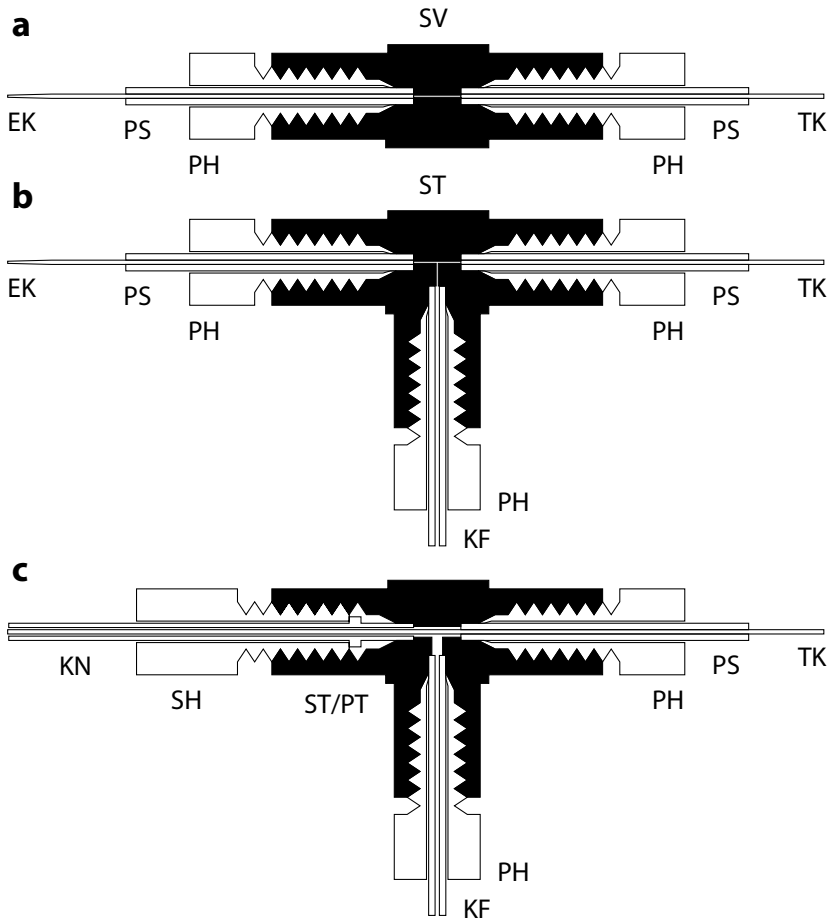
(CE) zu Saugeffekten, die das Flußprofil (vgl. Abbildung 2.6) verändern und damit die Trennschärfe verringern. In allen hier vorgestellten Ionisierungsmodi wurde daher auf eine Verwendung von *sheath gas* verzichtet.

Sowohl bei der *sheathless*-Ionisierung (Teilabbildung a und Abschnitt 3.1.4), als auch bei der orthogonalen Zuführung der Kontaktflüssigkeit (in Form einer Flüssigkeitsbrücke, Teilabbildung b) wurden englumige Ionisierungsadeln (*fused silica* mit 50 µm Innendurchmesser und 150 µm Außendurchmesser oder konische Metallkapillaren) verwendet. Die Montage erfolgte in diesen beiden Fällen in (leitenden) T- oder Verbindungsstücken aus Metall. Im Falle der Ionisierung mit Kontaktflüssigkeit (Teilabbildung a und Abschnitt 3.1.3) wurden Polymer- oder Metall-T-Stücke mit einer Kanalweite von 500 µm verwendet, die Ionisierungskanüle bestand hier in einer 22 ga HPLC-Spritzennadel. In Abbildung 3.4 ist die praktische Umsetzung dargestellt, Abbildung 3.5 zeigt eine Übersicht über das entwickelte ESI-System im praktischen Einsatz (hier mit koaxialer Flüssigkeitszuführung, vgl. auch FROMMBERGER *et al.*, 2004).

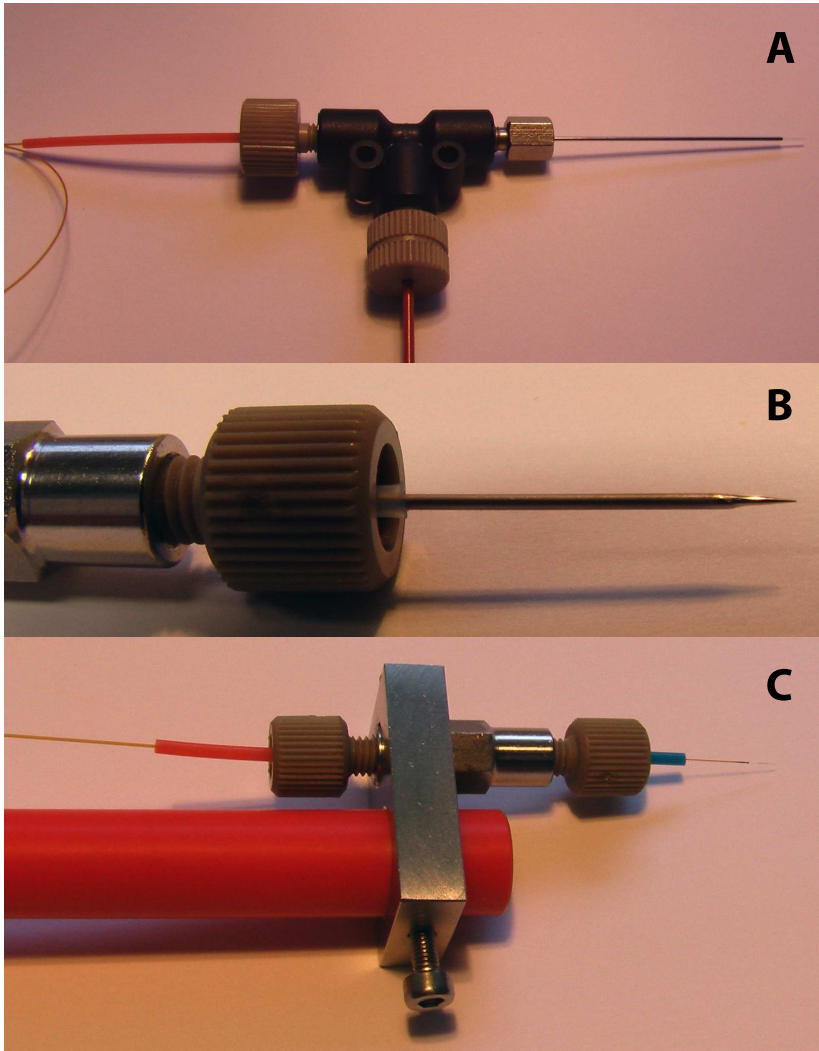
Wie in Vorversuchen festzustellen war, führt die Verwendung einer orthogonalen Flüssigkeitszuführung in der CE zu einem deutlich verlangsamten EOF, und damit zu nicht vertretbaren Verlängerungen in der Analysezeit (Lateraldiffusion und Peakverbreiterung): Im Gegensatz zu einem druckgetriebenen LC-System ist der hydrodynamische Fluß in der CE-Kapillare ein Effekt der Kapillaroberfläche (vgl. Abschnitt 2.3.2). Durch die seitliche Flüssigkeitszuführung wird zwangsläufig ein Gegendruck erzeugt (Flußrate minimal 1 µl/min!), der durch den EOF offensichtlich nicht vollständig kompensiert werden kann. In der Literatur (vgl. Abschnitt E) spielt die Flüssigkeitsbrücke bei der CE/MS-Kopplung dementsprechend auch nur eine untergeordnete Rolle (2% aller Literaturzitate). Auch in der Kopplung der LC zur Massenspektrometrie bringt das Konzept der orthogonalen Flüssigkeitszuführung keine offensichtlichen Vorteile gegenüber der koaxialen Anordnung; die folgende Darstellung konzentriert sich daher auf das Koaxial- und das *sheathless*-System.

### 3.1.3 Ionisierung mit Kontaktflüssigkeit

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Elektrospray-Ionisierung nach der LC und der CE ist die Tatsache, daß die Ionisierungseinheit in der CE (vgl. Abbildung 3.6) gleichzeitig als Gegenelektrode für die angelegte Trennungsspannung dient. Hierdurch ergeben sich sehr viel höhere Anforderungen an eine Optimierbarkeit der jeweiligen Flüssigkeitszusammensetzung, der Flußraten und der instrumentellen Parameter. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten erwies sich vor allem die Entfernung von Gasblasen aus der Zuleitung der Kontaktflüssigkeit als kritischer Punkt. Die Zuleitung (ca. 4 kV gegen Erdung) repräsentiert eine in sich abgeschlossene Elektrolysezelle, in der vor allem bei niedrigen Flüssen und höheren Spannungsbelastungen (CE) die Bildung von Gasblasen und von Elektrolyseprodukten unvermeidlich war (für eine Diskussion vgl. DE LA MORA *et al.*, 2000; VAN BERKEL, 1997). Bei der Akkumulation dieser Gasblasen kommt es mit der Zeit zu einer unregelmäßigen und unreproduzierbaren Unterbrechung des Stromflusses zwischen dem ESI-Interface und der Erdung der Kontaktflüssigkeit, die sich negativ auf die gemessenen Ergebnisse auswirkt. Um dieses Pro-

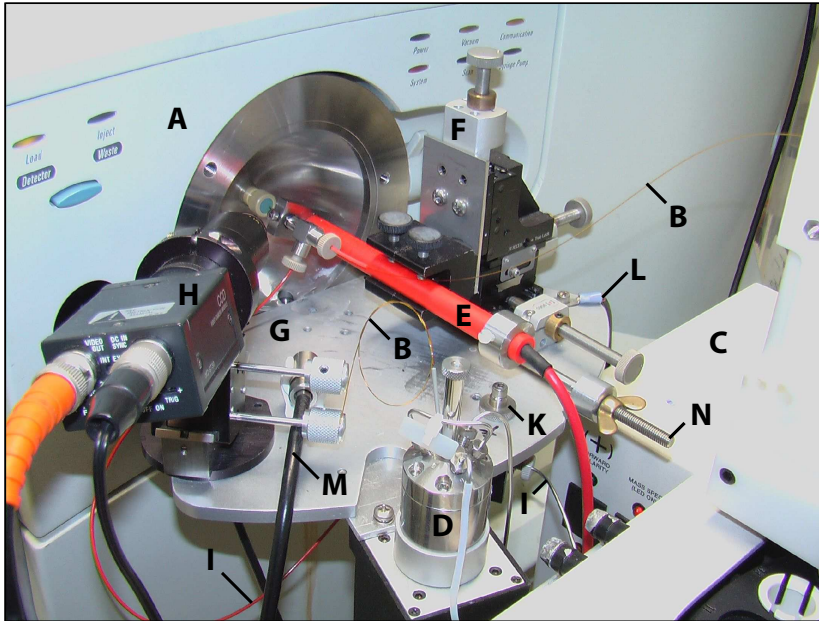


**Abbildung 3.3.** Ansätze zur Realisierung unterschiedlicher Ionisierungstechniken durch Verwendung von Standardbauteilen. **a** *Sheathless*-Einheit/Nanospray: Trennkapillare (TK) und Emittierkapillare (EK) werden durch Polymer-Schlauchstücke und Polymer-Hohlschrauben (PH) nichtleitend in einem Edelstahl-Verbindungsstück geringen Totvolumens (SV) fixiert. Die Spannungsapplikation erfolgt auf SV. **b** Flüssigkeitsbrücke/-beimischung: Abweichend von **a**) erfolgt die Montage und Spannungszuführung in einem Edelstahl-T-Stück (ST), die Kontaktflüssigkeit (KF) wird über den Seitenport zugeführt. **c** *Sheath-Liquid*-System: Wie in **b**) wird über den Seitenport eines Metall- oder Polymer-T-Stücks (ST/PT) Kontaktflüssigkeit zugeführt. Die Kontaktflüssigkeit umströmt in einer Koaxialnadel (KN) die Trennkapillare. Die Spannungsapplikation erfolgt über eine Edelstahl-Hohlschraube (SH) auf KN. Vergleiche auch FROMMBERGER *et al.*, 2004.



**Abbildung 3.4.** Praktische Umsetzung. **A** Koaxiale Zuführung von Kontaktflüssigkeit über den Seitenport eines Kunststoff-T-Stückes (vgl. Abschnitt 3.1.3), **B** *Sheathless*-Ionisierung unter Verwendung konischer Metallkapillaren (vgl. Abschnitt 3.1.4), **C** *Sheathless*-Ionisierung unter Verwendung einer 50/150  $\mu\text{m}$  *fused silica*-Kapillare und Montage in der Ionisierungseinheit.





**Abbildung 3.5.** Aufbau der entwickelten Ionisierungseinheit: **A** Massenspektrometer. Die Trennkapillaren (**B**) aus der CE (**C**) oder LC (**D**, nur Injektionsventil dargestellt) enden in der Ionisierungseinheit (**E**, s. o.). Diese ist an einer Justiereinrichtung (**F**) auf einer horizontalen Plattform (**G**) befestigt. Die CCD-Kamera mit Mikroskopobjektiv (**H**) dient zur Kontrolle des Sprays. Kontaktflüssigkeit wird über die Zuleitung **I** zugeführt, die Leitung ist über die Schraube **K** geerdet. Sonstige Bauteile: **L** Erdungskabel für die CE, **M** Lichtleiter aus Kaltlichtquelle, **N** Fixierschraube.

blem zu umgehen, war es erforderlich, zwischen die einzelnen Trennläufe jeweils einen Spülschritt (5 ml/min, 1 min) einzuschalten. In Abbildung 3.7 sind die Spektren, in Abbildung 3.8 zwei Beispieltrennungen vor und nach einem Spülschritt dargestellt.

Die vorhandene Ionenquelle verwendet für die Versorgung mit Kontaktflüssigkeit eine Spritzenpumpe, die mit 10% bzw. 1% des Spritzenvolumens pro Minute betrieben werden kann. Ein Spülschritt erfordert damit fast immer eine Neubefüllung der Spritze, was einen für reproduzierbare Routinemessungen nicht zu vertretenden Aufwand darstellt und nur geringe Spielräume für eine Optimierung der Flußraten zuläßt. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Spritzenpumpe daher durch eine externe HPLC-Pumpe mit Entgaser ersetzt. Die Pumpe wurde zunächst über einen Flußsplitter (1:100) mit der Ionenquelle verbunden; diese Anordnung erwies sich jedoch gegenüber einer direkten Flüssigkeitszuführung als nachteilig, da sich der Systemdruck nur langsam abbaut und einen schnellen Wechsel der Flußraten erschwert. Zwar ist die verwen-

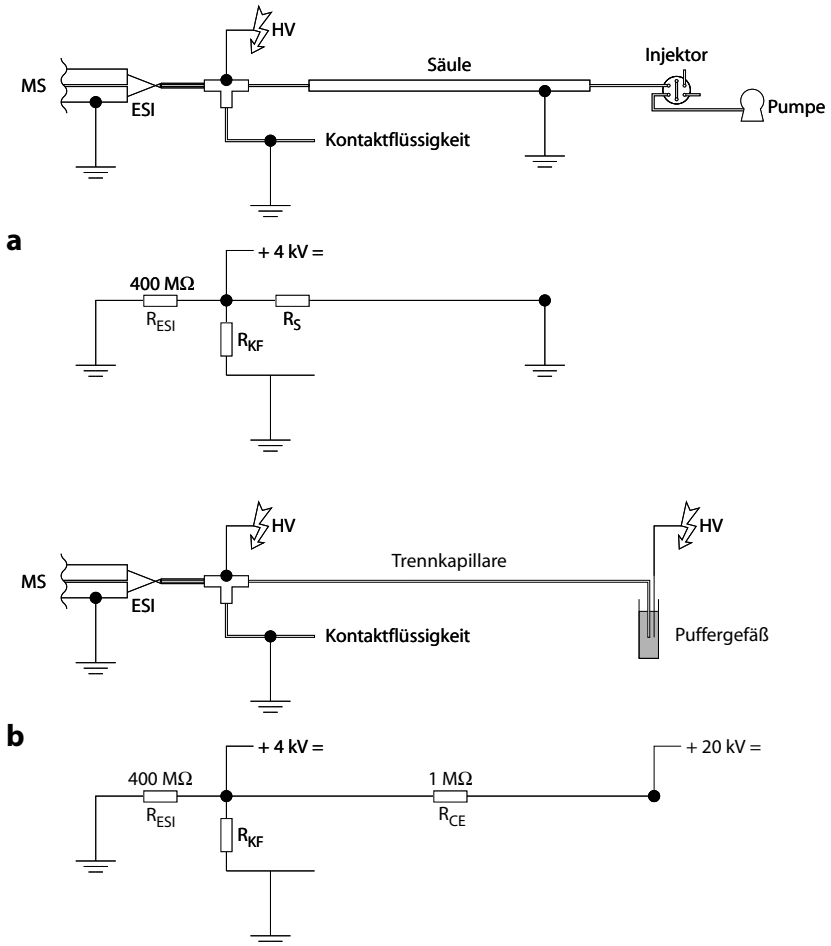
dete Pumpe nur für Flußraten  $> 10 \mu\text{l}/\text{min}$  spezifiziert, durch Kalibrierungsmessungen konnten jedoch in *drucklosem* Betrieb auch Flußraten von bis zu  $1 \mu\text{l}$  realisiert werden. Voraussetzung hierfür ist eine weitlumige Zuleitung, die minimalen Gegendruck aufweist (Verwendung einer 70 cm langen Edelstahlkapillare mit 0,5 mm Innendurchmesser ohne Filter oder weitere Restriktionen bis zur Erdung, ab dieser Verwendung eines nichtleitenden PEEK-Schlauches mit gleichem Innendurchmesser).

In der eigentlichen Ionisierung war eine Reihe von (vordergründig bedeutungslosen) Parametern für einen erfolgreichen Betrieb zu beachten. Die Optimierung des Elektrosprays erfolgte in der Regel auf Basis der visuell beobachtbaren Spraystabilität; Details zu den verwendeten *Sheath liquids*, Flußraten und Ionisierungstemperaturen sind in den nachfolgenden Abschnitten im Detail dargestellt (Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4). Keine Unterschiede ergaben sich aus der Verwendung von Metall- und Kunststoff- (PEEK) T-Stücken. Da es bei höheren Spannungen vor allem in der CE leicht zu hochfrequenten (aber unreproduzierbaren) Schwingungen in der Ionisierungsnadel kommt, wurde diese auf 4 cm verkürzt. Eine Erdung der Kontaktflüssigkeitsleitung (nach 20 cm) erwies sich als essentiell. Die Spannungsapplikation erfolgte zunächst direkt auf die Ionisierungseinheit; allerdings kommt es hierbei bei (unvermeidlichen) Spannungsüberschlägen zu Störungen in der Elektronik des Massenspektrometers, was in Extremfällen einen kompletten Neustart des Geräts erforderlich machte. Um Spannungsspitzen zu reduzieren wurde die Spannung daher später über einen 15 k $\Omega$ -Widerstand zugeführt.

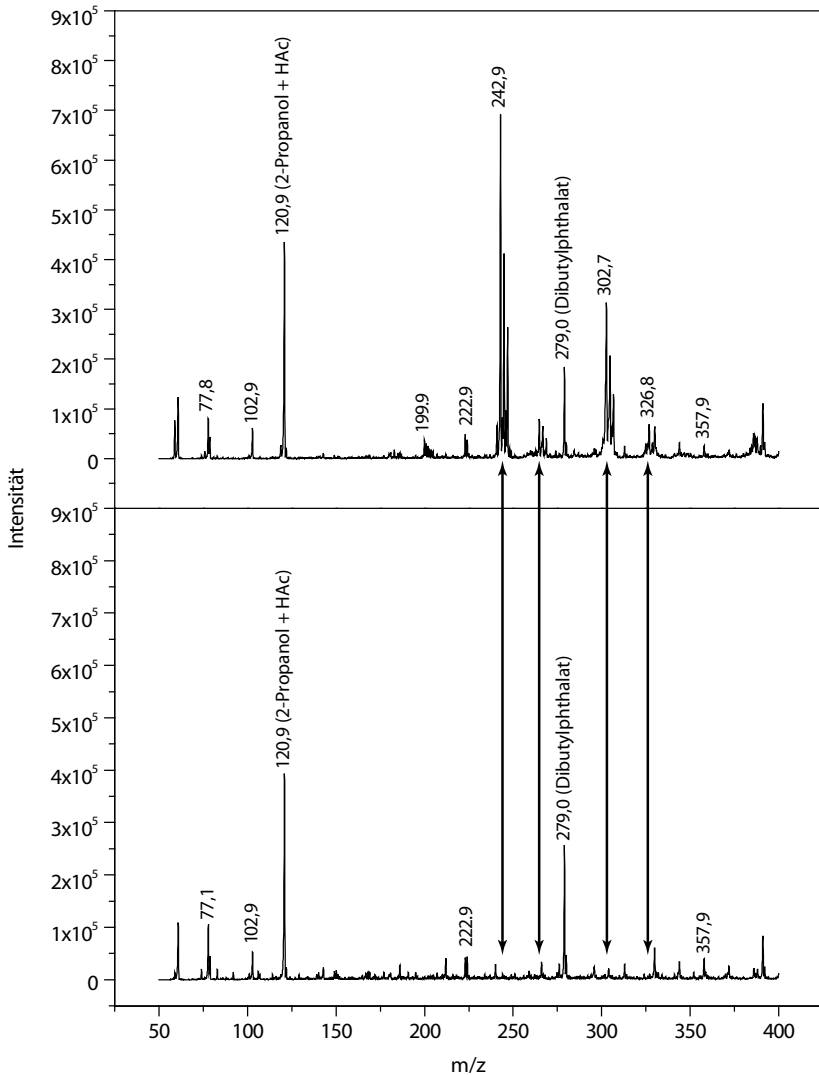
### 3.1.4 Ionisierung ohne Kontaktflüssigkeit

Die anodische Oxidation von Werkstücken durch Elektrolyse (*electropolishing*) wird routinemäßig in der metallverarbeitenden Industrie zur Glättung metallischer Oberflächen angewandt. Bei zu intensiver Anwendung führt das Electropolishing schnell zu einem massiven Oberflächenabtrag, ein Effekt, der bei der hier vorzustellenden Methode zur Herstellung konischer Metallkapillaren ausgenutzt wird (ISHIHAMA *et al.*, 2002a).

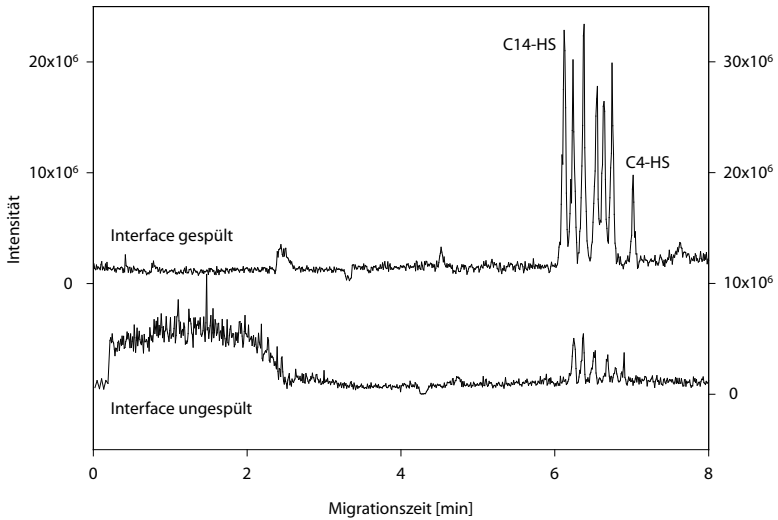
Die gegenüber der Originalliteratur veränderte Elektrolyseapparatur ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Geeignete Metallkapillaren (0,2 mm Innendurchmesser/Edelstahl, 0,1 mm/Edelstahl, 50  $\mu\text{m}$ /Nickel) wurden mit einem Trennschleifer in ca. 5 cm lange Stücke geschnitten. Ein Ende wurde vor der nachfolgenden Prozedur zunächst mit rotierendem Schleifpapier (Korngröße 1000, 10 000 U/min) und anschließend mit der Polierscheibe geglättet. Das entgegengesetzte Ende blieb unbehandelt. Das Kapillarenstück wurde mit einem Schrumpfschlauchstück (geglättetes Ende) an der Anode (90:10 Platin-Iridiumnadel; Bauteil aus einem ausgemusterten API-Massenspektrometer, 10 cm Länge/1 mm Durchmesser) der Elektrolyseapparatur befestigt (»Opferelektrode«) und zusammen mit der Kathode 1 cm tief in die Elektrolytlösung (50% Phosphorsäure) eingetaucht. Nach dem Verschließen wurde die Elektrolyseapparatur unter Spannung gesetzt (12 V). Im Verlauf der Elektrolyse (ca. 5 min) bleibt die Stromstärke nahezu konstant und fällt nach dem Ende auf null. An der Phasengrenze bewirkt die Elektrolyse eine konische Zuspitzung der Kapillare; das immertierte Ende fällt schließlich ab, wodurch der Stromfluß zum Erliegen kommt.



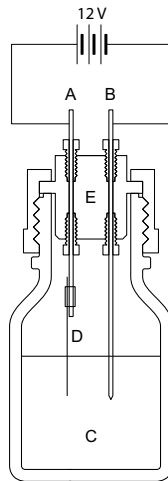
**Abbildung 3.6.** Schematische Darstellung von LC/MS (a) und CE/MS (b) mit Schaltbildern.  $R_{ESI}$ : Widerstand zwischen Ionisierungsnaedel und geerdeter Eingangsöffnung des Massenspektrometers (Stromfluß ca.  $10 \mu A$ );  $R_{KF}$ : Widerstand der Kontaktflüssigkeitsleitung;  $R_S$ : Säulenwiderstand in der LC (unendlich);  $R_{CE}$  Widerstand der CE-Trennkapillare (Stromfluß ca. 20 kV in typischen Puffern).



**Abbildung 3.7.** Einfluß von Gasblasen (Entstehung durch Elektrolyse der Kontaktflüssigkeit) auf die Ionisierung. CE/MS in 20 mM Ammoniumacetat, pH 9,2 bei 15 kV Elektrophorese- und 4,2 kV Ionisierungsspannung, Kapillarlänge 50 cm/Innendurchmesser 75  $\mu$ m. Kontaktflüssigkeit 50/50/0,5 (v/v/v) Wasser/2-Propanol/Essigsäure, 4  $\mu$ l/min. **Oben:** Spektrum nach drei Läufen ohne Spülen (Clusterbildung!), **unten:** Spektrum nach Spülen mit Kontaktflüssigkeit (5 ml/min, 1 min).



**Abbildung 3.8.** Einfluß von Gasblasen (Entstehung durch Elektrolyse der Kontaktflüssigkeit) auf die Trennung eines Standardhomoserinmischunges in der CE (zu Bedingungen vgl. Abbildung 3.7). Full scan; Massen der Homoserine selektiert.



**Abbildung 3.9.** Elektrolyseapparat zur Herstellung konischer Metallkapillaren. Anode **A** (Edelstahlstab mit daran befestigtem Werkstück **D**) und Kathode **B** tauchen ca. 1 cm tief in die Elektrolytenlösung (50% Phosphorsäure). **E** Isolator (Distanz Anode-Kathode 4 cm).

### 3.1.5 Ergebnisse und zusammenfassende Bewertung

Die *sheathless*-Ionisierung erwies sich sowohl bei der LC/MS, als auch bei der CE/MS-Kopplung als problematisch: In beiden Fällen war hier eine Bildung von Gasblasen unvermeidlich. Diese Tatsache wird auf die relativ geringe Kontaktzone (im Verbindungsstück zwischen Trenn- und Ionisierungskapillare) zurückgeführt: Die Ionisierungseinheit verhält sich damit in der Praxis wie eine Elektrolysezelle. Besonders nachteilig erwies sich dieser Befund für die CE: die Ionisierungseinheit dient hier gleichzeitig als Gegenelektrode für die Trennungsspannung; eine Akkumulation von Gasblasen führt zu unkontrollierbaren Spannungsabfällen und unreproduzierbaren Unterbrechungen des Stromflusses. Sämtliche Versuche zur *sheathless*-Ionisierung nach der CE verliefen damit negativ; in der LC konnten zwar Analytensignale erzeugt werden; allerdings mit sehr stark schwankenden Basislinien und damit unbefriedigenden Reproduzierbarkeiten.

Diesen Problemen könnte theoretisch durch Einsatz speziell beschichteter Emitterkapillaren, durch Verwendung von Redoxpuffern (SMITH & MOINI, 2001b), oder durch eine Verringerung des Durchmessers der Ionisierungskapillare begegnet werden.

Zwar zeigen neuere Entwicklungen Fortschritte bei der Lebensdauer beschichteter Ionisierungsnadeln (WETTERHALL *et al.*, 2003), allerdings existieren in der Praxis noch immer Probleme hinsichtlich ihrer Stabilität, die Konsequenz ist eine mangelhafte Reproduzierbarkeit für quantitative Messungen; mehr noch widerspricht ihr Einsatz dem Ziel einer möglichst einfachen und kostengünstigen Realisierung. Eine Verringerung des Kapillarendurchmessers (und damit eine Erhöhung der relativen Fließgeschwindigkeit: Bernoulli-Effekt) führt - neben technischen Schwierigkeiten - zu einem Gegenruck, der, wie bei der orthogonalen Flüssigkeitszuführung (vgl. Abschnitt 3.1.2) in der CE durch den EOF nicht vollständig kompensiert werden kann. Die Verwendung von Redox-Puffern (oder auch nur die Anpassung des Lösungsmittelgehalts oder der Leitfähigkeit des Trennpuffers oder Elutionsmittels) schränkt die Möglichkeit zur Optimierung der Trennparameter ein.

Demgegenüber erwies sich in der Praxis - zur theoretisch höheren Sensitivität der *sheathless*-Systeme vgl. Abschnitt 2.2.2 - als sehr viel robusteres, reproduzierbareres und damit leistungsfähigeres System, das durch die Möglichkeit der Flüssigkeitsbeimischung und der nachträglichen Modifikation der mobilen Phase oder des Trennpuffers eine sehr viel größere Bandbreite an Trennbedingungen zulässt.

## 3.2 Micellare Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie

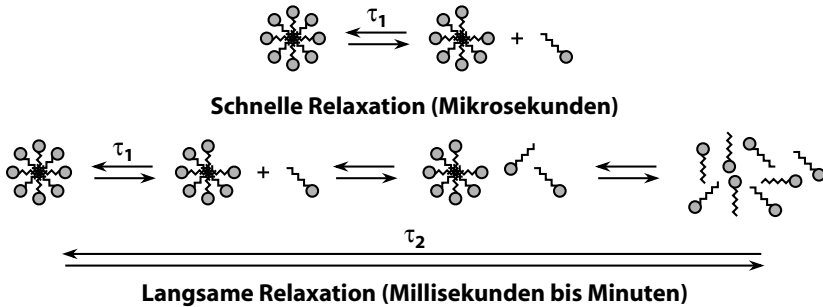
Die Micellare Elektrokinetische Kapillarelektrophorese (oder Micellare Elektrokinetische Chromatographie: *micellar electrokinetic capillary electrophoresis/chromatography*; MECC bzw. MEKC) beruht auf der Einführung eines chromatographischen Prinzips in die CE und erlaubt hierdurch die Trennung neutraler Analyten. Die folgenden Abschnitte stellen die theoretischen Grundlagen der MEKC dar und diskutieren die zu beachtenden Einschränkungen bei der Kopplung an die Massenspektrometrie. Im Ergebnisteil (vgl. auch FROMMBERGER *et al.*, 2003) werden Möglichkeiten und Limitationen für den Einsatz der MEKC in der HSL-Analytik dargestellt.

### 3.2.1 Grundlagen der MEKC

*Tenside* sind zeichnen sich dadurch aus, daß sie die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen: Die englische Bezeichnung *surfactant* ist ein Akronym aus *surface active agent* und war ursprünglich ein Handelsname der General Aniline and Film Corporation (SCHRAMM, 2000); in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde der Begriff freigegeben und in die wissenschaftliche Literatur übernommen. Tenside sind amphiphile Moleküle, bilden auf Oberflächen monomolekulare Schichten und aggregieren in Lösung in Form von Micellen unterschiedlicher Größe und Gestalt.

Die in zentralen Punkten »ungewöhnlichen« Eigenschaften von wäßrigen Tensidlösungen sind auf die besondere Struktur der Moleküle zurückzuführen: Klassische Tenside bestehen in der Regel aus einer hydrophilen Kopfgruppe (»Kopf«) und einer hydrophoben Seitenkette (»Schwanz«). Die polare oder ionisierbare Kopfgruppe interagiert in der Regel sehr ausgeprägt durch Ion-Dipol- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit der wäßrigen Umgebung. Tenside werden aufgrund des chemischen Charakters ihrer Kopfgruppen in vier Klassen (kationisch, anionisch, zwitterionisch/amphiphil und nichtionisch) unterteilt.

Typische Tenside aggregieren in wäßriger Lösung ab einer Grenzkonzentration (*critical micellar concentration*, CMC) zu *Micellen*, die nach dem klassischen Hartley-Modell als sphärische Doppelstruktur vorliegen: Die hydrophoben Seitenketten richten sich zu der vom Lösungsmittel abgewandten Seite (also ins Innere der sich bildenden Micelle) hin aus, die polaren (kationischen, anionischen, zwitterionischen, amphiphilen oder nichtionischen) »Köpfe« begrenzen die Micelle nach außen. Die Oberfläche wird durch Gegenionen und/oder Wassermoleküle aus dem Lösungsmittel besetzt; die Oberflächeneffekte folgen dabei zumindest teilweise den in Abschnitt 2.3.2 dargestellten Prinzipien. Neuere Forschungsergebnisse erfordern in einigen Punkten eine Anpassung des Hartley-Modells: Befunde aus der Kernresonanzspektroskopie und Fluoreszenzmessungen legen einen Kontakt zumindest einiger der hydrophoben Seitenketten mit der umgebenden wäßrigen Phase nahe; zudem führt eine rein radiale Anordnung der im Hartley-Modell als starr angesehenen hydrophoben Seitenketten im Inneren der Micelle zu Dichteproblemen (FROMHERZ, 1981). Die sich hieraus ergebenden Schwächen werden durch neuere Modelle (vgl. u. a. DILL & FLORY, 1981) überwunden; sie erlauben zumindest einigen der aliphatischen Ketten eine Positionierung an der Oberfläche



**Abbildung 3.10.** Kinetik der Micellenbildung nach ANIANSSON *et al.* (1976). Abbildung nach PATIST *et al.* (1999), verändert. Für Erläuterungen siehe Text.

der Micelle, das Dichteproblem wird dadurch vermieden, daß die Seitenketten im Inneren der Micelle freie Gitterpositionen besetzen können. Ungeachtet seiner Schwächen ermöglicht das Hartley-Modell jedoch die Beschreibung der bei der MEKC ablaufenden Prozesse.

Das Innere einer Micelle wird aus den hydrophoben Seitenketten der Tenside gebildet und zeigt damit Charakteristika von Alkanen, wodurch in einer wäßrigen (Puffer-) Lösung eine pseudostationäre, hydrophobe Phase ausgebildet wird. Nimmt man eine Micelle an, die bereits von  $i - 1$  Analytenmolekülen besetzt ist, kann die dynamische Besetzung dieser Micelle  $M_{i-1}$  durch ein weiteres Molekül durch die Gleichung

$$S_a + M_{i-1} \xrightleftharpoons[k_r]{k''} M_i \quad (3.1)$$

ausgedrückt werden, wobei  $k''$  und  $k_r$  *Ratenkonstanten* darstellen. Wenn  $k''$  unabhängig von  $i$  und  $k_r = ik' \propto i$ , entspricht nach INFELTA & GRÄTZEL (1979) das Verhältnis  $\frac{k''}{k_r}$  dem Nernstschen Verteilungssatz, d. h. Analyten partitionieren entsprechend ihres LogP-Wertes zwischen wäßriger und hydrophober Phase.

Micellen stellen dabei keine statischen Strukturen dar, einzelne Tensidmoleküle befinden sich in kontinuierlichem Austausch mit der wäßrigen Umgebung, zudem sind die Micellen selbst einem kontinuierlichen Auf- und Abbau unterworfen. Die Mechanismen der Micellenbildung wurden durch unterschiedliche Techniken untersucht (FRINDI *et al.*, 1994; HOFFMANN *et al.*, 1976; TONDRE *et al.*, 1975; JAMES *et al.*, 1977; KATO *et al.*, 1995); nach dem theoretischen Modell von ANIANSSON *et al.* (1976) unterliegt der Abbau von Micellen zwei Zeitregimen (Abbildung 3.10): Eine schnelle Relaxationszeit  $\tau_1$  (im Mikrosekundenbereich) beschreibt den Austausch von Monomeren zwischen der Micelle und der Lösung;  $\tau_2$  (Millisekunden bis Minuten: langsame Relaxation) die Auflösung und Bildung der Micellen selbst. Durch  $\tau_1$  und  $\tau_2$  lassen sich sowohl die *Aufenthaltszeit* eines Tensidmoleküls in der Micelle als auch die *durchschnittliche Lebensdauer* von Micellen berechnen.



Die Tatsache, daß Moleküle mit aliphatischen Ketten (vor allem länger-kettige Alkohole) die Stabilität von SDS-Micellen erhöhen können (Verlängerung von  $\tau_2$  bis zum 230fachen; PATIST *et al.*, 1999) ist seit langem bekannt und wird in der Industrie für die Formulierung optimierter Waschlösungen ausgenutzt. Dieses Phänomen ist am markantesten bei einer vergleichbaren Länge der Seitenkette von Additiv und Tensid (»Kettenlängenkompatibilität« (*chain length compatibility*; vgl. SHIAO *et al.*, 1998) und kommt durch einen festen Einbau (nicht wie oben dargestellt durch eine dynamische Verteilung) und die Abschirmung der (geladenen) Micellenoberfläche zustande.

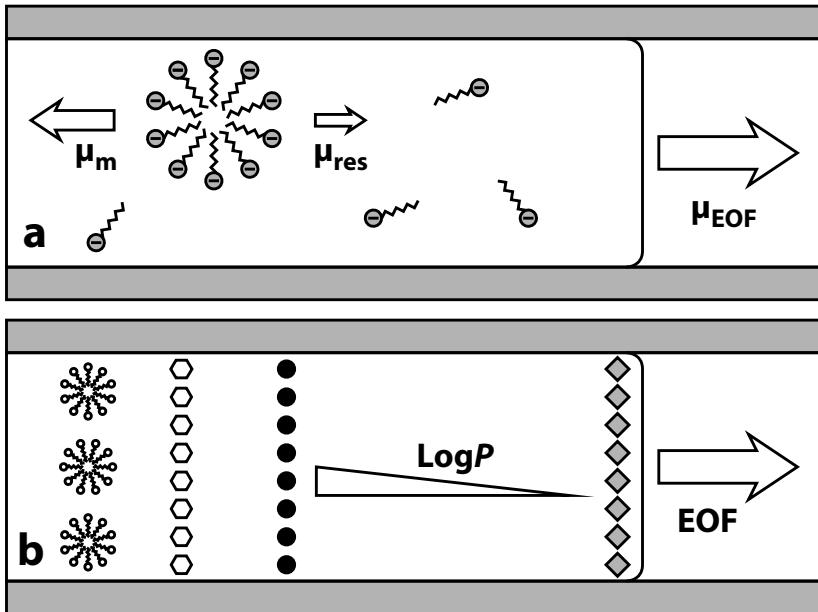
### 3.2.2 MEKC und MEKC/MS

Die MEKC (TERABE *et al.*, 1985) beruht auf der in Abschnitt 3.2.1 dargestellten Verteilung gelöster Analyten zwischen micellarer und wäßriger (Pseudo-) Phase unter dem Regime des EOF (vgl. Abschnitt 2.3.2 und Abbildung 3.11). Typischerweise verwendete anionische Tenside wie Natriumdodecylsulfat (SDS) bilden Micellen mit negativer Oberflächenladung, die als Gesamtheit eine Beschleunigung in Gegenrichtung zum EOF erfahren. In üblicherweise verwendeten Puffern übersteigt der Betrag der elektrophoretischen Geschwindigkeit den Betrag des Bewegungsvektors der Micelle; Micellen gelangen damit zum Detektor, werden dem EOF gegenüber jedoch abgebremst.

Injizierte *neutrale* Spezies können damit in der MEKC alleine aufgrund ihrer Interaktion mit der Micelle aufgetrennt werden, ihre Retentionszeit liegt dabei immer zwischen der Migrationszeit des EOF und der Migrationszeit der Micelle (»analytisches Fenster«); *geladene* Analyten unterliegen darüberhinaus auch dem Einfluß des elektrischen Feldes, der Übergang zwischen hydrophobizitäts- und ladungsbasierter Trennung ist hier fließend: Eine Zugabe von SDS dient bei der Trennung geladener Analyten in der Regel einer besseren Auflösung benachbarter Peaks.

Die Kopplung der MEKC an die ESI ist nicht unproblematisch; entstehende Schwierigkeiten sind im wesentlichen auf die massive Ionenunterdrückung durch Tenside wie SDS zurückzuführen. Der Effekt von Detergenzien auf Ionen in Aerosoltröpfchen wurde ursprünglich in anderem Zusammenhang untersucht (zur Flammen-Atom-spektrometrie vgl. WARD *et al.*, 1982; KORNAHRENS *et al.*, 1982) und kann durch das *aerosol ionic redistribution*-Modell (AIR) beschrieben werden (Abbildung 3.12): Oberflächenaktive Substanzen lagern sich demnach bevorzugt an der Flüssigkeitsoberfläche an, wobei sich die hydrophoben Seitenketten in den Gasraum orientieren und die hydrophilen Köpfe in der Flüssigkeitsoberfläche verankert bleiben. Coulombsche Interaktionen zwischen Kationen und Detergentien behindern hierdurch den Übertritt von Ionen in die Gasphase.

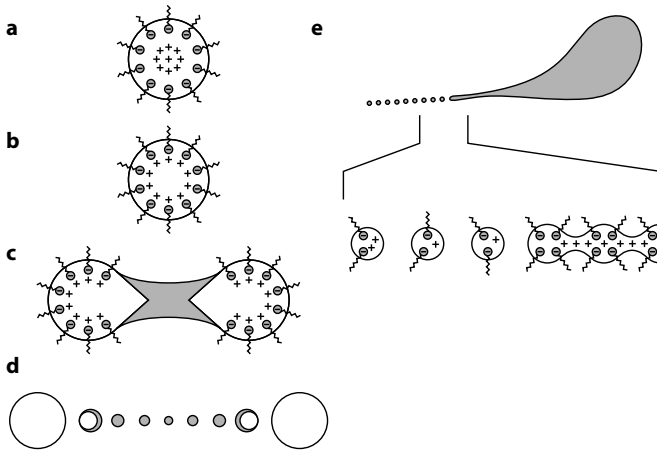
Um die Einschränkungen bei der Koppelbarkeit von MEKC und ESI-MS zu überwinden, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, die in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt werden: Verwendung ESI-»kompatibler« Tenside (Gallensäuren), Einsatz polymerer Substanzen sowie Modifikationen bei der Füllung der Kapillare mit Tensid und dem pH des Trennpuffers (Übersicht bei YANG & LEE, 1997).



**Abbildung 3.11.** Schematischer Ablauf von Trennungen in der MEKC. **a** Mobilitätsvektoren von Micelle ( $\mu_m$ ) und EOF ( $\mu_{eof}$ ) resultieren in einer Nettomobilität der Micelle ( $\mu_{res}$ ). **b** Analyten partitionieren zwischen micellarer und wässriger Phase und werden entsprechend ihres  $\log P$  aufgetrennt.

### 3.2.3 Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten der Analyten

Um die optimalen Ionisierungsbedingungen für die MEKC/MS zu ermitteln, wurden die Analyten in der Direktinfusion hinsichtlich ihres Ionisierungs- und Fragmentierungsverhaltens bei unterschiedlichen Temperaturen der Heizkapillare am Eingang des Massenspektrometers und unterschiedlichen Fragmentierungsenergien untersucht. Die Infusion (100  $\mu\text{g/ml}$  jedes Einzelstandards in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0) erfolgte über eine 80 cm-Kapillare (75  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser) über die CE mit 0,5 psi Druck. Um quantifizierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde die Kapillare zwischen den einzelnen Infusionsschritten (jeweils 0,2 min) für 4 min mit Puffer gespült; die resultierenden 0,2 min-»Peaks« wurden integriert. Abbildung 3.13 zeigt die Spektren bei erhöhter Temperatur (300  $^{\circ}\text{C}$ ) und bei 25% Fragmentierungsenergie (CID); die temperatur- und die kollisionsinduzierte Fragmentierung der HSL liefert vergleichbare Ergebnisse. In Abbildung 3.14 sind die vermuteten Fragmentierungsreaktionen für C8-HSL dargestellt (MORIN *et al.*, 2003). Zentraler Befund der Fragmentierungsversuche ist die Bildung des Homoserinfragments bei  $m/z$  102 (unabhängig von der Ketten-



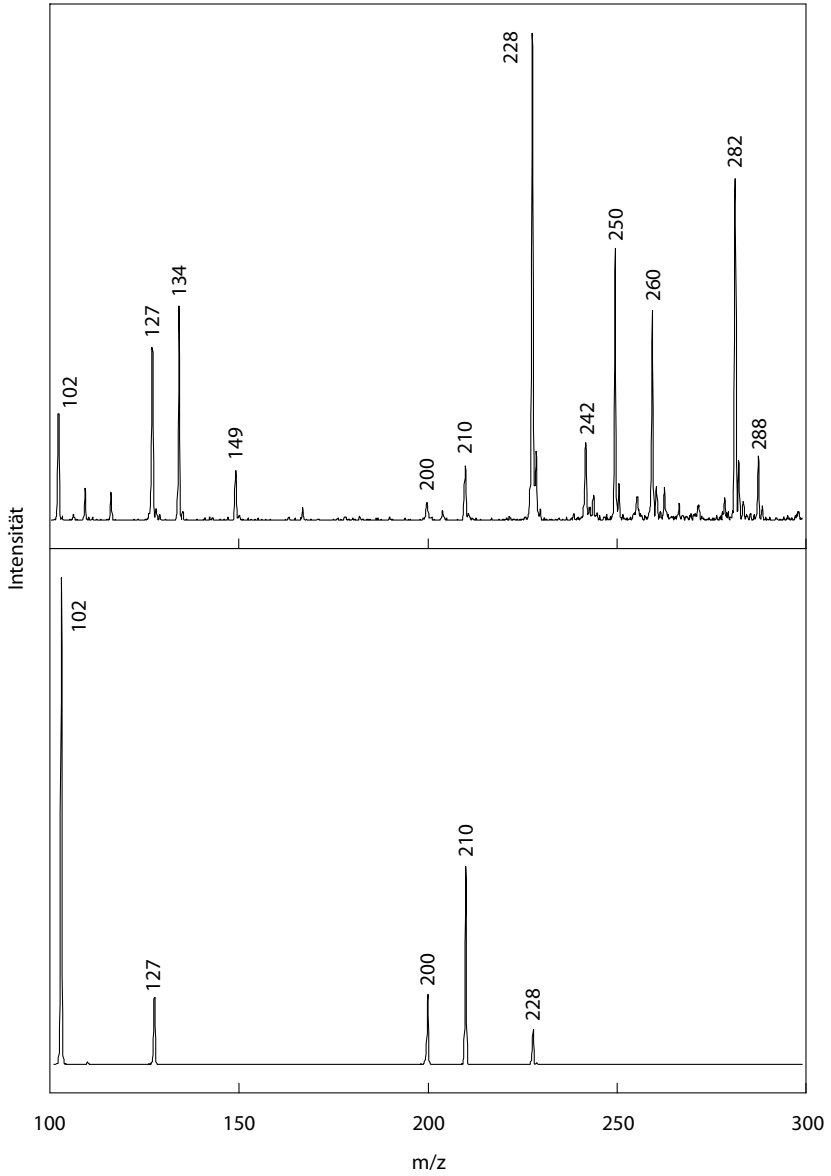
**Abbildung 3.12.** *Aerosol ionic redistribution*-Modell (AIR), tensid- und kationenreiche Bereiche grau hinterlegt. **a** Migration der Tensidmoleküle an die Tropfenoberfläche, **b** Diffusion von Kationen an die negativ geladene Grenzfläche, **c** Trennung der Tropfen; **d** Anreicherung von Kationen und Tensiden in den gebildeten Tröpfchen. **e** AIR-Modell zur Beschreibung der Ionenunterdrückung in der ESI (zur Tropfenform vgl. GOMEZ & TANG, 1994). Abbildung nach RUNDLETT & ARMSTRONG (1996), verändert

länge), das in späteren Versuchen für ein *Screening* unbekannter Proben auf An- oder Abwesenheit von HSL herangezogen werden kann. Die Anwesenheit anderer charakteristischer Fragmentierungsprodukte kann hierbei wichtige Hinweise auf die Struktur der Ausgangsverbindungen geben.

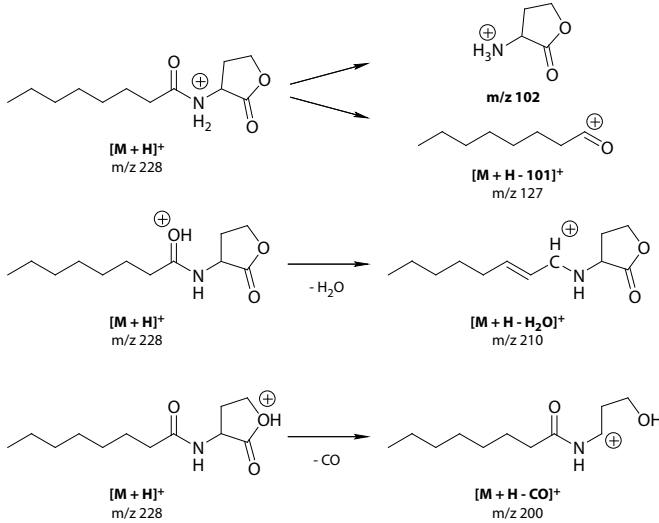
In Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse bei unterschiedlichen Temperaturen der Heizkapillare dargestellt. Um optimale Ergebnisse hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zu erzielen, wurde die Temperatur der Heizkapillare auf 250 °C eingestellt; dieser Wert entspricht dem Temperaturoptimum für die Bildung des Quasimolekülions bei C7- und C8-HSL und liegt nahe dem Optimum für C6-HSL. Um einen übermäßigen Abbau von C4-HSL zu vermeiden, wurde hiermit ein Kompromiss gewählt (für die längerketigen HSL existiert ein zweites Optimum bei 300 °C)

### 3.2.4 Erprobung unterschiedlicher Tenside

Um den in Abschnitt 3.2.2 angesprochenen Inkompatibilitäten zwischen MEKC-Trennung und massenspektrometrischer Detektion zu begegnen, wurden Gallensäuren (Desoxycholsäure und Cholsäure) sowie das »polymere Tensid« BBMA (ein Butylacrylat-/Butylmethacrylat-/Methacrylat-Kopolymer) auf ihre Eignung hin untersucht. Gallensäuren bilden keine Micellen im eigentlichen Sinn, die Aggregate zeigen in wässriger Lösung jedoch einige typische Charakteristika von Micellen (vgl. MESSINA *et al.*, 2002) und wurden daher erfolgreich für MEKC/ESI-MS-Trennungen eingesetzt. Nach



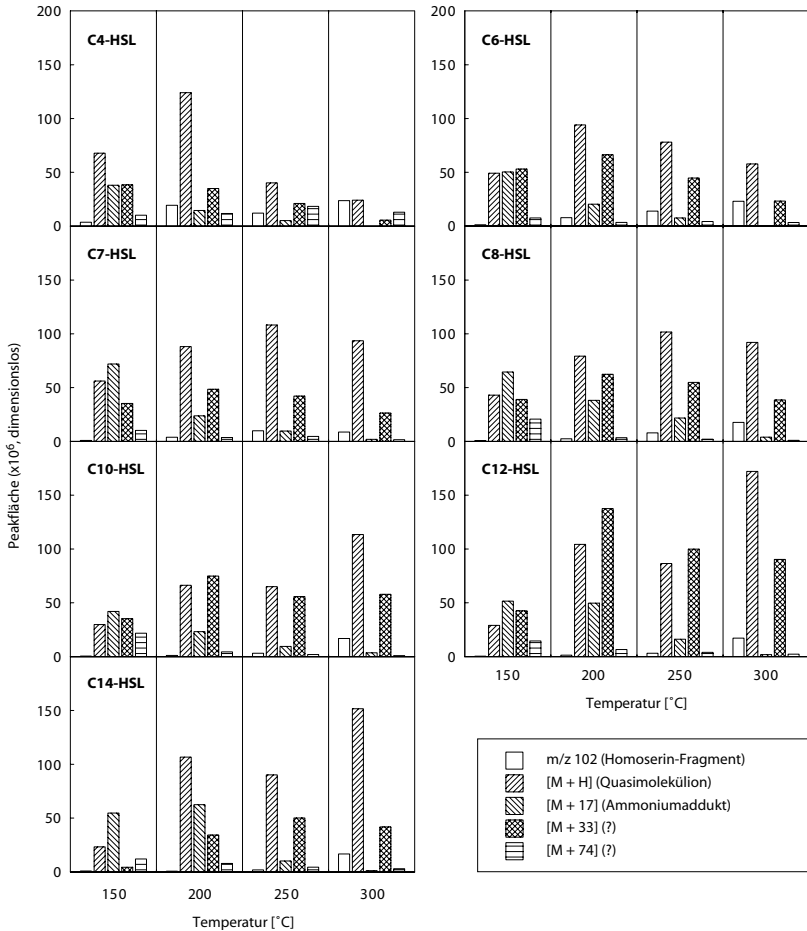
**Abbildung 3.13.** Temperatur- (300 °C) sowie kollisionsinduzierte (25% CID, 170 °C) Fragmentierung von C8-HSL. Zu Bedingungen vgl. Text. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2003).



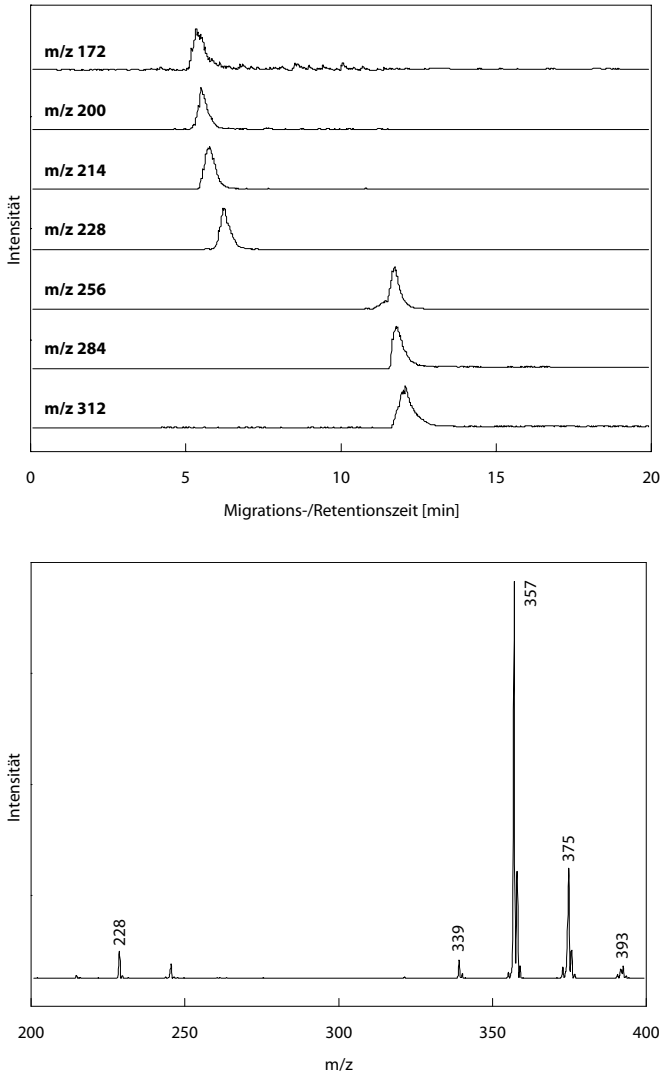
**Abbildung 3.14.** CID-Fragmentierung von Homoserinlactonen am Beispiel von C8-HSL. Abbildung nach MORIN *et al.* (2003), verändert.

umfangreichen Optimierungsschritten mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (9,2-11), Leitfähigkeiten und Molaritäten (5-20 mM), unterschiedlichen Gehalten an Cholsäure und Desoxycholsäure (1-15 mM), unterschiedlichen Gehalten an organischen Lösungsmitteln (5-20% Methanol) und unterschiedlichen Befüllungsgraden der Kapillare mit Gallensäuren (5-60%, zu *partial filling* vgl. Abschnitt 3.2.5) war eine ansatzweise Trennung des HSL-Standardgemisches möglich (Abbildung 3.16 oben), eine massive Kontamination des ESI-Interface mit Tensid, und hierdurch bedingte Sensitivitätsverluste waren jedoch auch unter optimierten Bedingungen unvermeidlich (Abbildung 3.16 unten:  $m/z$  325-400). Sowohl in sauren als auch in basischen Kontaktflüssigkeiten war zudem ein Auskristallisieren der Tenside am Taylor-Konus zu beobachten. Aufgrund der Löslichkeit der verwendeten Gallensäuren (> pH 9,2) bot die Trennung darüber hinaus nicht genügend Spielraum für Mobilitätsanpassungen.

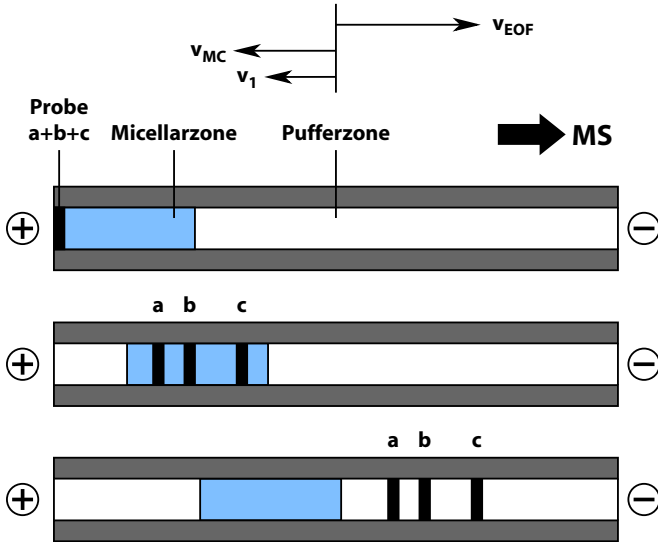
BBMA soll entweder aufgrund seiner geringen Flüchtigkeit (OZAKI *et al.*, 1995b) oder aufgrund seiner gering ausgeprägten Oberflächenaktivität (vgl. u. a. PIIRMA, 1992) für die Massenspektrometrie geeignet sein, die es sich nur gering an der Tropfenoberfläche anreichern läßt (RUNDLETT & ARMSTRONG, 1996). Alle Versuche zur Trennung der HSL mit BBMA verliefen jedoch negativ.



**Abbildung 3.15.** Auswirkung der Temperatur der Heizkapillare auf die Adduktbildung und Fragmentierung der untersuchten Standards (100 µg/ml HSL-Einzelstandards in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0). Zu Bedingungen vgl. Text.



**Abbildung 3.16.** Trennung eines HSL-Standardgemisches (C4-, C6-, C7-, C8-, C10-, C12- und C14-HSL: 100 µg/ml in Methanol, 10 s Injektionszeit) in der MEKC mit Gallensäuren unter optimierten Bedingungen (vgl. Text): 80 cm/75 µm-Kapillare, 60% Füllung mit 20 mM Desoxycholsäure in 20 mM Ammoniumacetat, pH 9,2. Puffer 20 mM Ammoniumacetat, pH 9,2. 20 kV Trenn- und 5 kV Ionisierungsspannung. **Oben:** Chromatogramm ( $[M + H]^+$ ), **unten:** Spektrum am Peakmaximum von  $m/z$  228. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2003).



**Abbildung 3.17.** Schema der *partial filling*-Technik in der MEKC. Zu Details vgl. Text.

### 3.2.5 *Partial-filling*-MEKC/MS

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse mit Gallensäuren und polymeren Tensiden wurde für die Trennung der HSL auf das Standard-Tensid SDS zurückgegriffen. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung einer Kompatibilität von MEKC und ESI-MS stellt die Anwendung der *partial-filling*-Technik dar (Abbildung 3.17), bei der die Kapillare nur bis zu einem gewissen Prozentsatz mit Tensid befüllt wird. Die im Anschluß an das Tensid injizierte Probe durchwandert die micellare Zone mit dem EOF und wird dabei aufgetrennt. Im Idealfall erreichen die Analyten die tensidfreie Pufferzone und eluieren vor den Micellen. Bei starker Interaktion der Analyten mit der Micelle (wie vor allem bei den langkettigen HSL zu erwarten) sind jedoch weitere Anpassungen notwendig: Wird der pH des Trennpuffers ausreichend stark abgesenkt und die Kapillare mit Säure konditioniert, erreicht der Betrag des Bewegungsvektors der Micelle den des EOF; die Micellenzone verbleibt damit stationär in der Kapillare oder eluiert sogar in gegengesetzter Richtung (Technik der *reverse migrating micelles*: YANG & LEE, 1997; MOLINA *et al.*, 2001).

Abbildung 3.18 (oben) zeigt die Auswirkungen veränderter SDS-Konzentrationen auf die Retentionszeiten der Komponenten eines HSL-Standardgemisches bei konstantem Füllungsgrad der Kapillare. Die Trennung wird hierbei bereits in einem relativ schmalen Konzentrationsbereich (10-30 mM) stark beeinflusst. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit bei schwankendem EOF (3,6-3,8 min; Detektion nach 20 cm) wurden die



Rohdaten normalisiert: Der Kapazitätsfaktor  $k'$  errechnet sich in der MEKC nach TER-ABE *et al.* (1985) zu

$$k' = \frac{t_R - t_{eo}}{t_{eo} \left[ 1 - \left( \frac{t_R}{t_{psp}} \right) \right]} \quad (3.2)$$

mit  $t_R$ ,  $t_{eo}$  und  $t_{psp}$  der Migrationszeit der zu untersuchenden Substanz, des EOF und der pseudostationären Phase. Im Falle revers migrierender oder stationär in der Kapillare verbleibender Micellen gilt  $t_{psp} \rightarrow \infty$ . Gleichung 3.2 vereinfacht sich hierdurch zu

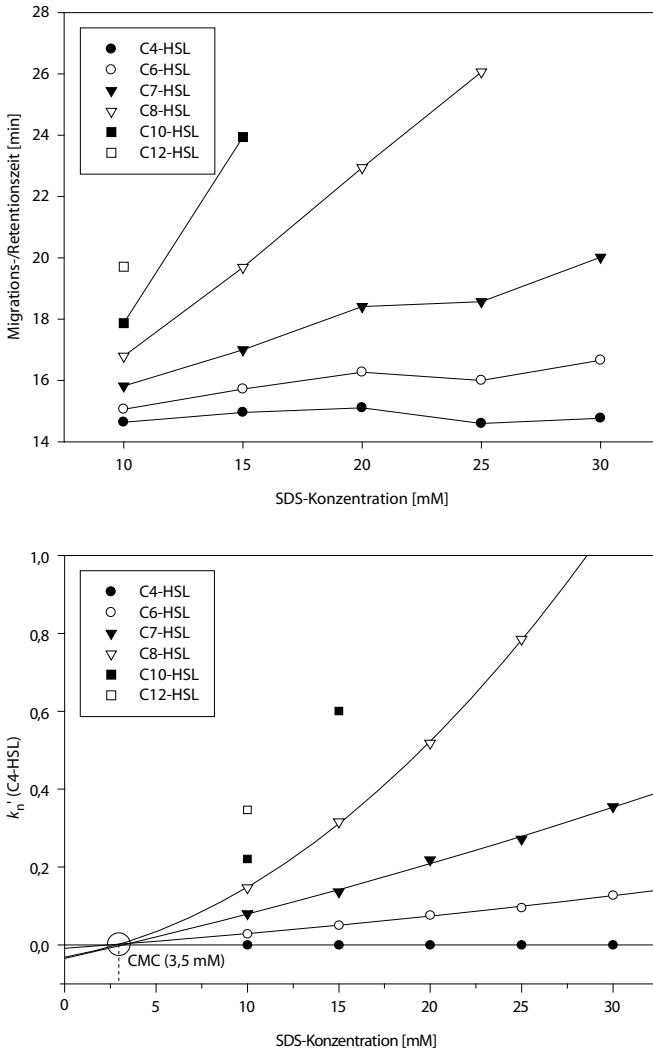
$$k' = \frac{t_R - t_{eo}}{t_{eo}} \quad (3.3)$$

Da der EOF im Massenspektrometer (nach 80 cm) nur schwer bestimmbar war, und die Messung nach 20 cm zu Ungenauigkeiten bei der Extrapolation auf 80 cm führte, wurde für die Berechnung die Retentionszeit des kleinsten HSL (C4-HSL) herangezogen. Gleichung 3.3 wird damit zu

$$k'_n = \frac{t_R - t_{C4-HSL}}{t_{C4-HSL}} \quad (3.4)$$

wobei  $k'_n$  der auf C4-HSL normalisierte Kapazitätsfaktor und  $t_{C4-HSL}$  die Retentionszeit von C4-HSL. Abbildung 3.18 (unten) zeigt die hierdurch ermittelten Werte. Im Gegensatz zu Literaturdaten (vgl. u. a. STRASTERS & KHALEDI, 1991) weisen vor allem die Daten für die länger-kettigen HSL eine quadratische Abhängigkeit zur Konzentration des Tensids auf, was einen Hinweis auf den Mechanismus der Interaktion zwischen HSL und Tensidmicellen gibt: Entsprechend der in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.1 vorgestellten Prinzipien erscheint es wahrscheinlich, daß vor allem kettenlängenkompatible HSL aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Tensid neben einer Nernstschen Verteilung gegenüber der pseudostationären Phase metastabil in die Micellen eingebaut werden (Bildung gemischter Micellen) und damit gegenüber den kürzerkettigen Verbindungen eine überproportionale Verzögerung erfahren. Aus den gewonnenen Ergebnissen läßt sich die kritische micellare Konzentration (CMC) errechnen, unterhalb derer keine Auftrennung der Analyten mehr stattfindet. Der Literaturwert für SDS (in destilliertem Wasser) liegt hier bei 8 mM, Puffersalze erniedrigen in der Regel die CMC, was den in Abbildung 3.18 bestimmten Wert von 3,5 mM realistisch erscheinen läßt. Um negative Effekte auf die Ionisierung weitestgehend auszuschließen, wurde in den nachfolgenden Messungen mit einer minimalen SDS-Konzentration (10 mM) gearbeitet, die bereits eine ausreichende Trennung gewährleistet.

In Abbildung 3.19 ist der Einfluß des Befüllungsgrades der Kapillare mit Tensidlösung auf die Retentionszeit der Analyten dargestellt. Sowohl die Retentionszeit als auch die Kapazitätsfaktoren hängen linear von der Zonenlänge ab. Um eine ausreichende Trennung (Auflösung zweier Peakpaare  $> 1,5$ , vgl. Abbildung 3.20 oben) zu gewährleisten, wurde im weiteren Verlauf mit 60% Kapillarenfüllung gearbeitet. Eine weitere Erhöhung der Befüllung vergrößert zwar die Auflösung, jedoch war bei 80% und mehr



**Abbildung 3.18.** Einfluß der SDS-Konzentration auf die Trennung in der MEKC/MS (Analyten wie Abbildung 3.16. Puffer 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0/Teilfüllung mit 60% SDS in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0. Konditionierung der Kapillare mit 1 M HCl). **Oben:** Rohdaten, **unten:** Normalisierung zu  $k'_n$ . Zu Details vgl. Text. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2003).

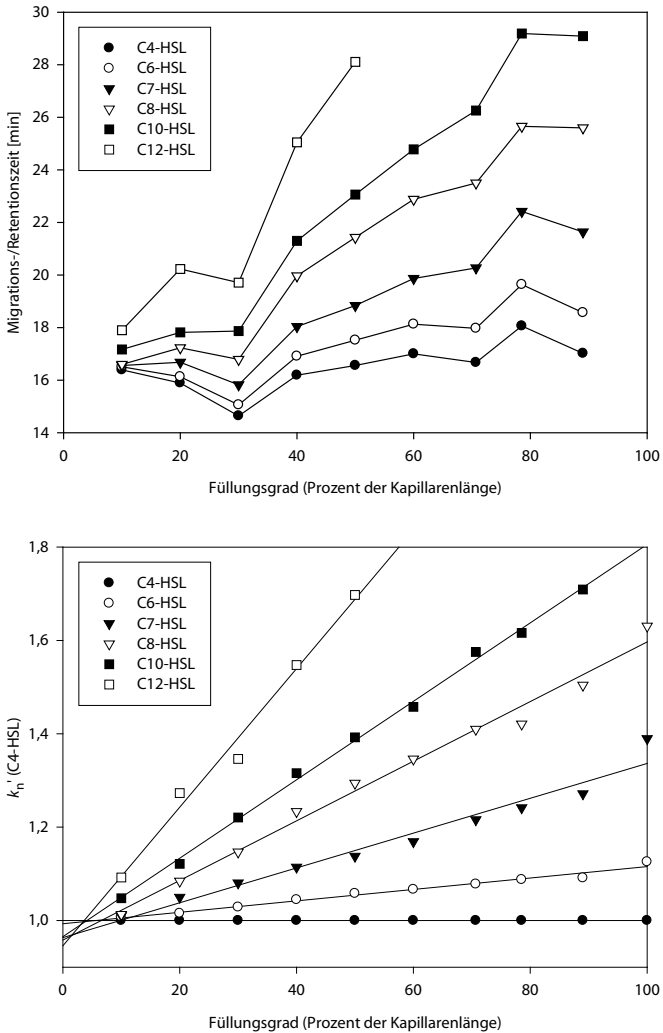
trotz optimierter Puffer- und Konditionierungsbedingungen eine Kontamination des Massenspektrometers mit SDS ( $m/z$  310,  $[\text{SDS} - \text{Na} + \text{NH}_4 + \text{NH}_3]^+$ ) unvermeidlich.

### 3.2.6 Quantifizierung in der *Partial-filling*-MEKC/MS

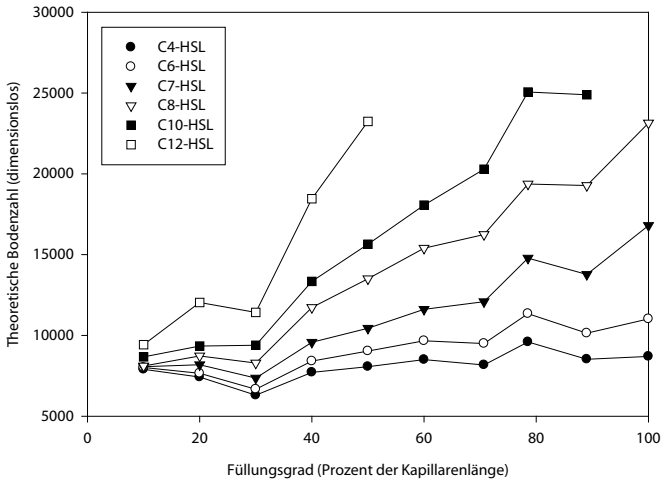
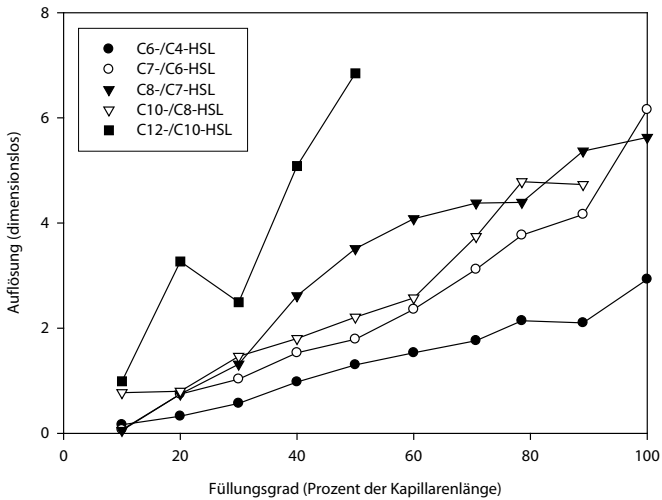
Ungeachtet der nach der Normierung auf C4-HSL *qualitativ* hinreichend reproduzierbaren Ergebnisse der *partial filling*-MEKC scheiterten alle Versuche zur Quantifizierung, bzw. führten zu Standardabweichungen von über 50% zwischen aufeinanderfolgenden Läufen unter gleichen Bedingungen. Dieser Umstand kann auf Unregelmäßigkeiten bei der Druckapplikation (hydrodynamische Injektion von Probe und SDS-Zone) zurückgeführt werden. Hierdurch kommt es (in offensichtlich nicht reproduzierbarer Weise) zu einer Kontamination der Ionenquelle mit SDS und damit zu einer Ionenunterdrückung bei der ESI (vgl. Abschnitt 3.2.2) mit SDS. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  der Einzelstandards können in der MEKC jedoch (in »guten« Läufen) noch mit einem Signal-Rausch-Verhältnis  $> 3$  (*limit of detection*, LOD) nachgewiesen werden.

### 3.2.7 Realprobenmessungen in der *Partial-filling*-MEKC/MS

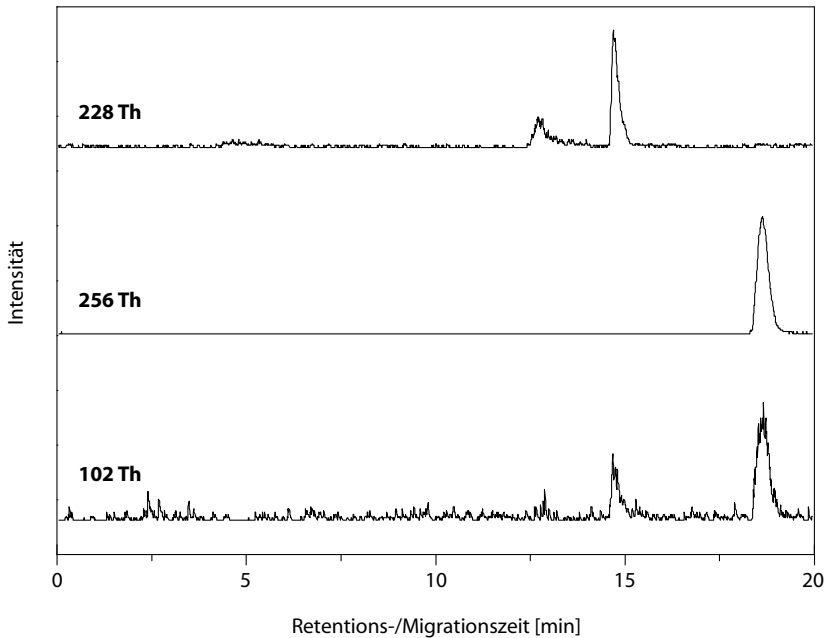
In Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse einer Realprobenmessung (Dichlormethanextrakt aus einem *Burkholderia cepacia*-Kulturüberstand) unter optimierten Bedingungen dargestellt. Die temperaturinduzierte Fragmentierung erlaubt eine eindeutige Zuordnung der Peaks zu C8-HSL und C10-HSL. Eine Quantifizierung der produzierten HSL konnte aufgrund der in Abschnitt 3.2.6 dargestellten Schwierigkeiten nicht vorgenommen werden; allerdings kann aufgrund der Signal-Rausch-Verhältnisse von einer überwiegenden Produktion von C10-HSL ausgegangen werden, C6- und C8-HSL werden in weit geringerem Umfang gebildet.



**Abbildung 3.19.** Einfluß der Kapillarenfüllung auf die Trennung in der MEKC/MS (Puffer 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0/Teilfüllung mit 10 mM SDS in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0). **Oben:** Rohdaten, **unten:** Normalisierung zu  $k'_n$ . Zu Details vgl. Text. Abbildung nach FROMM-BERGER *et al.* (2003).



**Abbildung 3.20.** Trennparameter (**oben:** Auflösung benachbarter Peakpaare, **unten:** theoretische Bodenzahlen) in der MEKC/MS. Bestimmung aus 45 Peaks mit mittlerer Basisbreite  $0,738 \pm 0,102$  min. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2003).



**Abbildung 3.21.** Realprobenmessung in der MEKC unter optimierten Bedingungen (*B. cepacia* LA-3: Puffer 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0/Teilfüllung mit 60% 10 mM SDS in 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0; 250 °C). Dichlormethanextrakt, 20:1. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2003).

### 3.3 Nano-LC/Massenspektrometrie

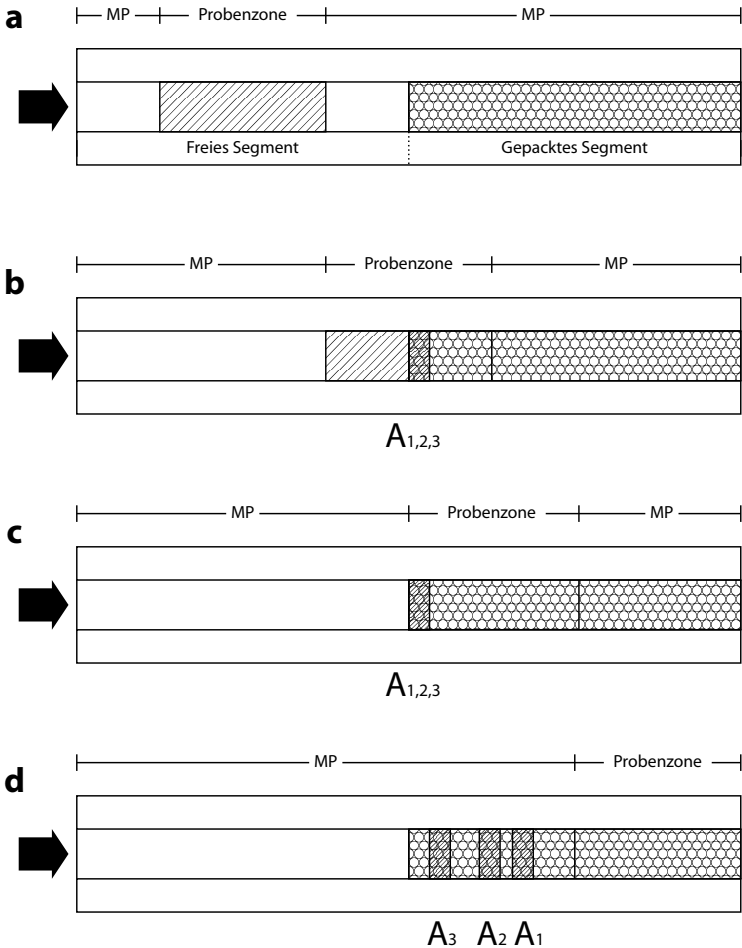
Die miniaturisierte HPLC (Nano-HPLC, Nano-LC, *nanobore* LC) setzt sich vor allem im Bereich der *Proteomics* immer mehr durch und stellt vor allem auch bei der Kopplung an die Massenspektrometrie die Methode der Wahl dar (vgl. Abschnitt 2.2). Kritischer Punkt ist jedoch, wie ebenfalls bereits oben dargestellt, die Beladungskapazität der verwendeten Säulen. In der HPLC erfolgt der Probenauftrag im theoretischen Idealfall *punktförmig*, bzw. in einem im Verhältnis zur Säule sehr kleinen Volumen. Die in der Nano-LC verwendeten Säulen besitzen jedoch selbst bereits sehr geringe Volumina (0,66 µl bei einer 75 µm-Säule von 20 cm Länge im *ungefüllten* Zustand), was den Einsatz spezieller Nano-Injektoren oder die Verwendung von *online*-Aufkonzentrierungstechniken erfordert. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten stand kein Nano-Injektionssystem zur Verfügung, ein Einsatz wurde auch deswegen verworfen, weil durch die Injektion minimaler Volumen auch die Sensitivität der Methode abnimmt (zur Diskussion vgl. Abschnitt 3.6).

In Abbildung 2.4 ist ein System zur Probenaufkonzentrierung durch eine zwischengeschaltete *trapping*-Säule dargestellt, in den hier vorzustellenden Versuchen wurde ein System zur Probenaufkonzentrierung auf *einer* Säule entwickelt und näher charakterisiert (Abbildungen 3.22 und 3.23; FROMMBERGER *et al.*, 2004): Die zu messende Probe wird hierbei in wässriger Matrix bereitgestellt (bei anionischen Spezies bei niedrigem pH), die Injektion erfolgt in einem Volumen von 1-5 µl. Im Verhältnis zur verwendeten Säule überschreitet das Volumen der injizierten Probe das der Säule dabei um ein Vielfaches. Passiert die Probenzone mit den Beginn der Säule, werden hydrophobe Analyten hier aufkonzentriert; Salze und polare Analyten passieren die Säule hingegen unbeeinflusst. Die Elution und Trennung der Verbindungen wird durch die nachfolgende organische Phase bewirkt. Die Methode vereint somit Prinzipien der Festphasenextraktion (SPE) und Flüssigkeitschromatographie. Vergleichbare Ansätze wurden in der Kapillar-HPLC (CAPPIELLO *et al.*, 1997; REZAI *et al.*, 1996) und neuerdings in der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC: PING *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2000b) verfolgt.

#### 3.3.1 Herstellung von Trennkapillaren

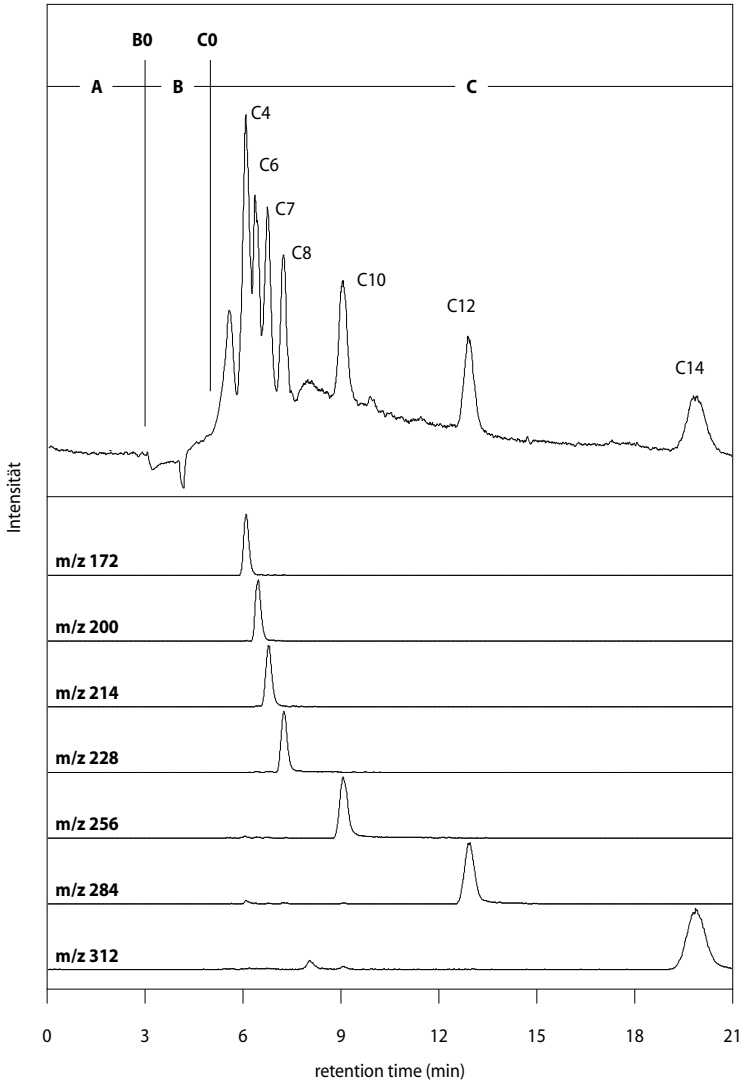
Die Herstellung der Trennsäulen erfolgte auf Basis der zusammenfassenden Angaben bei COLÓN *et al.* (2000) in einer selbstkonstruierten Füllstation (siehe Abbildung B1 im Anhang) Zur Anfertigung einer bestimmten Säulenstrecke wurde jeweils etwa die doppelte Länge einer freien *fused-silica*-Kapillare (50-100 µm Innendurchmesser, 360 µm Außendurchmesser) verwendet. Die Säule wurde an einer Seite mit einer temporären Fritte verschlossen. Hierzu wurde die Kapillare wiederholt senkrecht auf eine mit Normalphasen-Silica (5 µm) belegte Oberfläche gestoßen, bis das Kapillarende bis zu einer Länge von ca. 1 mm mit Silica befüllt war. Der gefüllte Bereich wurde über der Gasflamme bis zur Rotglut erhitzt (gesintert) und die Säule mit dem freien Ende an die Hochdruckpumpe angeschlossen.

Die Füllung der Kapillare erfolgte mit einer Acetonsuspension von C18-modifiziertem



**Abbildung 3.22.** Ablauf der Aufkonzentrierung und Trennung durch die entwickelte Nano-LC-Methode (schematisiert). Die mit mobiler Phase (MP) gefüllte Trennsäule wird mit der Analytenlösung (Analyten **A1**, **A2**, **A3**) in wässriger Matrix (Sample Plug) beschickt (a). Während der Passage der Grenzzone zwischen ungepacktem und gepacktem Säulensegment erfolgt eine Aufkonzentrierung der Analyten entsprechend ihrer Verteilungskoeffizienten an der stationären Phase (b und c). Die Elution und Trennung der Analyten wird durch die nachfolgende organische Phase bewirkt (d). Abbildung nach [FROMMBERGER et al. \(2004\)](#).





**Abbildung 3.23.** Praktische Umsetzung der in [Abbildung 3.22](#) dargestellten Konzepte in der Nano-LC: Messung eines Standardgemisches mit  $1 \mu\text{g/ml}$  unter Standardbedingungen. **Oben:** Gesamtionenstrom, **Unten:** Massenspuren der Analyten. In der Vorlaufphase **A** eluiert Lösungsmittel; die Elution der Probenmatrix (wäßrig, **B**) verursacht Störungen im Gesamtionenstrom. Die Elution und Auftrennung der Analyten erfolgt durch die nachfolgende mobile Phase (**C**). Abbildung nach [FROMMBERGER et al. \(2004\)](#).

Silicagel (ca. 5% *w/v*, Ultraschall). Ca. 1 ml der Aufschlämmung wurde mit einer Spritze in das Reservoir eingebracht. Mit Hochdruck (300 bar) wurde die Suspension unter Ultraschall in die Säule gepumpt (ca. 2 min). Der gleichmäßige Fluß der Suspension und die Regelmäßigkeit der entstehenden Packung wurde am Durchlichtmikroskop überprüft. Nach vollständiger Füllung der Kapillare wurde der Druck durch Ausschalten der Pumpe langsam abgebaut (einige Stunden) und die Säule von der Zuleitung getrennt. Um verbleibende Reste der Silicagelsuspension im Reservoir zu entfernen erfolgte ein Spülschritt mit Aceton und Wasser. Die Säule wurde anschließend erneut am freien Ende mit der Pumpe verbunden und die Packung durch Hochdruck verdichtet (120 min, Wasser, 400 bar). Zur weiteren Verdichtung erfolgten die letzten 30 min dieses Schrittes im Ultraschallbad. Während dieses Vorgangs setzt sich das Säulenmaterial um ca. 10%.

Die Herstellung der ersten endgültigen Fritte erfolgte noch unter Hochdruck durch Sintern am elektrischen Glühdraht. Dieser wurde am offenen Ende der Säule, ca. 5 cm innerhalb der Packung, schlaufenförmig um die Kapillare gelegt und einer Spannung von 30 V ausgesetzt (25 A, gradueller Auf- und Abbau der Spannung in jeweils 4 sec). Nach diesem Schritt erfolgte der Druckabbau wie oben. Die temporäre Fritte wurde entfernt, die Kapillare gedreht und erneut von der nunmehr offenen Seite aus wie oben verdichtet. Die zweite endgültige Fritte wurde entsprechend der ersten angefertigt. Vor der Verwendung wurde überschüssiges Säulenmaterial (oberhalb der Fritten) durch Druck aus der Kapillare entfernt. Die Säule wurde an einem Ende unmittelbar neben der Fritte, am anderen Ende unter Erhaltung eines 5 cm langen offenen (ungefüllten) Segments durchtrennt. Zum Schutz der brüchigen Frittenregion dienen geeignete PTFE-Schlauchstücke.

### 3.3.2 Aufbau der Nano-LC-Anlage

In der Nano-LC wurde mit einem selbstkonstruierten System mit »klassischen« HPLC-Pumpen gearbeitet. Diese Herangehensweise erlaubt zwar die Verwendung vorhandener Geräte (speziell angepasste Niedrigfluß-Pumpen sind nicht erforderlich) und ist dadurch relativ einfach und kostengünstig zu realisieren, es ergeben sich jedoch eine Reihe von Einschränkungen: Aufgrund der im Verhältnis zu den verwendeten Flußraten überdurchschnittlich großen Volumina der Zuleitungen kann in der vorgestellten Anordnung nicht mit Gradienten gearbeitet werden, da diese die Säule erst nach nicht vertretbar langer Zeit erreichen; die Elution erfolgte daher ausschließlich isokratisch. Bei Verwendung eines Flußsplitters (siehe unten) kann eine exakte Flußrate vor allem bei unterschiedlichen Gegendrücken der Säule und unterschiedlichen Viskositäten nicht ohne weiteres bestimmt werden, die Elution erfolgte daher isobar (im Gegensatz zur konstanten Flußrate in der klassischen HPLC).

Für den Aufbau der HPLC-Anlage wurde zunächst die HP 1100 HPLC-Pumpe (siehe Anhang B2) verwendet und die mobile Phase über einen Flußsplitter mit zwei Kapillaren unterschiedlicher Durchmesser bereitgestellt (T-Stück: 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser, 50 cm Länge und 75  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser, 20 cm Länge); die 75  $\mu\text{m}$ -Kapillare diente der Zuleitung zum Injektionsventil, die 50  $\mu\text{m}$ -Kapillare dem Druckausgleich. In einer

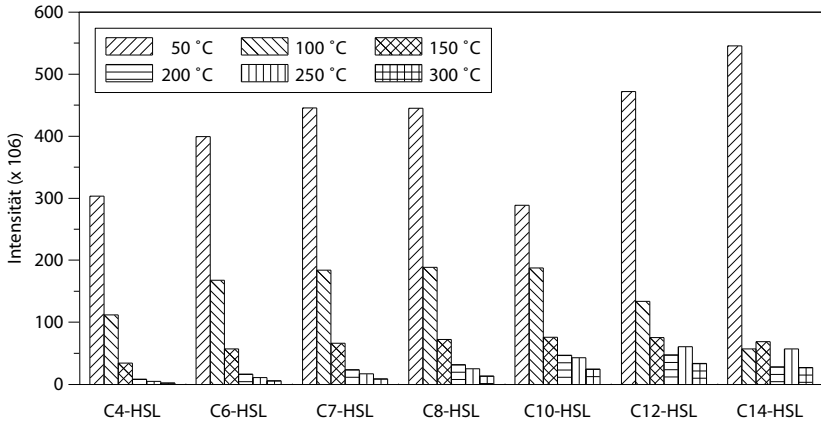
späteren Ausbaustufe wurde die Pumpe ausgetauscht (PE Series 200). Hierdurch konnte auf den Flußsplitter verzichtet werden, da die Pumpe die Einstellung eines Maximaldruckes erlaubt, der über die Zeit aufrecht erhalten wird. Alle weiteren Angaben zu den verwendeten Drucken beziehen sich auf die zweite Ausbaustufe. Für Quantifizierungsmessungen wurde der gesamte Meßraum auf  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  temperiert um reproduzierbare Viskositäten zu erhalten.

Die entsprechend Abschnitt 3.3.1 hergestellte Trennkapillare wurde entweder direkt mit dem freien Segment oder unter Verwendung eines Verbindungsstückes (50  $\mu\text{m}$  ID fused-silica, 20 cm Länge) mit dem Ausgangsport eines 6-Port Mikro-Injektionsventils (VICI CN2 für 1  $\mu\text{l}$ -Injektionen, VICI C3 für 5  $\mu\text{l}$ -Injektionen) verbunden, die entgegengesetzte Seite endete direkt in der Ionenquelle. Soweit nicht anders vermerkt, kam für die Nano-HPLC hierbei ein *sheath liquid*-System (vgl. Abschnitt 3.1.3) zum Einsatz.

### 3.3.3 Optimierung der MS-Bedingungen

Um zu harsche Gradienten im Taylor-Konus zu vermeiden und zusätzliche Addukt- und Clusterbildung durch »fremde« organische Lösungsmittel zu unterdrücken, wurden als Kontaktflüssigkeiten Wasser-Methanollösungen mit Essig- oder Ameisensäure verwendet und semisystematisch hinsichtlich der visuell beobachtbaren Spraystabilität optimiert. Mit einer 50/50/1 (Wasser/Methanol/Essigsäure) konnten hier optimale Bedingungen erzielt werden, eine Verwendung von Ameisensäure führte hingegen zu einer zu starken Erhöhung des Stromflusses zwischen Ionisierungsnadel und Heizkapillare sowie zu einem übermäßigen Auftreten von Spannungsüberschlägen bei nur geringen Veränderungen der Ionisierungsspannung. 50% Methanol bot (im Gegensatz zu 20% oder 80%) hinreichend Spraystabilität bei einer Änderung der Spannung im Bereich von 3,5 bis 4,5 kV; für die Trennungen wurde ein Wert von 4,0 kV verwendet. Eine Verringerung der Flußrate führt in der ESI zu einer Erhöhung der Sensitivität (vgl. Abschnitt 2.2.2), entsprechend wurde die Flußrate der Kontaktflüssigkeit auf den mit den verwendeten Pumpen geringstmöglichen Wert eingestellt (1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Der Abstand zwischen Ionisierungsnadel und Gegenelektrode wurde auf 5 mm eingestellt.

Neben dem Quasimolekülion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  wurde im Massenspektrometer jeweils ein prominentes Signal mit  $m/z$   $[\text{M}+17]^+$  und ein weiteres mit  $m/z$   $[\text{M}+74]^+$  detektiert. Der  $[\text{M}+17]^+$ -Peak ist vermutlich das Resultat einer Ammoniumanlagerung, seine Intensität übersteigt bei einer Heizkapillarentemperatur von  $50^\circ\text{C}$  die des Quasimolekülions um das Zehnfache. Da, wie aus den Ergebnissen der CE (Abschnitt 3.2.3) ersichtlich, die optimale Temperatur der Heizkapillare einen Kompromiss zwischen Adduktunterdrückung und thermischer Zersetzung darstellt, wurde diese unter Realbedingungen (Trennungen von HSL-Standardgemischen) im Temperaturbereich von  $50\text{--}300^\circ\text{C}$  in Schritten von  $25^\circ\text{C}$  optimiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Das Signal mit  $m/z$   $[\text{M}+17]^+$  konnte bei  $200^\circ\text{C}$  nahezu vollständig unterdrückt werden (Verhältnis  $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+17]^+ < 1$ ), allerdings sank bei dieser Temperatur die Intensität von  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  auf 2,5% (C4-HSL) bis 9,0% (C14-HSL) des  $50^\circ\text{C}$ -Wertes. Die beobachtete höhere thermische Stabilität der langkettigen HSL kann durch die freie Beweglichkeit der Seitenkette erklärt werden, die mehr sterische Positionen erlaubt. Im



**Abbildung 3.24.** Temperaturstabilität der HSL in der Nano-LC im Bereich von 50-300 °C Heizkapillarentemperatur, 50 °C-Schritte dargestellt. Zu Details vgl. Text. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2004).

**Tabelle 3.1.** Optimierte Fragmentierungsenergien in der LC-MS für strukturelle Charakterisierung (MS/MS) und Quantifizierung im SRM. Tabelle nach FROMMBERGER *et al.* (2004).

Verbindung	C4-HSL	C6-HSL	C7-HSL	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	C14-HSL
MS/MS	20%	20%	20%	22.5%	22.5%	25%	25%
SRM	25%	25%	25%	27.5%	27.5%	30%	30%

Sinne der thermischen Stabilität alleine stellen 50 °C den Idealwert dar, allerdings war bei einer derart geringen Temperatur ein deutlicher Verlust in der Auflösung der Spektren durch unvollständige Entfernung von Wasser und Lösungsmittel zu beobachten. Für die folgenden Messungen wurden daher 100 °C verwendet.

Standardmischungen wurden mit *full scan* MS, *full scan* MS/MS, und im *single reaction monitoring* (SRM) gemessen, bei letzterem wurde die charakteristische Fragmentierung der Analyten zu  $m/z$  102 ausgenutzt, wie sie bereits in der MEKC beobachtet worden war (Abschnitt 3.2.3). Sowohl für die strukturelle Charakterisierung (bei einer Anwesenheit *aller* diagnostischer Peaks von Bedeutung ist), als auch für die SRM-Quantifizierung (bei der eine optimale Intensität von  $m/z$  102 anzustreben ist), wurden die Fragmentierungsenergien optimiert; die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

### 3.3.4 Optimierung der Trennbedingungen

Die Trennung der Analyten wurde mit binären Mischungen aus Wasser/Methanol und Wasser/Acetonitril untersucht (Gradienten konnten nicht verwendet werden, s. o.). Bei-

de organischen Lösungsmittel lieferten vergleichbare Ergebnisse in der Trennung, Methanol bewirkte jedoch eine geringere Beeinflussung der Detektion (Clusterbildung). In Abbildung 3.25 sind Messungen bei unterschiedlichen Methanolgehalten dargestellt, da der Hauptaugenmerk in den vorgestellten Untersuchungen auf der Messung von Homoserinlactonen einer Kettenlänge von 6-12 lag, wurde in weiteren Untersuchungen ein Methanolgehalt von 80% verwendet: Hierdurch wird eine Basislinientrennung von C8- und C10-HSL erzielt. Die Analyten sind neutral, auf einen Zusatz von Essigsäure, Ameisensäure oder TFA konnte daher verzichtet werden (in punktuellen Testmessungen wurde keine Verbesserung der Trennung beobachtet).

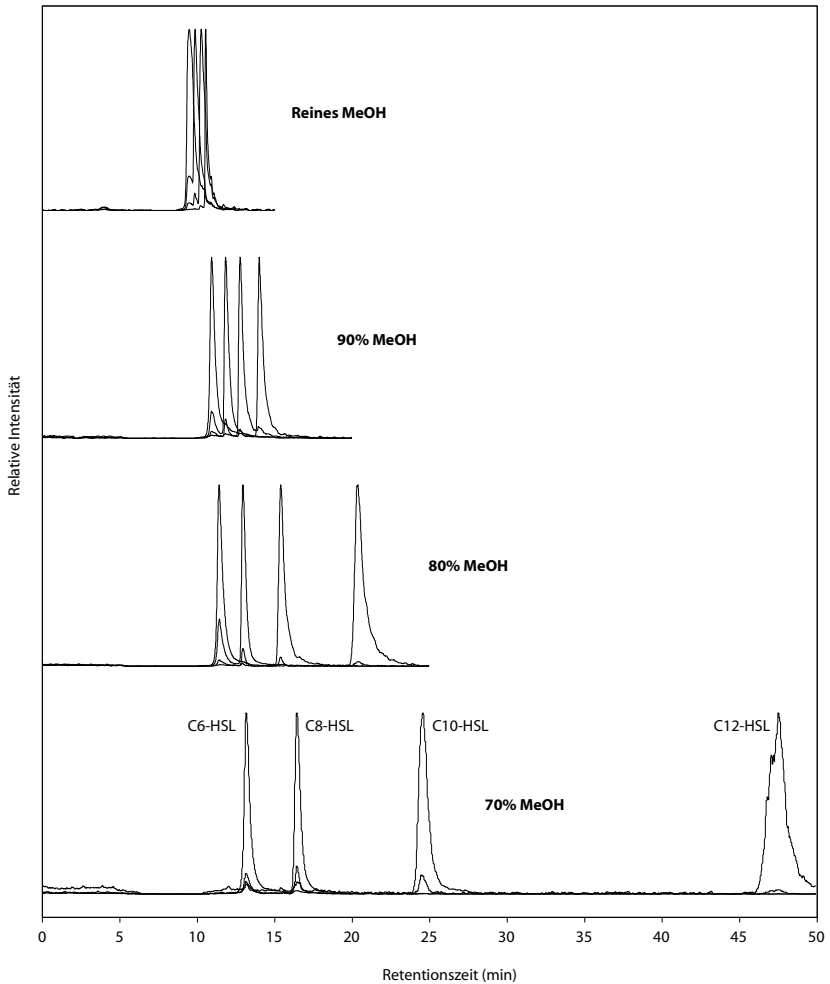
Der Druck wurde auf 150 bar eingestellt (resultierende Flußrate ca. 300 nl/min), geringere Werte bewirkten eine übermäßige Verlängerung der Analysenzeit bei unwesentlich verbesserter Trennleistung; bei Anwendung höherer Drucke (200 bar) wurde ein trotz vorheriger Anwendung von Helium, Ultraschall oder Vakuum ein Ausgasen der mobilen Phase beobachtet. Der Einfluß der Zusammensetzung der Probenmatrix wurde durch Zugabe unterschiedlicher Lösungsmittelgehalte untersucht: Bei 30% Methanol ist ein Durchbruch des oben dargestellten Aufkonzentrierungsmechanismus zu beobachten (Abbildung 3.26). Die Zugabe von Essig- oder Ameisensäure bewirkte eine geringfügige Verschmälerung der Peaks, allerdings in höheren Konzentrationen auch ein Auftreten von Abbauprodukten, weshalb auch im Sinne einer möglichst einfachen Probenaufbereitung hierauf verzichtet wurde.

### 3.3.5 Realproben

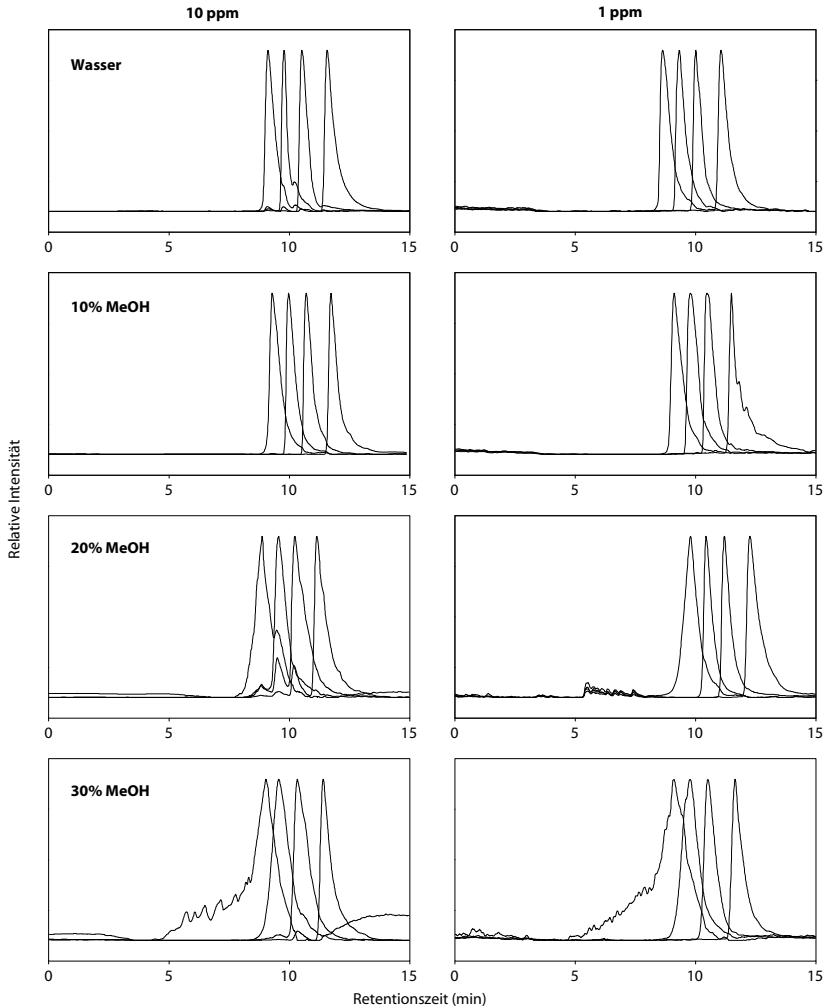
Aufgrund hoher Hintergrundsignale und von Matrixeffekten durch die hohe Komplexität der Probenzusammensetzung (Abschnitt 1.6) konnte in unbehandelten Kulturüberständen keine einzige der Zielverbindungen detektiert werden, weshalb zunächst auf normale Chloroformextrakte (20:1) zurückgegriffen wurde. Die Abbildungen 3.27 und 3.27 zeigen die Bestimmung von C8-HSL und C10-HSL in einem *Burkholderia cepacia* Kulturextrakt (Stamm JA-8). Aufgrund der Sensitivität der Methode konnte auf die Aufkonzentrierung verzichtet werden, Abbildung 3.29 zeigt die Messung einer Probe im SRM, 1 ml Kulturüberstand wurde hier mit  $3 \times 1$  ml Chloroform ausgeschüttelt.

### 3.3.6 Quantifizierung

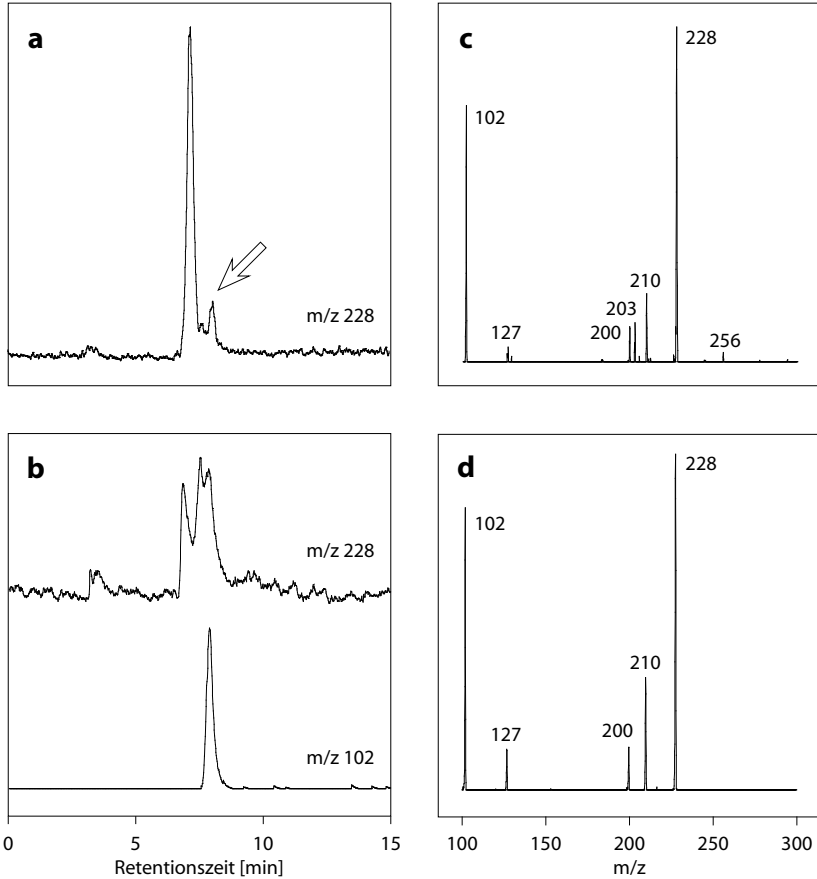
Die Quantifizierung wurde an HSL-Standardgemischen im *full-scan*-MS und im SRM vorgenommen (Abbildung 3.30) Die Eichung für C12-HSL and C14-HSL erwies sich hierbei aufgrund der durch die hohe Retentionszeit bedingte Peakverbreiterung als schwierig. Die Quantifizierungs- (LOQ) und Detektionslimits (LOD, definiert als Signal-/Rauschverhältnis  $> 10$  bzw.  $> 3$  betragen im *full scan* 50 ng/ml bzw. 10 ng/ml; im SRM erreichen die Werte 10 ng/ml (LOQ) bzw. 1 ng/ml (LOD) und mithin 3,9 nM bis 5,8 nM (C10-HSL-C4-HSL). Die beim LOD injizierte Probenmenge beträgt 1 pg bzw. 3,9-5,8 fmol.



**Abbildung 3.25.** Trennleistung einer 20 cm Nano-LC-Säule (Abschnitt 3.3.2) bei unterschiedlichen Methanolgehalten der mobilen Phase. Injektion 1 µg/ml HSL-Standards (in 1 µl Wasser), Säule mit Verbindungsstück (20 cm) am Injektionsventil, daher gegenüber Abbildung 3.23 verlängerte Retentionszeiten und Peakverbreiterung. Druck 150 bar.

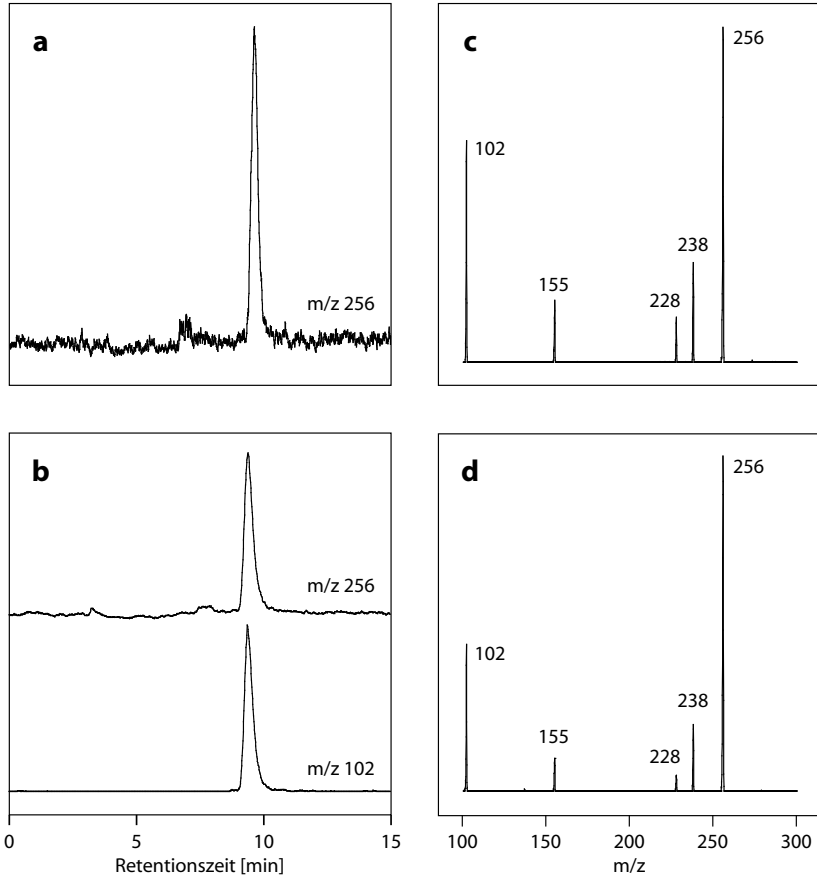


**Abbildung 3.26.** Trennleistung einer 20 cm Nano-LC-Säule (Abschnitt 3.3.2) bei unterschiedlichen Methanolgehalten der Matrix. Injektion 10  $\mu\text{g/ml}$  (linke Spalte) bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$  (rechte Spalte) HSL-Standards in 1  $\mu\text{l}$  Wasser mit 0-30% Methanol. Säule mit Verbindungsstück (20 cm) am Injektionsventil, daher gegenüber Abbildung 3.23 verlängerte Retentionszeiten und Peakverbreiterung. Druck 150 bar.

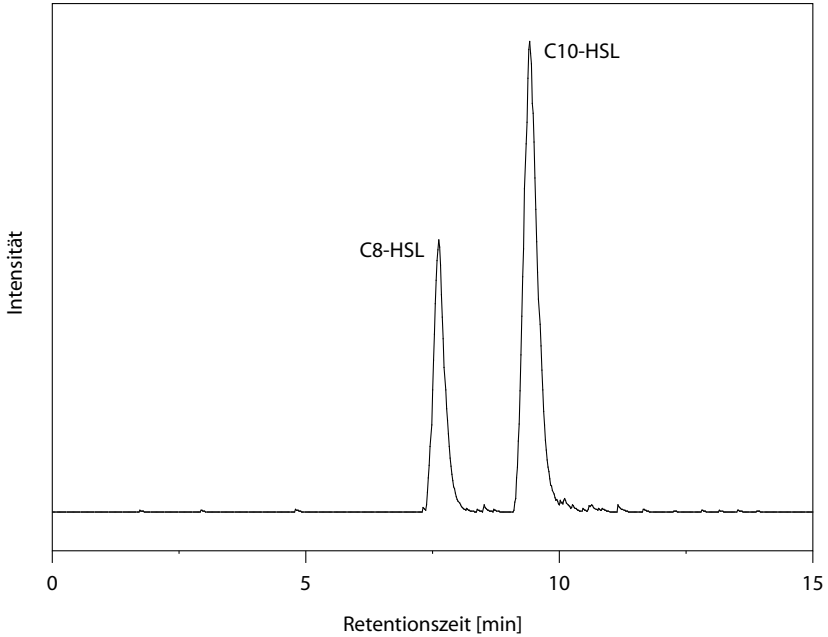


**Abbildung 3.27.** Bestimmung von C8-HSL in einem *Burkholderia cepacia* JA-8 Kulturextrakt (10:1): **a)** Massenspur  $m/z$  228 im full-scan (MS), **b)** Massenspuren  $m/z$  228 und  $m/z$  102 im full-scan (MS/MS, 22.5% CID auf  $m/z$  228), **c)** Spektrum beim Peakmaximum von  $m/z$  102 (Teilabbildung **b)**, **d)** Spektrum beim Peakmaximum von  $m/z$  102 (Standard, 100 ng/ml, identische Bedingungen).

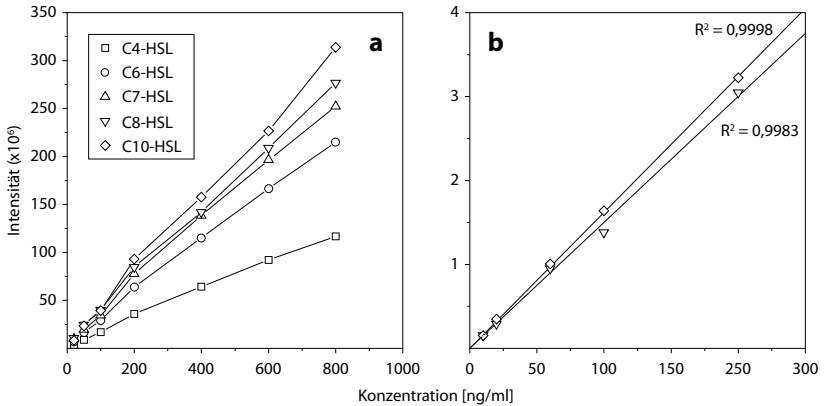




**Abbildung 3.28.** Bestimmung von C10-HSL in einem *Burkholderia cepacia* JA-8 Kulturextrakt (20:1): **a)** Massenspur  $m/z$  256 im *full-scan* (MS), **b)** Massenspuren  $m/z$  256 und  $m/z$  102 im *full-scan* (MS/MS, 22.5% CID auf  $m/z$  228), **c)** Spektrum beim Peakmaximum von  $m/z$  102 (Teilabbildung **b)**, **d)** Spektrum beim Peakmaximum von  $m/z$  102 (Standard, 100 ng/ml, identische Bedingungen). Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2004).



**Abbildung 3.29.** Bestimmung von C8-HSL und C10-HSL als  $m/z$  102-Fragment in einem *Burkholderia cepacia*-Kulturextrakt ( $3 \times 1$  ml Chloroform). SRM mit 27.5% CID auf  $m/z$  228 (0-8,5 min) und auf  $m/z$  256 (8,5-15 min). Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2004).



**Abbildung 3.30.** Quantifizierung von HSL-Standards in der Nano-LC/MS im *full-scan* (a) und im SRM (b).

### 3.3.7 Modifikationen und Weiterentwicklungen

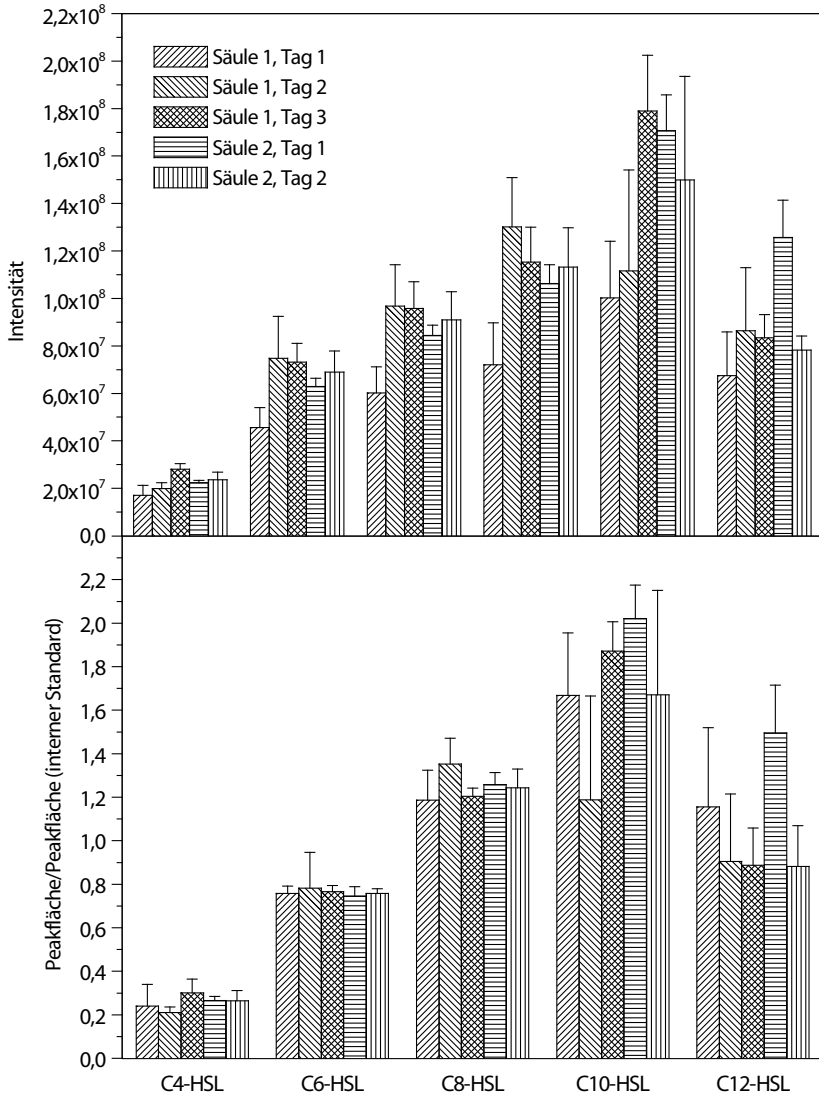
Die in Abschnitt 3.3.1 dargestellte Herstellung der Trennsäulen erwies sich in der Praxis vor allem hinsichtlich der Produktion geeigneter Fritten als heikel: Die Herstellung durch einen elektrischen Glühdraht verursacht häufig ein Aufreißen des Packungsmaterials durch die Hitzeentwicklung, im Extremfall ist die betreffende Region dadurch vollständig geleert und keine Fritte mehr herstellbar. Die gesinterten Regionen tragen darüberhinaus keine Polyimidbeschichtung; hierdurch ist die produzierte Säule stark bruchgefährdet und somit nur schwer handhabbar.

In einem weiteren Schritt wurde daher ein vereinfachtes Herstellungsverfahren für die Säule verwendet: Die Kapillare wurde lediglich mit *einer* Endfritte (vgl. Abschnitt 3.3.1: »temporäre Fritte«) versehen und bis zu einer vorher festgelegten Länge mit Trennmaterial befüllt (i. d. R. 20 cm). Aufgrund der langsameren Sedimentation wurde das Packungsmaterial in 2-Propanol aufgeschlämmt. Nach der Befüllung wurde die Kapillare lediglich von einer Seite im Ultraschallbad verdichtet.

Die hierdurch hergestellten Säulen weisen einen deutlich geringeren Gegendruck auf, weswegen hier auch höhere Injektionsvolumina (2 und 5  $\mu\text{l}$  mit Valco C3-Ventil) erprobt werden konnten. Allerdings steigt die Peakfläche bei diesen Volumina nicht wie zu erwarten linear an; außerdem konnte bei Eichungsmessungen kein linearer Bezug zwischen Probenkonzentration und Peakfläche gefunden werden, was auf eine unvollständige Adsorption der Analyten aus dem Probenplug (vgl. Abbildung 3.22) schließen lässt. Eine Messung mit 5  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen kann daher allenfalls für eine qualitative Bestimmung geringster Analytenkonzentrationen verwendet werden, ist jedoch für Quantifizierungsmessungen ohne Wert.

In Abbildung 3.31 sind Reproduzierbarkeitsdaten für die Nano-LC-Säulen dargestellt. Wie ersichtlich, schwanken die Werte teils beträchtlich; die Unterschiede zwischen den Säulen werden von den *intra-day*- bzw. *inter-day*- Schwankungen überlagert. Keine nennenswerten Verbesserungen ergaben sich durch Verwendung eines internen Standards analog zu Abschnitt 3.4. Entsprechend problematisch gestaltete sich die Bestimmung der optimalen Säulenlänge und des optimalen Säulendurchmessers (die Durchmesser wurden von zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$ , die Packungslängen zwischen 5 und 20 cm variiert), für weitere Messungen wurde daher die bereits vorher verwendete Kombination (75  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser, 20 cm Packungslänge) weiterbenutzt. Eine Reduktion der Korngröße (4  $\mu\text{m}$  Superspher *non-encapped* und *encapped*) resultierte lediglich in einer Erhöhung des Säulengegendrucks, jedoch konnten keine Verbesserungen hinsichtlich analytischer Parameter verzeichnet werden.

Die Extraktion der HSL erfolgt in mikrobiologisch orientierten Arbeiten in der Regel noch immer ausschließlich durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln (vgl. Abschnitt C). Die Extraktionsausbeute wurde in der hier vorgestellten Arbeit durch Vorversuche mit etwa 60% (Ausschütteln mit Dichlormethan, Chloroform, Hexan, Essigsäureethylester und Mischungen) bestimmt, was die Verwendung eines internen Standards erforderlich macht (zu einer Diskussion vgl. Abschnitt 3.4). Zur Bestimmung der *Response-Faktoren* wurde NB-Medium mit 1  $\mu\text{g/ml}$  C7-HSL dotiert; die Konzentration der übrigen Analyten wurde zwischen 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  variiert. In



**Abbildung 3.31.** Reproduzierbarkeitsdaten von Nano-LC-Säulen vor (oben) und nach (unten) Normierung auf den internen Standard C7-HSL. Hypersil ODS, 75  $\mu\text{m}$ /20 cm; Mobile Phase 60% Acetonitril/0,1% Ameisensäure, 150 bar. Analyten 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 5% Acetonitril/0,1% Ameisensäure.  $n = 8$ .

**Tabelle 3.2.** Eichung mit internem Standard in der Nano-LC (»einfrittige« Säule wie in Abschnitt 3.3.7 dargestellt). NB-Medium mit 1 µg/ml C7-HSL dotiert; die Konzentration der übrigen Analyten zwischen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml variiert.

<b>0,1-1 µg/ml</b>	<b>C6-HSL</b>	<b>C8-HSL</b>	<b>C10-HSL</b>	<b>C12-HSL</b>
Steigung	0,71	1,35	1,87	0,98
Linearität ( $R^2$ )	0,9855	0,9962	0,9888	0,9820
<b>0,1-10 µg/ml</b>	<b>C6-HSL</b>	<b>C8-HSL</b>	<b>C10-HSL</b>	<b>C12-HSL</b>
Steigung	0,41	0,93	1,06	0,52
Linearität ( $R^2$ )	0,9890	0,9962	0,9888	0,9820

Tabelle 3.2 sind die Linearitätsdaten und die erzielten Steigungswerte dargestellt. Die Qualität der hier erzielbaren Daten läßt allerdings lediglich eine sehr grobe Quantifizierung der HSL in Realproben zu.

### 3.4 Kapillarzonenelktrophorese/Massenspektrometrie von Hydrolysaten

Die Tatsache, daß *N*-Acyl-Homoserinlactone (HSL) bei alkalischem pH nichtenzymatisch zu den jeweiligen Homoserinen (HS) hydrolysieren (vgl. Abschnitt 1.4), gab den Anstoß zu einer weiteren Analysestrategie (vgl. auch FROMMBERGER *et al.*, 2005). Die Hydrolyse der Lactone und eine anschließende Extraktion der Homoserine (also organischer Säuren) in der Anionentauscher-Festphasenextraktion (SPE) ermöglicht eine selektivere Probenaufreinigung als die konventionelle Dichlormethanextraktion und erstmalig die Bestimmung dieses wichtigen HSL-Abbauprodukts: die offenkettigen Formen zeigen der gängigen Lehrmeinung zufolge (ZHANG, 2003) keine biologische Aktivität und sind hierdurch der Biotektion nicht zugänglich. Homoserine sind als Säuren in der Kapillarzonenelktrophorese (CZE) trennbar, eine Zugabe von SDS (vgl. Abschnitt 3.2) mit den damit verbundenen Problemen erübrigt sich.

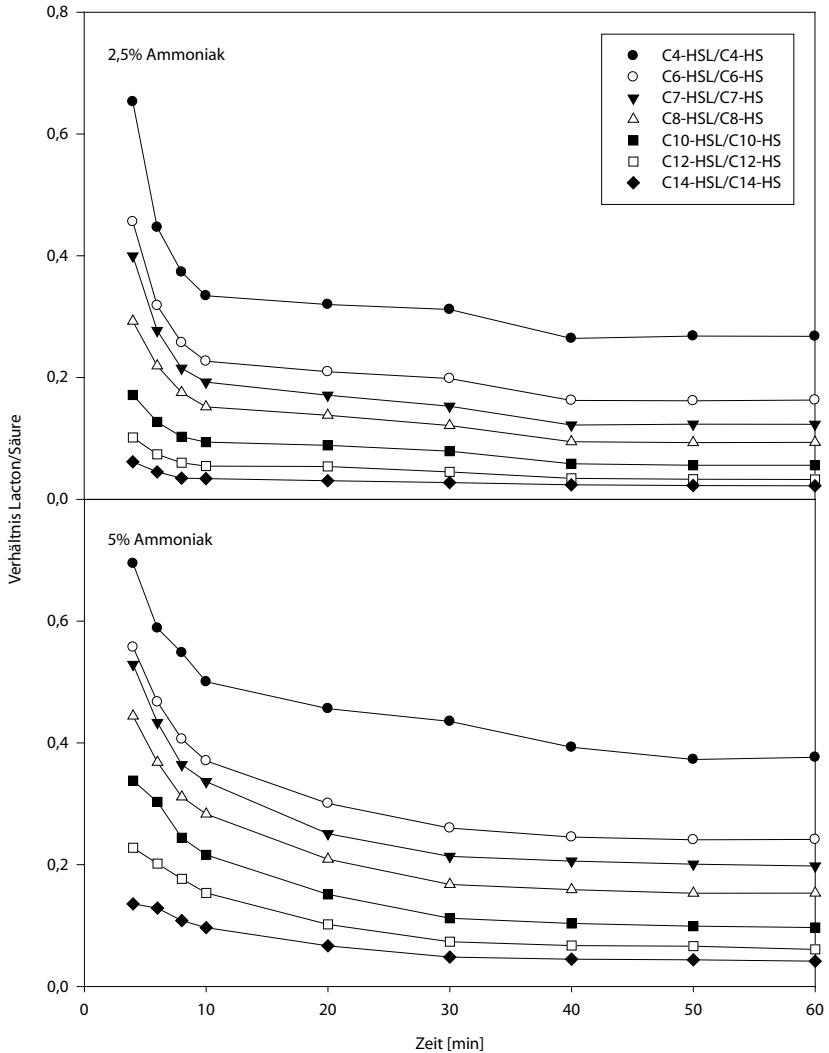
#### 3.4.1 Vorversuche zur Hydrolyse von HSL-Standards

Die Hydrolysekinetik der HSL wurde durch Zugabe von Ammoniak und Natronlauge in der Direktinfusion im MS und mit Kernresonanzspektroskopie ( $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  NMR) untersucht. Für Ammoniak (zwei unterschiedliche Konzentrationen) sind die mit MS ermittelten Daten in Abbildung 3.32 dargestellt. Die Hydrolysekinetik kommt in beiden Fällen nach 40 Minuten zum Stillstand, nur scheinbar ist jedoch hierdurch ein Rest an unhydrolysierten HSL nachzuweisen: In der ESI existiert ein Gleichgewicht zwischen Säure und Lacton (vgl. Abbildung 3.46 und Diskussion dort). Eine direkte massenspektrometrische Bestimmung der NaOH-Hydrolysate erwies sich als unmöglich, da bei der Direktinfusion ins Massenspektrometer ausschließlich Na-Cluster gemessen wurden. Da jedoch eine schnellere Hydrolyse (d. h. unter drastischeren pH-Bedingungen) erwünscht war, wurde für die Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse mit NMR gearbeitet.

#### 3.4.2 Vollständigkeit der Hydrolyse

Im NMR (zu Details vgl. Abschnitt B5) wurde die Hydrolyse an Standardlösungen von C4-, C8- (1 mg/ml in 1/1 Methanol- $d_6$ /D $_2$ O) und C14-HSL (1 mg/ml in abs. Methanol- $d_6$ ) untersucht. Die Messung erfolgte vor und zum frühestmöglichen Zeitpunkt (90 Sekunden) nach der Zugabe von 1/10 Volumen 1 N NaOD in D $_2$ O. Abbildung 3.33 gibt die Messung von C8-HSL bzw. dem Hydrolyseprodukt wieder. Die Peakzuordnung wurde analog zu den Angaben bei LAO *et al.* (1999) durchgeführt.

Die vier  $^1\text{H}$ -Signale mit  $\delta$  0.85 ppm,  $\delta$  1.29 ppm (Überlagerung aus vier Einzelsignalen; vgl. HSQC),  $\delta$  1.58 ppm und  $\delta$  2.29 ppm im Lactonspektrum können aufgrund der jeweiligen chemischen Verschiebung, der Kopplungsmuster (COSY) und der Integrale (etwa 3:8:2:2) der Octanoyl-Seitenkette des Moleküls zugeordnet werden. Die Seitenkettenresonanzen zeigen bei Zugabe von NaOD keine Verlagerung. Das zweite detektierbare Spinsystem korrespondiert mit dem geschlossenen bzw. offenen Lacton-



**Abbildung 3.32.** Vorversuche zur Kinetik der Lactonhydrolyse in Ammoniak unterschiedlicher Konzentration (Direktinfusion einer 100 µg/ml-Standardlösung mit 0,5 psi durch eine 50 µm/50 cm-Kapillare; 4,2 kV Ionisierungsspannung bei 150 °C). Die dargestellten Werte entstammen einer Integration von jeweils 2 min.

ring: Das Lactonspektrum zeigt zwei geminale Signale ( $^1\text{H}$  und HSQC) mit  $\delta$  4.34/4.50 ppm und  $\delta$  2.30/2.57 ppm, ersteres kann dabei aufgrund der  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung als 5H identifiziert werden. Entsprechend kann die Resonanz mit  $\delta$  2.30/2.57 ppm 4H und die Resonanz mit  $\delta$  4.58 ppm 3H zugeordnet werden. Nach Zugabe von NaOD zeigt sich hier eine Veränderung: Der breite Peak mit  $\delta$  3.60 ppm entspricht den geminalen 5H-Protonensignalen ( $^{13}\text{C}$ -Verschiebung mit  $\delta$  60 ppm im HSQC). Im COSY koppelt 5H sowohl mit geminalen Signalen (vgl. HSQC) bei  $\delta$  1.80/2.03 ppm (4H) und mit einer Resonanz bei  $\delta$  4.25 ppm (3H). Die Zuordnung wird durch die Integrale bestätigt (1:1:2:1, 4Ha:4Hb:5Ha,b:3H).

Bereits unmittelbar nach NaOD-Zugabe ist die Hydrolyse von C8-HSL zu C8-HS vollständig abgeschlossen und kein Rest an Lacton mehr nachzuweisen; vergleichbare Befunde wurden bei der Untersuchung von C4- und C14-HSL festgestellt. Die Verbindungen weisen in Wasser-Methanolgemischen nur geringe Stabilität auf: Bereits nach 24 h bei Raumtemperatur ist im NMR bei C4-HSL (Abbildung 3.34 A) in geringem Umfang die offenkettige Form nachzuweisen. Die Ringöffnung ist teilreversibel (Abbildung 3.34 B), allerdings reagiert auch nach 96 h bei pH 1 nur ein Teil der Säure auch wieder zum Lacton.

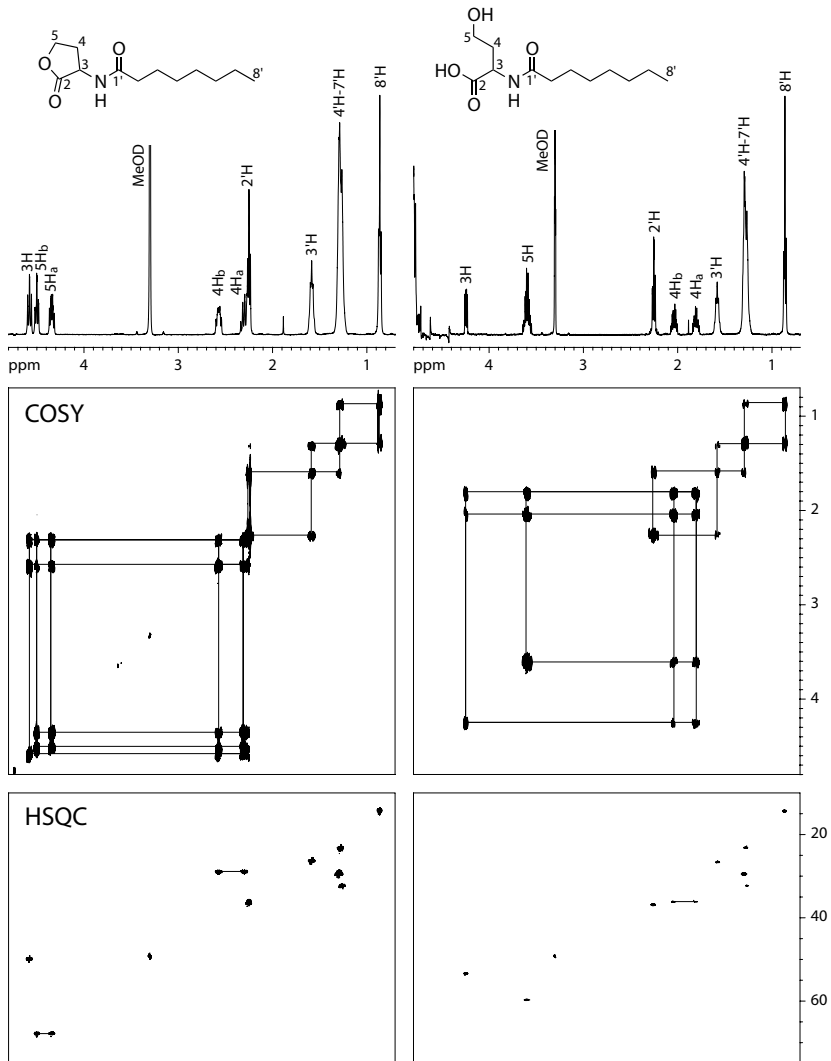
### 3.4.3 Extraktion der Homoserine

Eine Extraktion der HSL auf Basis unterschiedlicher *Hydrophobizitäten* ist aufgrund des sehr breiten LogP-Bereiches der Analyten (Abbildung D1 im Anhang, oben) kaum möglich; in einer testweise vorgenommenen Festphasen-Extraktion (SPE) mit C18-Säulen (verschiedene Materialien unterschiedlicher Hersteller, Methanolgradienten) eluiert C4-HSL erwartungsgemäß bereits in 10% Lösungsmittel, für die Elution von C14-HSL sind 100% Methanol erforderlich. Eine simultane und selektive Aufreinigung *aller* HSL ist daher hier schwierig, da in dem breiten LogP-Bereich zwangsläufig alle auf der Säule zurückgehaltenen Matrixkomponenten koeluiieren. Die Extraktion der *hydrolysierten* Verbindungen durch C18-SPE ist aufgrund der Hydrophobizitätsdaten (Abbildung D1 im Anhang) zwar denkbar, jedoch ist auch hier die Spezifität der Extraktionsmethode eingeschränkt.

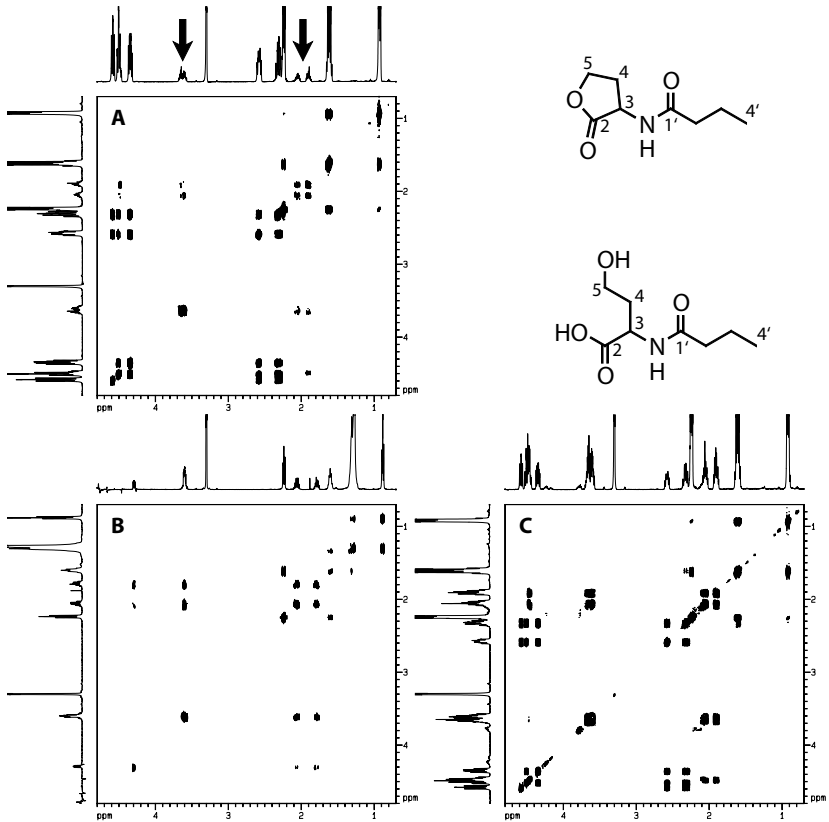
Für die Extraktion der Homoserine aus Bakterienkulturen wurde daher die Anionenaustauscher-Festphasenextraktion eingesetzt. Bei der verwendeten Phase (Waters OASIS MAX) handelt es sich um einen *mixed-mode*-Anionenaustauscher, bei dem die Analyten zunächst aufgrund hydrophober Interaktion (bei niedrigem pH) auf der Säule zurückgehalten werden. Nach Erhöhung des pH adsorbieren selektiv organische Anionen, neutrale Spezies und Kationen werden durch Methanol ausgewaschen. Die Elution der Zielanalyten erfolgt schließlich durch erneute Senkung des pH und Einsatz organischer Lösungsmittel. Die Hydrolyse von Standards und Realproben wurde entsprechend der Ergebnisse der NMR-Messungen mit 1/10 Volumen 1 M NaOH vorgenommen, die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur jeweils für 15 min.

Die Extraktionsbedingungen wurden mit wässrigen Standardhydrolysaten und mit dotiertem Medium (*Nutrient Broth*) ausgehend von der Originalvorschrift des Herstellers optimiert, die Bedingungen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Mit der Originalvor-





**Abbildung 3.33.** NMR-Spektren von 1 mg/ml C8-HSL in 50% Methanol-*d*<sub>6</sub> vor (linke Spalte) und 90 Sekunden nach Zugabe von 1/10 Volumen 1 N NaOD. Numerierung entsprechend LAO *et al.* (1999).

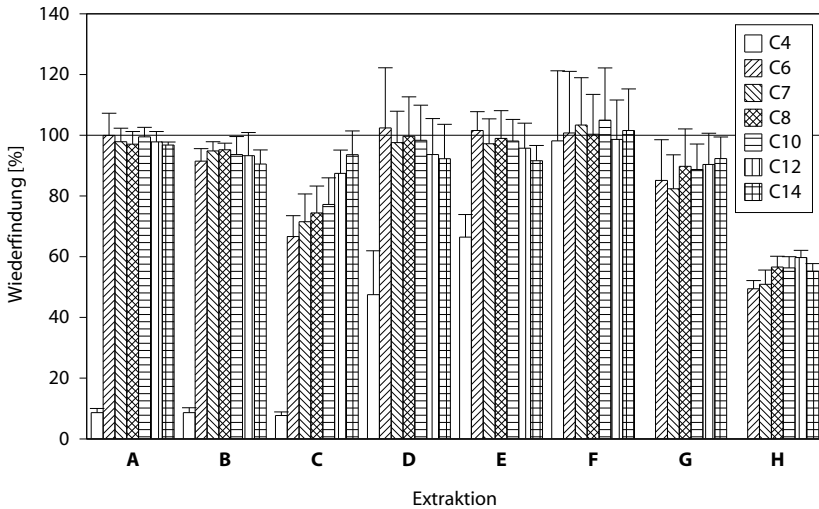


**Abbildung 3.34.** NMR-Spektren von 1 mg/ml C4-HSL in 50% Methanol- $d_6$ . Zur Peakzuordnung vgl. Abbildung 3.33. **A** Teilhydrolyse nach 24 h im Lösungsmittel (Raumtemperatur), Protonen der offenkettigen Form durch Pfeile gekennzeichnet. **B** Hydrolyse durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 N NaOD (Messung nach 90 s). **C** Rückreaktion nach Ansäuern mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 1, 96 h). Numerierung entsprechend LAO *et al.* (1999).

**Tabelle 3.3.** Optimierung der Homoserin-Extraktion durch Anionenaustauscher-SPE (Waters OASIS MAX). Volumen soweit nicht gesondert angegeben jeweils 3 ml (1 Säulenvolumen). **a)** 50 mM Ammoniumacetat, pH 7,0 + 10% MeOH; **b)** 20 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,2 + 10% 2-Propanol (CE-Puffer); **c)** 50 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,2 + 10% MeOH; **d)** 50 mM Ammoniumcarbonat, pH 9,2; **e)** NB-Medium (*Nutrient Broth*) 1:1 mit Wasser verdünnt; **f)** NB-Medium (*Nutrient Broth*) 1:1 mit Wasser verdünnt und pH-Einstellung (pH 2, Phosphorsäure). Elution der Analyten jeweils mit 2% Ameisensäure in MeCN und Rekonstitution nach Einengen zu 5 µg/ml.

Extraktion	Kond. 1	Kond. 2	Probe/Matrix (10 ml)	Waschen 1	Waschen 2
<b>Originalvorschr.</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	—	Puffer pH 7 <sup>a)</sup>	MeOH
<b>A</b>	MeOH	0,1 M NaOH	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	Puffer pH 7 <sup>a)</sup>	MeOH
<b>B</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	Puffer pH 7 <sup>a)</sup>	MeOH
<b>C</b>	MeOH	0,1 M HCl	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	Puffer pH 9,2 <sup>b)</sup>	MeOH
<b>D</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	Puffer pH 9,2 <sup>c)</sup>	MeOH
<b>E</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	Puffer pH 9,2 <sup>d)</sup>	MeOH
<b>F</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in H <sub>2</sub> O	0,1 M NaOH	MeOH
<b>G</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in NB <sup>e)</sup>	0,1 M NaOH	MeOH
<b>H</b>	MeOH	H <sub>2</sub> O	5 µg/ml in NB <sup>f)</sup>	Puffer pH 7 <sup>a)</sup>	MeOH

schrift (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 B) wurden Wiederfindungsraten von 90-100% für die längerkettigen Homoserine (C6-C14) erzielt, für C4-HSL liegt der Wert bei unter 10%. Eine Konditionierung der Säule mit NaOH resultierte in vergleichbaren Werten (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 A), bei Konditionierung mit HCl (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 C) waren deutlich schlechtere Werte zu erzielen. Die weiteren Optimierungsschritte konzentrierten sich auf C4-HS, als kritischer Parameter erwies sich vor allem der Waschschrift zur Erhöhung des pH, bei dem die (protonierten) Analyten dissoziieren und damit selektiv an die Säule gebunden werden. Eine Erhöhung des pH auf 9,2 (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 C-E) resultierte hier in einer Erhöhung der Wiederfindung auf ca. 60%. Optimale Wiederfindungen von nahezu 100% für C4-HS wurden bei der Verwendung von 0,1 M NaOH (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 F) erreicht. Die Anwendung der optimierten Bedingungen auf dotiertes Kulturmedium (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 G) resultierte in Wiederfindungsraten von 80-90%, allerdings konnte C4-HS hier nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Hauptursache hierfür ist vermutlich eine Konkurrenz zwischen Homoserinen und Matrixsubstanzen (z. B. Aminosäuren), die die kürzeren Homoserine von der Säule verdrängen. Die Verwendung von 0,1 M NaOH während der Extraktion war vor dem Hintergrund des Analysenziels problematisch: eine Bestimmung von bereits in der Probe vorhandenen Homoserinen ist nach Kontakt mit Lauge nicht mehr möglich, da im Alkalischen gleichzeitig vorhandene Lactone hydrolysieren und damit die Meßergebnisse verfälscht werden. Für die weiteren Experimente wurde daher eine geringere Extraktionsausbeute in Kauf genommen und mit der Originalvorschrift bei neutralem pH gearbeitet (Tabelle 3.3 und Abbildung 3.35 H). Die Quantifizierung der Analyten erfolgte aufgrund der schlechteren Wiederfindungsraten über das als internen Standard dienende C7-HSL.

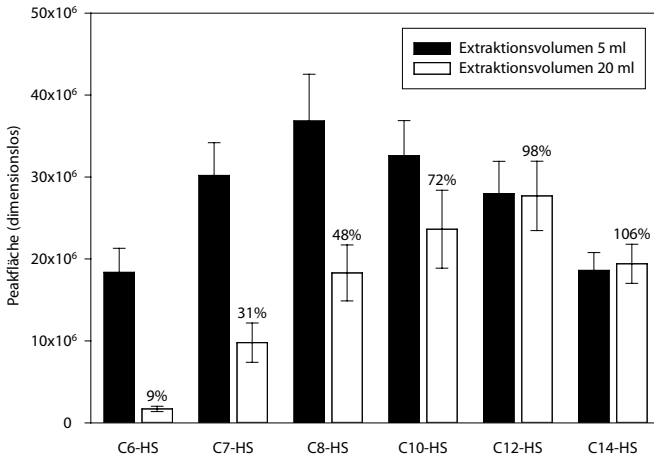


**Abbildung 3.35.** Optimierung der Homoserin-Extraktion durch Anionenaustauscher-SPE (Waters OASIS MAX). Ergebnisse der in Tabelle 3.3 dargestellten Versuche. CE unter Standardbedingungen (siehe unten).

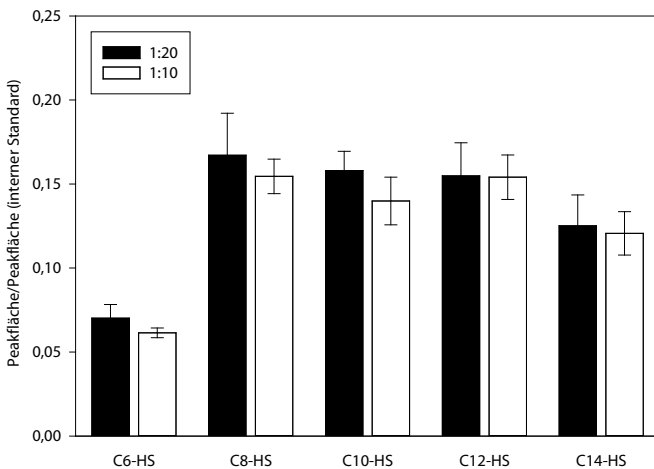
Zur Erzielung höherer Sensitivitäten war eine Extraktion größerer Volumina wünschenswert. Wie in Abbildung 3.36 dargestellt, führte die Applikation von 20 ml Probe jedoch zu einem überdurchschnittlichen Verlust an Analyten durch Auswaschung der kürzerkettigen HSL während des Auftrags (die hydrophoberen langkettigen HSL zeigen sich hingegen unbeeinflusst). Wie in Abbildung 3.37 dargestellt, hat die nach der Extraktion verbleibende Matrix kaum Einfluß auf die Quantifizierung.

#### 3.4.4 Optimierung der Detektionsbedingungen

Bei Verwendung von Wasser/Methanol-Kontaktflüssigkeiten konnte in der CZE unter Spannung kein stabiler Taylor-Konus erzeugt werden, weshalb auf 2-Propanol/Wasser zurückgegriffen wurde. Wie auch in der Nano-LC (vgl. Abschnitt 3.3.3) waren bei Beimischung von Ameisensäure (0,1-1%) sehr hohe ( $> 20 \mu\text{A}$ ) Sprayspannungen zu verzeichnen. Keine wesentlichen Unterschiede in den Peakintensitäten ergaben sich aus der Verwendung unterschiedlicher Essigsäurezugaben (0,1-1%), als Mittelwert wurden für die folgenden Messungen 0,5% verwendet. Eine niedrige Flußrate in der Kontaktflüssigkeit (vgl. Abschnitt 2.2.2) führt in der Massenspektrometrie zwar zu einer Erhöhung des Detektorsignals; bei zu niedrigen Flüssen (1-3  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) wurde bei der Kopplung mit der CZE jedoch eine vermehrte Bildung von Gasblasen in der Zuleitung beobachtet (zu den Auswirkungen auf die Ionisierung vgl. Abschnitt 3.1.3). Gleichzeitig kam es zu Instabilitäten im Spray und in der Konsequenz zu einem überdurchschnitt-



**Abbildung 3.36.** Einfluß des Extraktionsvolumens in der Anionenaustauscher-SPE von HSL-Hydrolysaten. 5 bzw. 20 ml eines 0,5 bzw. 0,125 µg/ml-Homoserinhydrolysates in Wasser (Endkonzentration 0,1 M NaOH) wurde mit 125 µl 80% Phosphorsäure angesäuert, mit 5 bzw. 20 ml Wasser verdünnt und auf die Säule appliziert (Extraktion unter Standardbedingungen). Das zur Trockne eingeeingte Hydrolysat wurde zu (theoretisch) 5 µg/ml rekonstituiert.



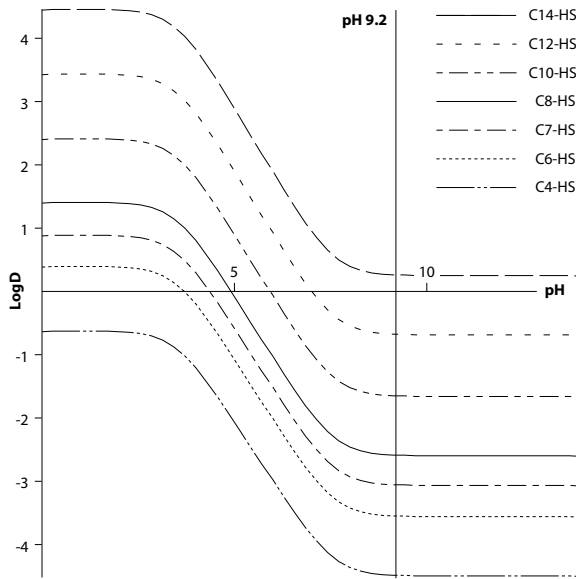
**Abbildung 3.37.** Matrixeffekt nach Anionenaustauscher-SPE von HSL-Hydrolysaten. 0,5 bzw. 0,25 µg/ml-Hydrolysat in NB-Medium wurde unter Standardbedingungen extrahiert. Die Rekonstitution nach Einengen erfolgte in beiden Fällen zu (theoretisch) 5 µg/ml (Aufkonzentrierungsfaktor 10:1 bzw. 20:1 und damit doppelte Matrixkonzentration in der 0,25 µg/ml-Probe).

lich häufigen Auftreten von Störungen (Abfall des Stromflusses auf wenige  $\mu\text{A}$  in der CZE). Die Ionisierungsspannung wurde auf 4,5 kV eingestellt (optimale Spraystabilität).

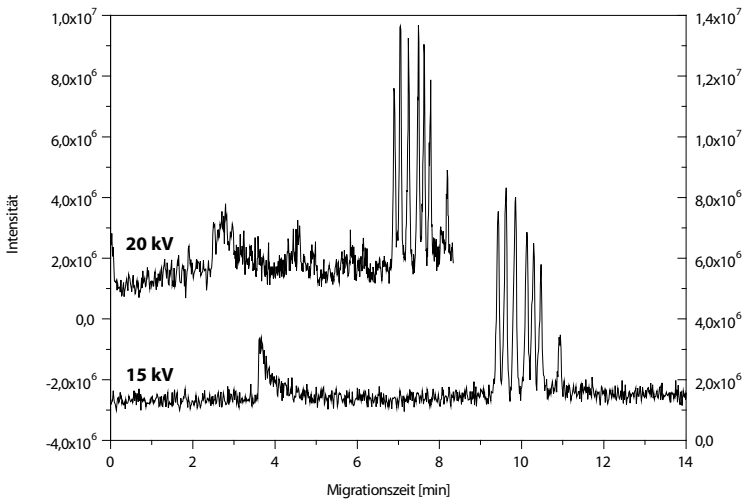
### 3.4.5 Optimierung der Trennbedingungen

Die Messung der Proben erfolgte durchweg in 20 mM Ammoniumcarbonat bei pH 9,2; wie aus Abbildung 3.38 ersichtlich, liegen die Säuren bei diesem pH-Wert überwiegend dissoziiert vor; der verwendete Puffer wird aufgrund der hohen Stabilität der Messungen routinemäßig in der Analytik eingesetzt. Zur Erhöhung der Selektivität und um zu abrupten Gradienten bei der Mischung von Puffer und Kontaktflüssigkeit zu vermeiden, wurden zum Trennpuffer 10% 2-Propanol zugegeben. Die verwendete Anlage besitzt keine Möglichkeit zur Temperierung der Kapillare, Ziel der Zugabe eines organischen Lösungsmittels war daher auch eine Absenkung des Stromflusses während der Trennung und eine Verringerung der damit verbundenen Wärmeproduktion (*Joule heating*). In Abbildung 3.39 ist die Trennung bei 15 bzw 20 kV Spannung dargestellt, trotz längerer Analysenzeiten wurde in den weiteren Versuchen aufgrund der größeren Stabilität der Baseline und des verminderten Auftretens von Spannungsabbrüchen mit der niedrigeren Trennspannung gearbeitet. Als ein zentraler Punkt bei der Messung in der CZE erwies sich der Pufferwechsel nach jedem Lauf: die Peakfläche nimmt bei Verwendung des gleichen Puffers über mehrere Läufe hinweg kontinuierlich ab (Abbildung 3.40). Die Messungen zeigen eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Temperatur der Heizkapillare (150–200 °C; bei niedrigeren Temperaturen wurde eine Verschlechterung der Spektren beobachtet). Die Injektionszeit konnte in Standardmischungen auf mindestens 10 s erhöht werden (Abbildung 3.42), allerdings wiesen die Peaks bei 10 s und darüber in *Realproben* eine massive Verbreiterung auf, weshalb höhere Injektionszeiten in der praktischen Anwendung ohne Wert waren. In Abbildung 3.43 ist die Trennung der HS unter optimierten Bedingungen dargestellt.

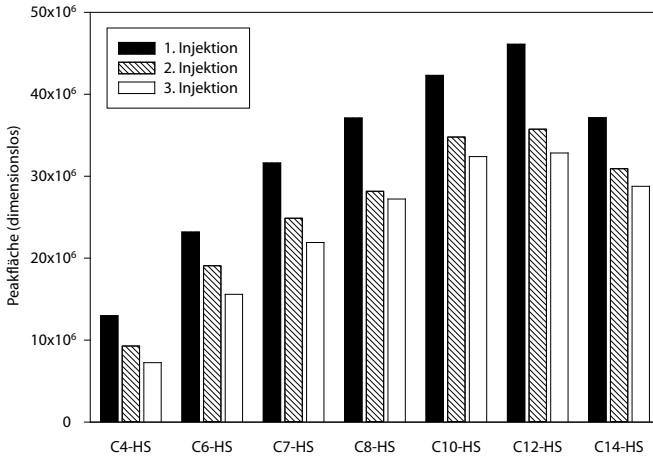
Für die Analyse unbekannter Proben ist eine schnelle Identifizierung der Homoserine in einem Lauf erforderlich, die sich durch *unspezifische* Fragmentierung in der Ionenquelle (*source fragmentation*) erreichen läßt. Gleichzeitig muß die Methode jedoch hinreichend sensitiv bleiben, um auch geringste Mengen an Analyten zu detektieren. In Abbildung 3.44 sind die Intensitäten der Quasimolekülionen ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) und des gemeinsamen Fragments ( $m/z$  120, s. u.) unter dem Einfluß steigender Fragmentierungsenergien gegeneinander aufgetragen. Zur Detektion des  $m/z$  120-Fragments erwies sich eine Energie (CID) von 20% als ausreichend, die entsprechend gewonnenen Spektren sind in Abbildung 3.46 dargestellt. In allen Fällen wurde der  $m/z$  120-Peak beobachtet, darüberhinaus besteht in der ESI offensichtlich ein Gleichgewicht zwischen offen- und geschlossenkettiger Form durch eine dynamische Lactonbildung sowie zusätzlich eine Fragmentierung der gebildeten Lactone. Ein möglicher Ablauf der der Fragmentierung ist in Abbildung 3.45 dargestellt. Der beobachtete Mechanismus (gleichzeitiges Auftreten des Quasimolekülions  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , des Homoserinfragments mit  $m/z$  120, des Lacton-Quasimolekülions  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  und des Homoserinlactonfragments mit  $m/z$  102) ist von hohem diagnostischem Wert und ermöglicht eine eindeutige Be-



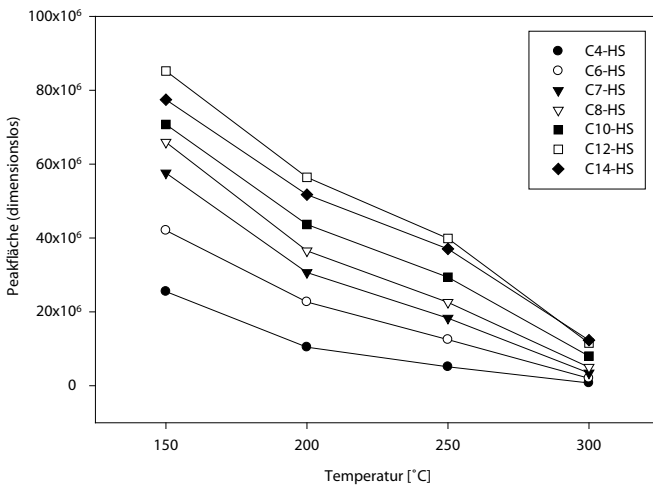
**Abbildung 3.38.** LogD-Werte der untersuchten Homoserine. Theoretische Werte, ermittelt durch Pallas für Windows v3.0 (PrologP v5.1 und PrologD v2.0).



**Abbildung 3.39.** Einfluß der Trennungsspannung auf die CZE der Standard-Homoserine. Trennung in 20 mM Ammoniumcarbonat mit 10% Methanol bei pH 9,2 und 15 bzw. 20 kV Spannung; zu den MS-Bedingungen vgl. Text.

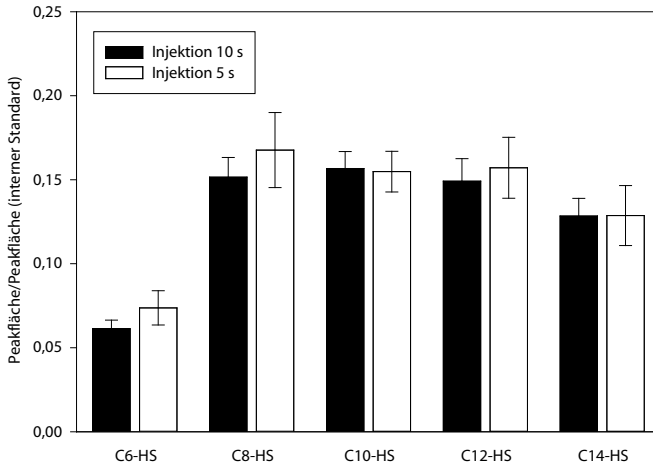


**Abbildung 3.40.** Abnahme der Methodensensitivität in der CZE/MS eines hydrolysierten HSL-Standardgemisches (5 µg/ml C4-, C6-, C7-, C8-, C10-, C12- und C14-HS in 0,1 M NaOH/50% MeOH) bei fehlendem Pufferwechsel. Zu Trenn- und Detektionsbedingungen vgl. Abbildung 3.43.



**Abbildung 3.41.** Einfluß der Temperatur der Heizkapillare in der CZE. Trennung eines hydrolysierten HSL-Standardgemisches (5 µg/ml C4-, C6-, C7-, C8-, C10-, C12- und C14-HS in 0,1 M NaOH/50% MeOH) unter optimierten Bedingungen (vgl. Abbildung 3.43).





**Abbildung 3.42.** Einfluß der Injektionszeit auf die Messung eines hydrolysierten HSL-Standardgemisches (5 µg/ml C4-, C6-, C7-, C8-, C10-, C12- und C14-HS in 0,1 M NaOH/50% MeOH) unter optimierten Bedingungen (vgl. Abbildung 3.43). Zum internen Standard vgl. unten.

stimmung von Homoserinen in komplexen Proben.

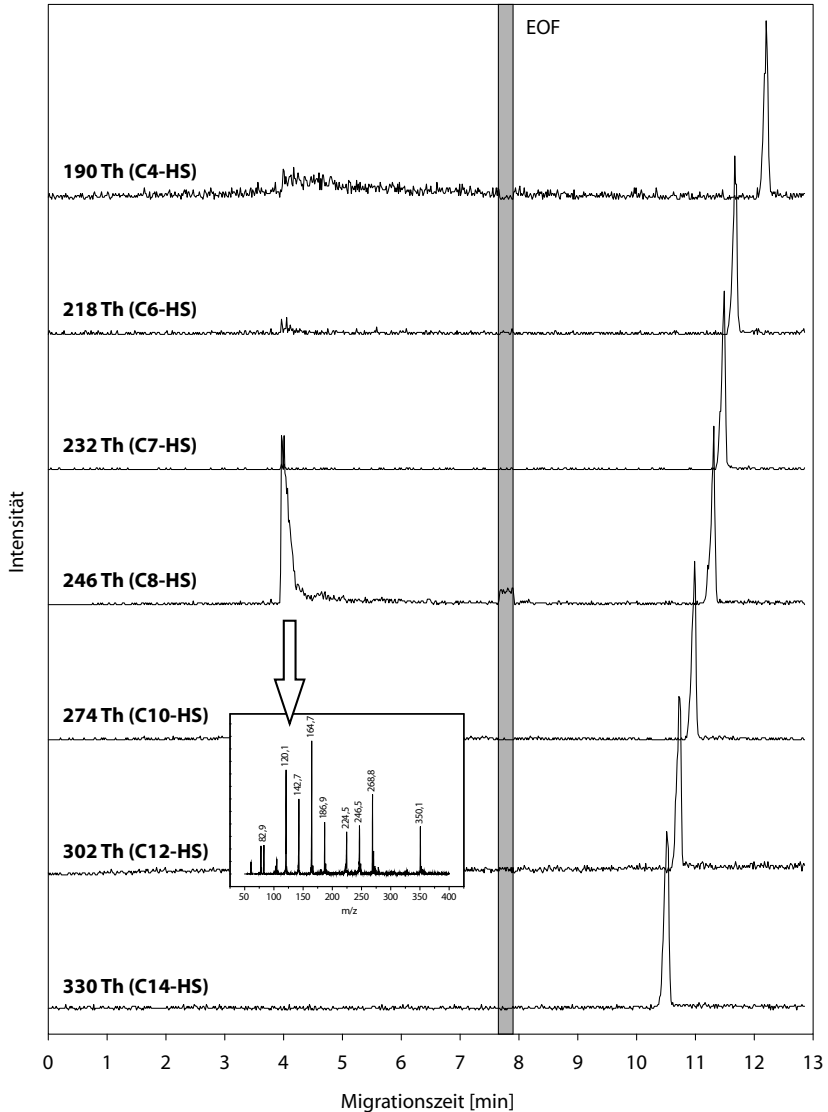
### 3.4.6 Reproduzierbarkeit, Probenstabilität und Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Homoserine in der CZE wurde auf einen internen Standard zurückgegriffen, da in Realproben keine quantitative Extraktion möglich war (Abschnitt 3.4.3) und da hierdurch Unregelmäßigkeiten von Lauf zu Lauf (z. B. durch unterschiedliche Probenvolumina aufgrund der hydrodynamischen Injektion: vgl. Abschnitt 2.3.1) minimiert werden konnten. C7-HSL bzw. C7-HS ist in natürlichen Realproben aufgrund der fettsäureanalogen Biosynthese der HSL nicht zu erwarten (vgl. Abschnitt 1.3) und konnte damit als Struktur analogon zur Eichung der Messungen verwendet werden. Zur Normierung wurden die *Response*-Faktoren  $R$  als Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten  $A_A$  und des (in konstanter Konzentration vorliegenden) internen Standards  $A_{IS}$  verwendet:

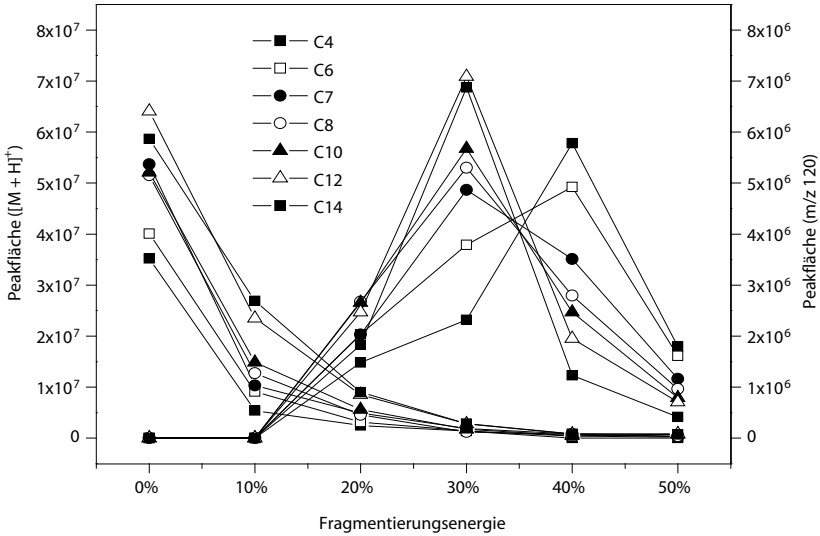
$$R = \frac{A_A}{A_{IS}} \quad (3.5)$$

Die Werte für C4-HSL bis C12-HSL zeigen im Bereich von 0,5–20 µg/ml in der CZE/MS linearen Verlauf; C14-HSL verläßt den Linearitätsbereich bei Konzentrationen  $\geq 10$  µg/ml (Abbildung 3.47 und Tabelle 3.4). Wesentlich höhere Konzentrationen sind auch in Realproben nicht zu erwarten.

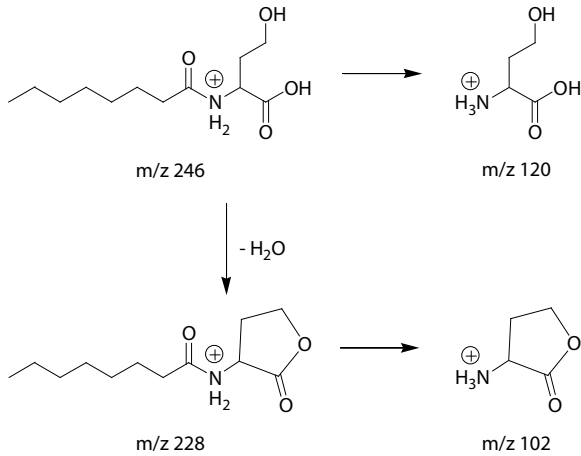
Abbildung 3.48 zeigt die Reproduzierbarkeit der Methode (drei Meßtage, jeweils neues Hydrolysat, und neuer Puffer,  $n = 7$ ) der CZE-Messungen vor und nach Normierung



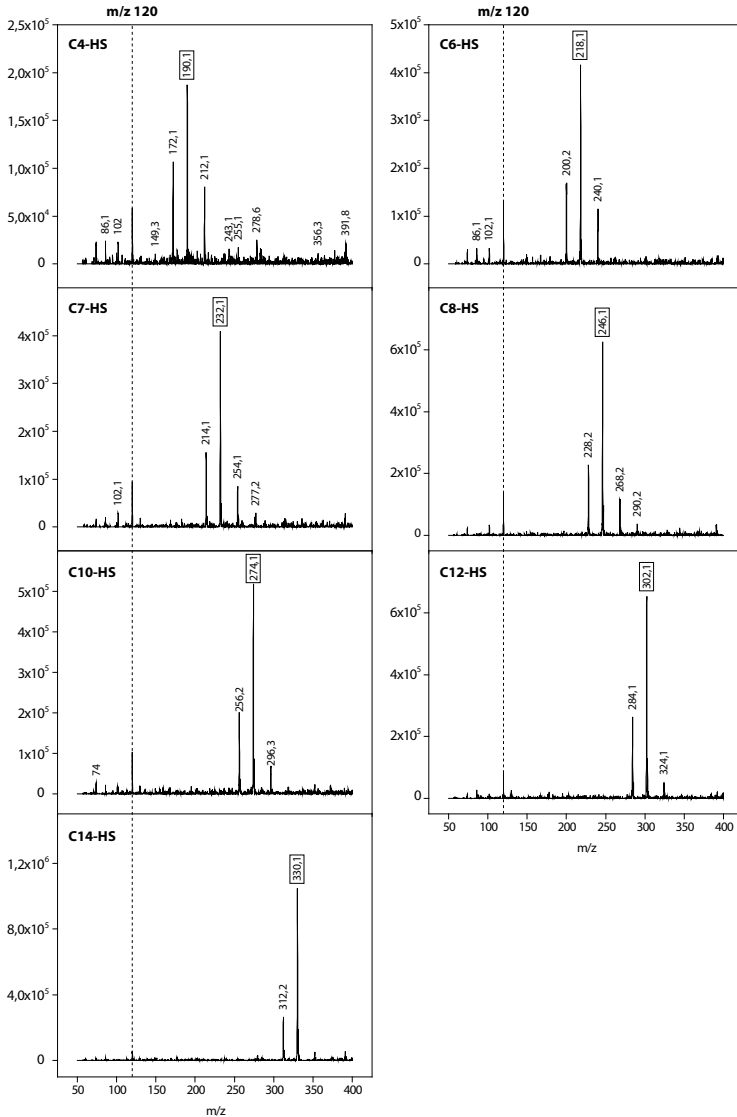
**Abbildung 3.43.** Trennung eines hydrolysierten HSL-Standardgemisches (5 µg/ml C4-, C6-, C7-, C8-, C10-, C12- und C14-HS) in 0,1 M NaOH/50% MeOH) in 20 mM Ammoniumcarbonat mit 10% Methanol bei pH 9,2 und 15 kV. Ionisierungsspannung 4,5 kV, Kontaktflüssigkeit 50/50/0,5 (v/v/v) Wasser/2-Propanol/Essigsäure, 4 µl/min. 150 °C. Der Störpeak bei 4 min ( $m/z$  246) ist auf Clusterbildung durch eluierendes  $\text{Na}^+$  zurückzuführen (siehe Insert). Abbildung nach FROMM-BERGER *et al.* (2005).



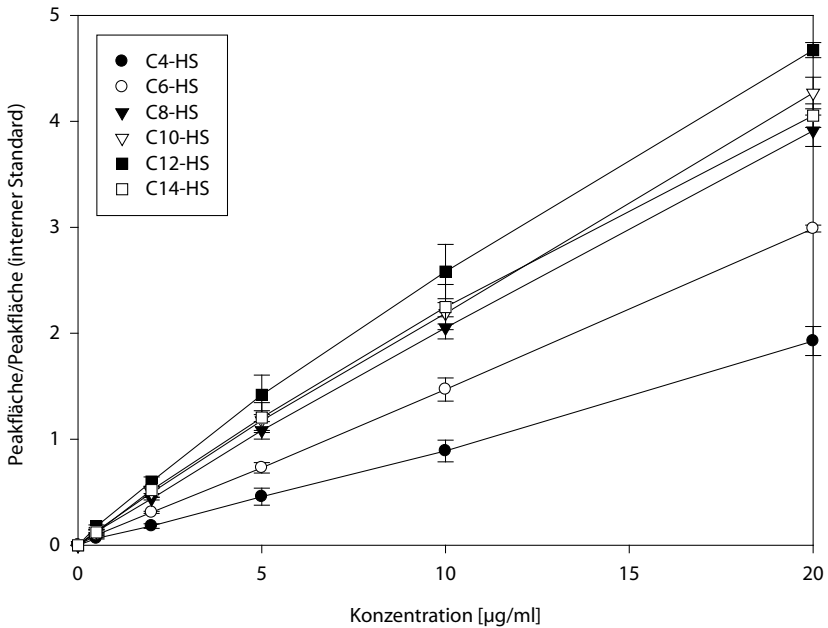
**Abbildung 3.44.** Intensitäten der Quasimolekülonen  $[M + H]^+$  und des  $m/z$  120-Fragments unter dem Einfluß steigender Fragmentierungsenergie. Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2005).



**Abbildung 3.45.** Mechanismus der Fragmentierung von Homoserinen und temperaturinduzierte Reaktion zum Lacton am Beispiel von C8-HS (vgl. auch Abbildung 3.14 und Spektren in Abbildung 3.46). Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2005).



**Abbildung 3.46.** Spektren in der CZE bei 20% *source fragmentation* am jeweiligen Peakmaximum. In allen Fällen wurde die Bildung eines Fragments mit  $m/z$  120 beobachtet, darüberhinaus besteht ein Gleichgewicht zwischen offen- und geschlossenkettiger Form (vgl. Schema in Abbildung 3.45). Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2005), verändert



**Abbildung 3.47.** Linearität der Standarddeichung in der CZE/MS. 5 ml Hydrolyseansatz mit jeweils 5 µg/ml C7-HSL und 0,5 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml oder 20 µg/ml C4-, C6-, C8-, C10- und C12-HSL in Wasser wurden unter Standardbedingungen gemessen,  $n = 5$ . Dargestellt sind die Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten ( $A_A$ ) und des internen Standards mit 5 µg/ml ( $A_{IS}$ ).

**Tabelle 3.4.** Linearität der Standarddeichung in der CZE/MS. Steigungen der Ausgleichsgeraden der Abbildung 3.47 und Bestimmtheitsmaß. **a)** 0-20 µg/ml, **b)** 0-5 µg/ml im Hydrolyseansatz.

	C4	C6	C8	C10	C12 <sup>a)</sup>	C12 <sup>b)</sup>	C14 <sup>a)</sup>	C14 <sup>b)</sup>
<b>Steigung</b>	0,095	0,149	0,195	0,212	0,233	0,281	0,203	0,241
<b>Bestimmtheitsmaß (<math>R^2</math>)</b>	0,998	1,000	0,999	0,999	0,996	0,999	0,996	0,999

**Tabelle 3.5.** Interner Standard in der CZE (Extraktion aus Matrix). Steigungen der Ausgleichsgeraden der Abbildung 3.50 und Bestimmtheitsmaß. **a)** 0-2 µg/ml, **b)** 0-0,5 µg/ml im Standard. Tabelle nach FROMMBERGER *et al.* (2005).

	C6-HS	C8-HS	C10-HS	C12-HS	C14-HS <sup>a)</sup>	C14-HS <sup>b)</sup>
<b>Steigung</b>	0,547	2,698	2,857	3,075	1,712	2,438
<b>Bestimmtheitsmaß (R<sup>2</sup>)</b>	0,999	1,000	1,000	0,999	0,990	0,999

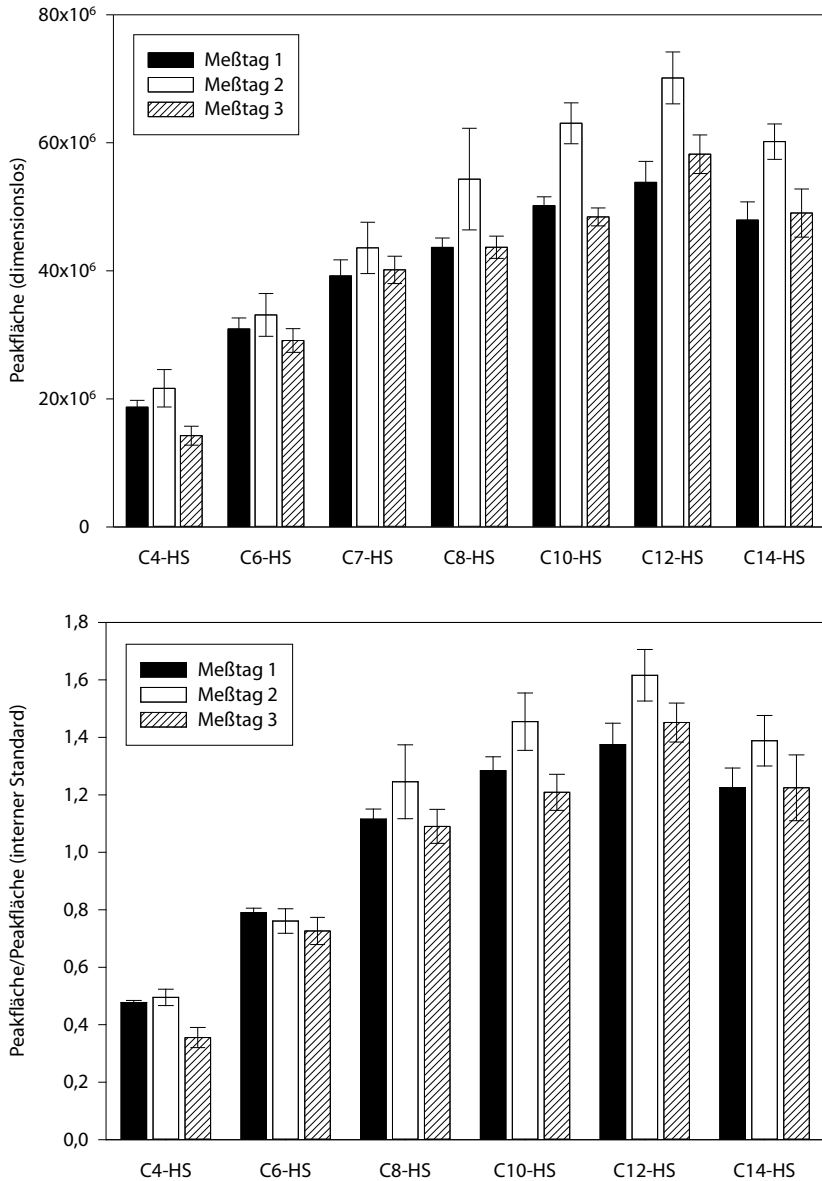
auf C7-HS. Die hydrolysierte Probe ist in 0,1 M NaOH und bei Raumtemperatur über mindestens drei Tage stabil: Abbildung 3.49 zeigt die entsprechenden Reproduzierbarkeitsmessungen.

Um zur Bestimmung der Responsefaktoren weitestgehend unter Realbedingungen zu arbeiten, wurden 5 ml einer *P. aeruginosa*-Kultur (NB-Medium, OD = 1, keine HSL nachweisbar) jeweils mit 0,5 µg/ml C7-HSL und 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml oder 2 µg/ml C4-, C6-, C8-, C10- und C12-HSL dotiert. Die Hydrolyse und Extraktion erfolgte unter den in Abschnitt 3.4.3 dargestellten Standardbedingungen. Die Bestimmung verläuft im dargestellten Konzentrationsbereich linear (C14-HSL verläßt den Linearitätsbereich bei 2 µg/ml). Die Steigungen der Regressionsgeraden  $m$  wurden in weiteren Versuchen gemäß Gleichung 3.6 für die Quantifizierung der HS herangezogen, wobei  $C_A$  der Konzentration des jeweiligen Analyten entspricht:

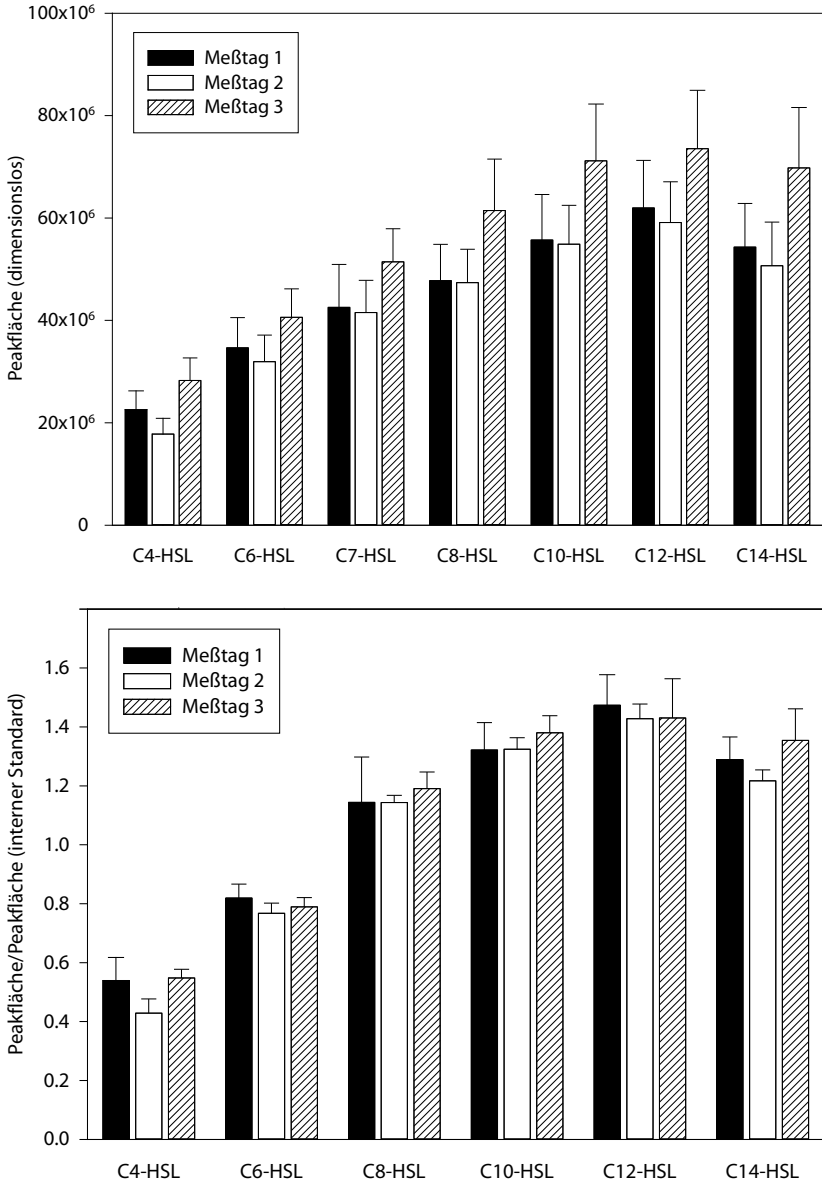
$$C_A = \frac{A_A/A_{IS}}{m} \quad (3.6)$$

### 3.4.7 Realprobenmessungen

In Abbildung 3.52 sind rekonstruierte Ionenchromatogramme aus einer Realprobenmessung von *B. cepacia* MMI 1537 (vgl. Abschnitt C1 im Anhang) dargestellt. Die gemessenen Elektropherogramme wurden systematisch auf die in Tabelle D1 dargestellten Massen untersucht. In der Probe konnten hierdurch neben dem internen Standard C7-HSL die Verbindungen C8-HS, C10-HS und C12-HS nachgewiesen werden. Die zum jeweiligen Peakmaximum aufgenommenen Spektren (Abbildung 3.51) erlauben hierbei entsprechend dem in Abbildung 3.45 dargestellten Schema und im Vergleich mit Standardmessungen eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen über  $m/z$  102,  $m/z$  120 und den Homoserinlactonpeak mit  $[M-H_2O+H]^+$ . Die Quantifizierung der Homoserine ist ausführlich in Abschnitt 4.2 dargestellt.

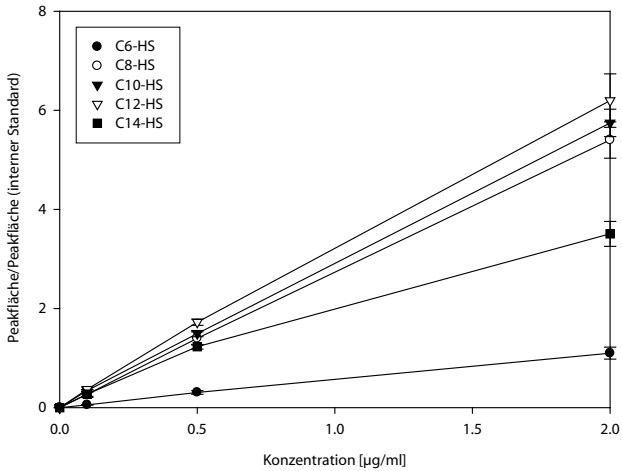


**Abbildung 3.48.** Reproduzierbarkeit der HS-Bestimmung durch CZE/MS. Drei Meßtage, jeweils frischer Hydrolyseansatz und frischer Puffer, Standardbedingungen. **Oben:** Rohdaten, **unten:** Daten auf C7-HS normiert,  $n = 7$ .

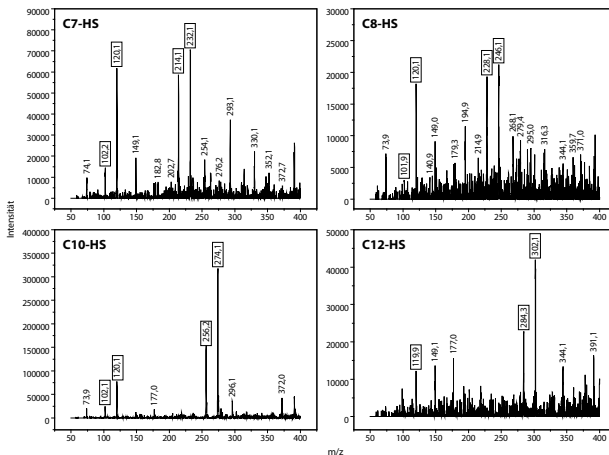


**Abbildung 3.49.** Reproduzierbarkeit der HS-Bestimmung durch CZE/MS und Probenstabilität. Drei Meßtage, gleicher Hydrolyseansatz, frischer Puffer, Standardbedingungen. **Oben:** Rohdaten, **unten:** Daten auf C7-HS normiert,  $n = 7$ . Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2005).

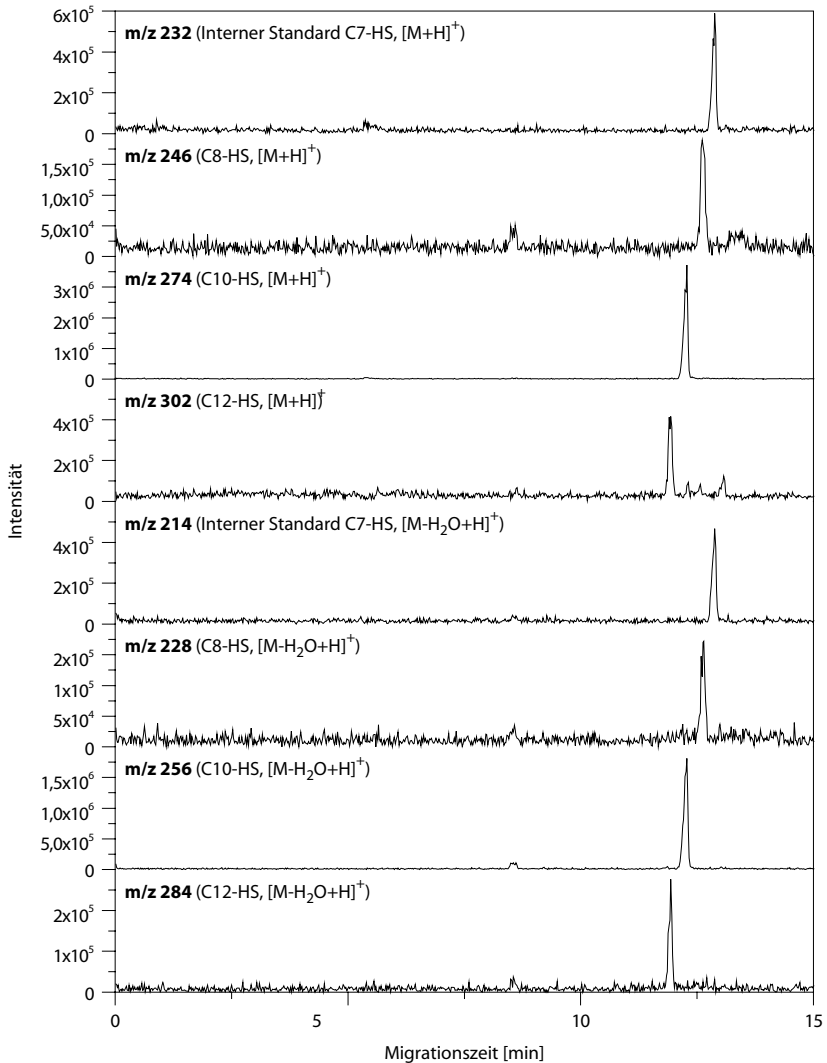




**Abbildung 3.50.** Responsefaktoren in der CZE. 5 ml *P. aeruginosa*-Kultur (NB-Medium, OD = 1, keine HSL nachweisbar) jeweils mit 0,5 µg/ml C7-HSL und 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml oder 2 µg/ml C4-, C6-, C8-, C10- und C12-HSL dotiert und unter Standardbedingungen extrahiert,  $n = 5$ . Dargestellt sind die Quotienten aus der Peakfläche des jeweiligen Analyten ( $A_A$ ) und des internen Standards mit 5 µg/ml ( $A_{IS}$ ).



**Abbildung 3.51.** Realprobenmessung in der CZE (*B. cepacia* MMI-1537) unter Standardbedingungen mit 20% *source fragmentation*. Spektren zu den Peakmaxima der Abbildung 3.52 (vgl. auch Abbildung 3.46 und Schema in Abbildung 3.45). Abbildung nach FROMMBERGER *et al.* (2005).



**Abbildung 3.52.** Realprobenmessung in der CZE (*B. cepacia* MMI-1537) unter Standardbedingungen mit 20% *source fragmentation*. **Reihe 1-4:** Massenspuren der Homoserine C7-HS (interner Standard), C8-HS, C10-HS und C12-HS. **Reihe 5-8:** Massenspuren der gebildeten Homoserinlactone (vgl. Abbildung 3.46 und Schema in Abbildung 3.45). Abbildung nach FROMM-BERGER *et al.* (2005), verändert.

### 3.5 Gaschromatographie/Elektronenionisierungs-Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie mit Elektronenionisierungs-Massenspektrometrie (GC/EI-MS) komplettiert die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kapillartrenntechniken; wie bereits in Abschnitt 2. angesprochen, ist die Methode in ihrem gegenwärtigen Entwicklungsstand in erster Linie als Ergänzung der zuvor entwickelten Techniken zu sehen, weniger hingegen als abgeschlossener analytischer Ansatz. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. T. R. I. Cataldi und Dr. Giuliana Bianco an der Università degli Studi della Basilicata, Potenza (Italien) im Rahmen eines DAAD/CNR-VIGONI-Personenaustauschs; eine abschließende Validierung und Quantifizierung wurde bisher nicht durchgeführt.

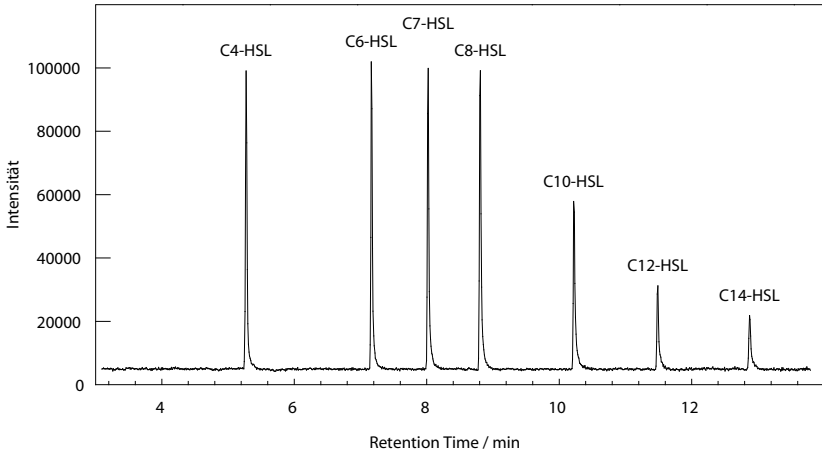
#### 3.5.1 Optimierung der GC-Bedingungen

Das Temperaturprogramm des GC-Ofens wurde angepaßt, um ein möglichst breites Spektrum an Analyten in einem Lauf zu erfassen. Optimale Ergebnisse im Sinne größtmöglicher Selektivität und kurzer Analysenzeit wurden mit einem Gradienten von 150 nach 275 °C (15 °C/min) erzielt. Eine Erhöhung der Starttemperatur auf 160 °C und darüber resultierte im Verlust von C4-HSL, was auf die höhere thermische Empfindlichkeit dieses Analyten zurückgeführt werden kann (Abschnitt 3.3.3); eine niedrigere Temperatur führte zu einer unnötigen Verlängerung der Laufzeit. In Abbildung 3.53 ist die Trennung der sieben untersuchten Standards dargestellt. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten (5 Läufe unter identischen chromatographischen Bedingungen) lag hierbei bei unter 0,1% (relative Standardabweichungen).

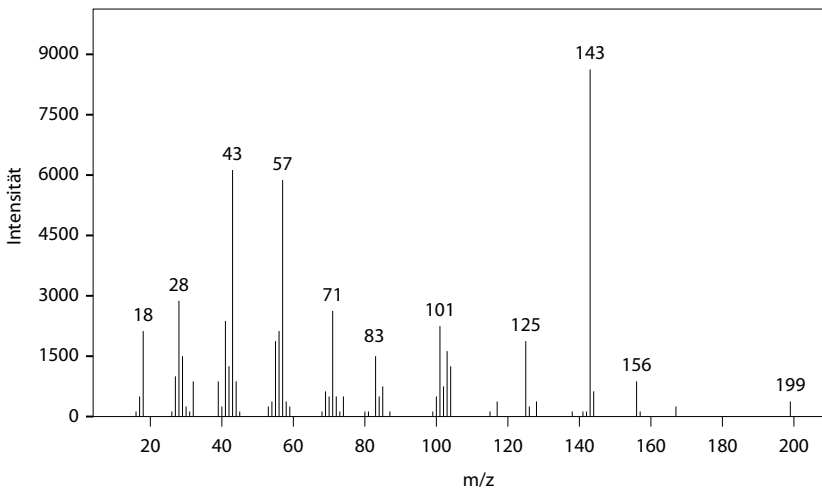
HSL fragmentieren in der Elektronenionisierung in charakteristischer Art und Weise; in Abbildung 3.54 ist das Spektrum für C6-HSL dargestellt. In allen Spektren wurde das Molekülion  $[M+1]^+\bullet$ , wenn auch in relativ geringer Abundanz, detektiert: C4-HSL ( $m/z$  171), C6-HSL ( $m/z$  199), C7-HSL ( $m/z$  213), C8-HSL ( $m/z$  227), C10-HSL ( $m/z$  255), C12-HSL ( $m/z$  283) und C14-HSL ( $m/z$  311) konnten damit nachgewiesen werden. Für alle HSL ergab sich ein gemeinsames Fragmentierungsschema mit einem Hauptfragment mit  $m/z$  143, in geringerer Abundanz liegen Fragmente mit  $m/z$  71, 57 und 43 vor. Vergleichbare Ergebnisse sind in der Literatur bisher nur für C7-HSL aus *P. aeruginosa* beschrieben (PEARSON *et al.*, 1995). Die möglichen Fragmentierungsprodukte wurden mit Mass Frontier simuliert, in Abbildung 3.55 sind die diagnostisch bedeutsamen Reaktionen dargestellt. Das Fragmention mit  $m/z$  143 stammt aller Wahrscheinlichkeit nach aus einer McLafferty-Umlagerung, die für Carbonylgruppen mit einem  $\gamma$ -Wasserstoffatom typisch ist. Diese resultiert in einem enolischen Fragment und einem Olefin, durch Wasserabspaltung aus  $m/z$  143 resultiert ein Ion mit  $m/z$  125. Die übrigen Fragmente ( $m/z$  57, 71 und 43) entstehen aus zwei Hauptfragmentierungsreaktionen unter Einfluß einer induktiven und einer  $\alpha$ -Spaltung. Analog zu den bereits in vorangegangenen Abschnitten dargestellten Ergebnissen kommt es auch in der Elektronenionisierung zur Bildung eines Homoserinfragments, allerdings hier als Radikalkation  $[M+1]^+\bullet$  mit  $m/z$  101 im Gegensatz zum Addukt  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  102).

### 3.5.2 Realprobenmessungen mit GC/EI-MS

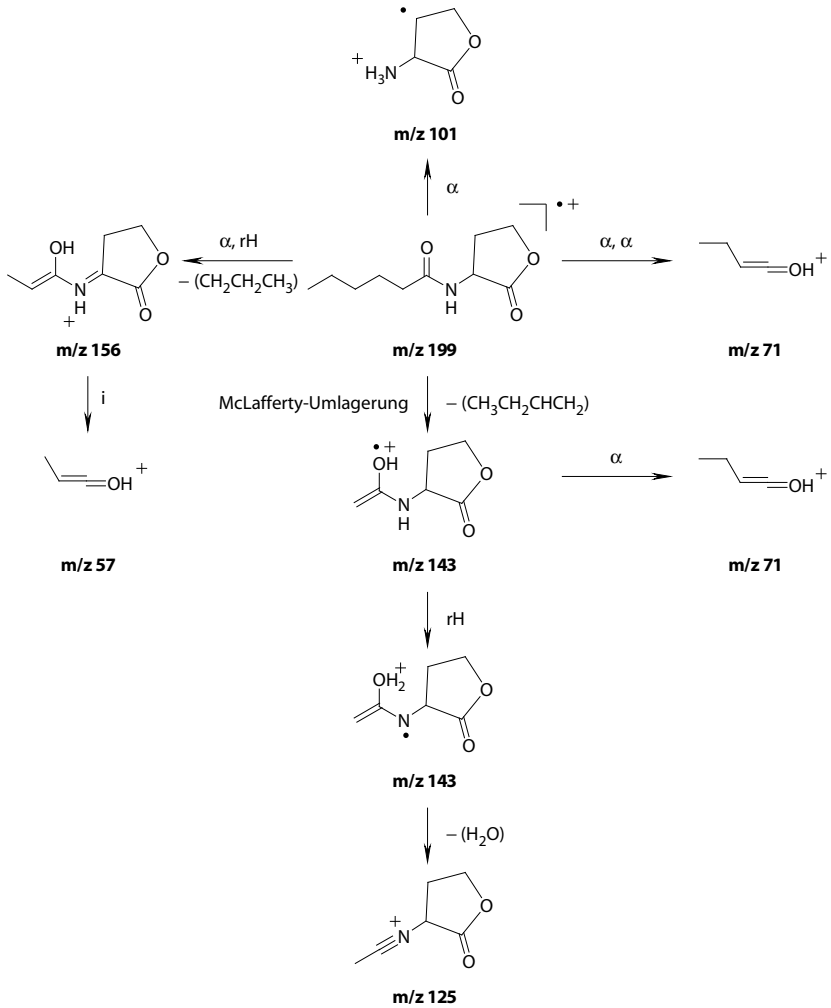
Aufgrund der thermischen Sensitivität der HSL war für die Analyse durch GC/EI-MS eine Aufkonzentrierung um den Faktor 1000 nach Chloroformextraktion erforderlich; eine direkte Analyse aus dem Kulturüberstand war damit nicht möglich. Aufgrund der bereits in Abschnitt angesprochenen Unwägbarkeiten hinsichtlich der Extraktionsausbeuten wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Abbildung 3.56 zeigt die Messung einer Realprobe (*B. cepacia* JA-10): C8-, C10-, C12- und C14-HSL wurden über die Massenspur 143 im *single ion monitoring* und über die Retentionszeit nachgewiesen.



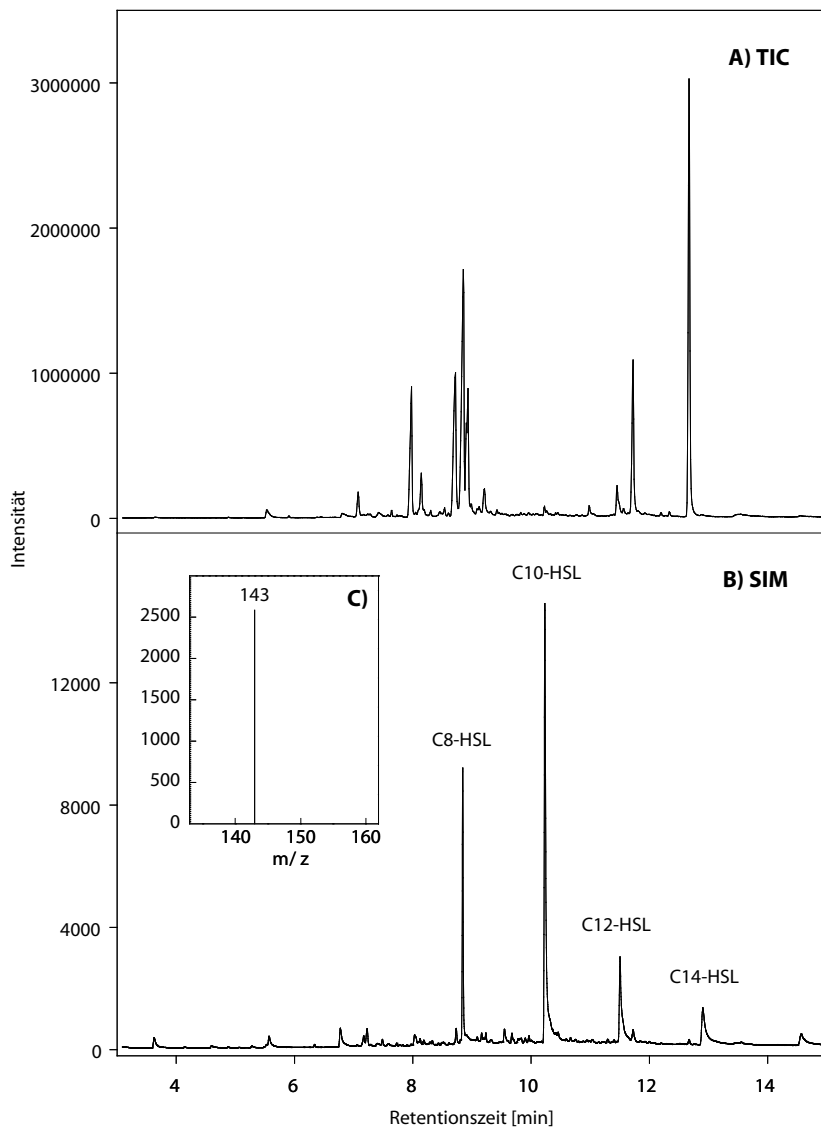
**Abbildung 3.53.** Analyse von HSL-Standards in der GC/MS unter optimierten Bedingungen (Analyten in Methanol, 100 µg/ml, TIC).



**Abbildung 3.54.** Spektrum von C6-HSL in der GC/EI-MS (Peakmaximum der Abbildung 3.53).



**Abbildung 3.55.** Fragmentierungsschema von C6-HSL in der GC/EI-MS (Spektrum in Abbildung 3.54). Theoretische Werte, Simulation mit Mass Frontier v1.0.  $\alpha$ :  $\alpha$ -Spaltung, rH: Wasserstoffumlagerung, i: Induktive Spaltung.



**Abbildung 3.56.** Realprobenmessung in der GC/El-MS. **A** Gesamtionenstrom (*total ion current*, TIC); **B** *single ion monitoring* ( $m/z$  143).

### 3.6 Zusammenfassung und Diskussion

In den vorstehenden Abschnitten wurden insgesamt vier Analysestrategien zur Untersuchung von *N*-Acylhomoserinlactonen (HSL) bzw. ihrer Hydrolysate (*N*-Acylhomoserine, HS) vorgestellt (*partial filling*-MEKC/MS, Nano-LC/MS, CZE/MS nach alkalischer Hydrolyse und Anionenaustauscher-SPE sowie GC/MS), die allesamt einen Nachweis der Zielanalyten in mikrobiologischen Proben (Kulturüberständen) erlauben, in ihrer spezifischen Eignung für bestimmte Fragestellungen jedoch deutlich voneinander abweichen. Qualitative Aussagen über die Produktion von HSL sind - durch die massenspektrometrische Detektion und das jeweilige Verhalten der Zielverbindungen im analytischen System - mit allen vorgestellten Methoden möglich; vor allem aufgrund der unterschiedlichen Nachweisgrenzen, der unterschiedlichen Robustheit der Methoden und der unterschiedlichen Reproduzierbarkeiten hinsichtlich quantitativer Aussagen erscheint jedoch eine differenzierte Betrachtung notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die vorhandene Ionenquelle des Massenspektrometers weitgehend verändert. Zumindest *theoretisch* ist damit jetzt die gesamte Bandbreite an Elektrospray-Ionisierungstechniken (*sheath liquid*, *sheathless* - Nanospray) ohne größere Umbauten durchführbar. In der Praxis erwies sich jedoch nach Optimierung sowohl bei der Kopplung mit der Nano-LC, als auch mit der C(Z)E das koaxiale *sheath liquid*-Interface als am besten geeignet und sehr robust; die Anwendung des *sheathless*-Interface mit *fused silica*-Kapillaren und konischen Metallnadeln (vgl. Abschnitt 3.1.4) erbrachte in der CE keine, in der Nano-LC nur mangelhaft reproduzierbare Ergebnisse. Bei einer Bewertung ist - neben dem generell schwierigen Einsatz des Nanospray in der CE-Kopplung, wie auch aus der Anzahl an entsprechenden Literaturzitaten ersichtlich (nur 2% aller Publikationen, vgl. Abschnitt E) - allerdings auch zu beachten, daß im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit ein *vorhandenes*, mittlerweile über fünf Jahre altes (und damit nicht mehr dem gegenwärtigen Stand der Technik entsprechendes) ESI-Interface der gegebenen Fragestellung anzupassen war; die hier erzielten Sensitivitäten reichen für die gegenwärtigen Analysenanforderungen vollkommen aus. Die durch Nanospray erzielbaren *theoretischen* Sensitivitätsgewinne sind jedoch beträchtlich (vgl. Abschnitt 2.2.2), was auch im Hinblick auf eine zukünftige Messung von Realproben von Interesse sein wird. Der Autor sieht den Schwerpunkt künftiger Arbeiten in diesem Zusammenhang jedoch nicht in einer weiteren Optimierung der *vorhandenen* Interfaces (redundant zu anderenorts bereits abgeschlossenen Entwicklungen), sondern eher in einer Weiterentwicklung in Richtung anderer Ionisierungstechniken und dem Einsatz kommerzieller, routinemäßig einsetzbarer miniaturisierter Systeme (z. B. *on-chip*-ESI).

Die *partial filling*-MEKC (vgl. Abschnitt 3.2) ermöglicht den Nachweis von HSL lediglich in aufkonzentrierten Kulturextrakten; eine direkte Bestimmung im Überstand ist nicht möglich. Die Methode erwies sich im Laboralltag als wenig robust; der Einfluß der unterschiedlichen, jeweils veränderlichen und damit fehlerbehafteten Parameter auf die Trennung (Konzentration des Tensids, unterschiedliche und offensichtlich nicht vollkommen exakt einstellbare Befüllungsgrade der Kapillare, Verunreinigung der Ionenquelle mit Tensid und damit Ionenunterdrückung) läßt die Methode für Routine-



untersuchungen als wenig geeignet erscheinen. Eine »erfolgreiche« Trennung und Detektion der Analyten war jeweils erst nach weitreichenden Optimierungsschritten möglich, jede Veränderung - auch in der Matrix - erfordert damit eine erneute Optimierung. Die Quantifizierung der Analyten in der MEKC scheiterte - hauptsächlich wohl aufgrund der in Abschnitt 3.2.2 dargestellten Ionenunterdrückung durch AIR. Durch die PF-MEKC hat konnte jedoch gezeigt werden, daß sich *langkettige* HSL im Micellensystem atypisch verhalten (die Analyten werden bei einer Erhöhung der SDS-Konzentration stärker als erwartet zurückgehalten, die Korrelation zwischen SDS-Konzentration und Migrations-/Retentionszeit verläuft nichtlinear: vgl. Abbildung 3.18), wofür die in Abschnitt 3.2.1 dargestellte *Kettenlängenkompatibilität* der Moleküle mit dem verwendeten Tensid in Frage kommen könnte. Vor allem langkettige HSL zeigen aufgrund ihrer chemischen Struktur auffallende Ähnlichkeit zu nichtionischen Tensiden; ein semistatischer (dem Zeitregime der *langsamen Relaxation*  $\tau_2$  unterliegender) Einbau in die Micelle liegt daher nahe. Ein Hauptaugenmerk zukünftiger Arbeiten sollte daher auch auf dem *Tensidverhalten* der Analyten in biologischen Systemen liegen, da der Interaktion der HSL mit Membranen an bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Grenzflächen und Zellkompartimenten eine enorme biologische Bedeutung in der Kommunikation auch zwischen Bakterien und höheren Organismen zukommen könnte - insbesondere auch deswegen, weil die (beispielsweise in Biofilmen mit bis zu 600  $\mu\text{M}$ : CHARLTON *et al.*, 2000) in realen Systemen nachgewiesenen Konzentrationen durchaus im Bereich der kritischen micellaren Konzentration (CMC) von Tensiden liegen könnten.

Die im Rahmen dieser Arbeit im Rahmen einer Kooperation mit Prof. T. R. I. Cataldi und Dr. G. Bianco an der Universität Potenza (CATALDI *et al.*, 2004) entwickelte GC/MS-Methode zum *direkten* Nachweis von HSL ist bei weitem noch nicht vollständig optimiert und validiert, aufgrund der größeren allgemeinen Verfügbarkeit von GC/MS-Geräten (im Gegensatz zu HPLC/MS oder gar CE/MS) und der relativ einfachen Probenvorbereitung (ohne Derivatisierung!) könnte die Methode für künftige (Routine-) Analysen jedoch durchaus von Interesse sein. Die Verfügbarkeit unterschiedlichster Säulen in der GC läßt hierbei durchaus auch an eine Erweiterung der bestehenden analytischen Methoden (z. B. im Hinblick auf chirale Trennungen) denken. Ein Hauptnachteil der GC-Analytik ist jedoch die thermische Labilität der Verbindungen, die eine Aufkonzentrierung der Proben um den Faktor 1000 (mit dem verwendeten Routineinstrument) erfordert. Die Methode erlaubt zwar damit problemlos den Nachweis der Analyten in Kulturüberständen (mit Konzentrationen im  $\mu\text{g/ml}$ -Bereich), die Analyse von HSL in Biofilmen (mit den in Tabelle 1.4 angegebenen Konzentrationen) und Lebensmitteln ist ebenfalls denkbar; ob hierdurch jedoch auch eine *in situ*-Analytik an der Rhizosphäre (ohne Option zur Probenaufkonzentrierung) möglich ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden, da noch keine entsprechenden Daten in der Literatur vorliegen.

Durch die Nano-LC/MS können HSL in Bakterienkulturen in sehr geringen Konzentrationen (4-6 fmol) noch nachgewiesen werden, hierzu ist zwar keine Aufkonzentrierung der Proben, wohl aber eine *Aufreinigung* erforderlich, da anderenfalls eine massive Ionenunterdrückung und das Auftreten persistenter Störpeaks durch langsam von der Säule eluierendes Material festzustellen ist. Die Methode ist durch die Verwendung

selbstkonstruierter Säulen, den Einsatz von Standardbauteilen und die Benutzung normaler HPLC-Pumpen flexibel und kostengünstig - die Herstellung einer Säule erfolgt mit ca. 1 mg Füllmaterial und ist innerhalb einer Stunde abgeschlossen (vgl. Abschnitt 3.3.7); die Reproduzierbarkeit der Methode läßt jedoch nur eine semiquantitative Bestimmung der HSL-Konzentration in mikrobiellen Proben zu. Zwar stellt dies gegenüber den Daten aus den klassischen Biotests (vgl. Abschnitt 1.5) eine deutliche Verbesserung dar, gleichzeitig handelt es sich bei Bakterienkulturen um biologische Systeme, die von Hause aus bereits starken Schwankungen unterliegen; für eine Bestimmung veränderlicher Konzentrationen (z. B. in Zeitreihen zu HSL-Bildung und -Abbau) erscheinen die Ergebnisse jedoch unbefriedigend. Ein Einsatzgebiet der dargestellten Säulen könnte in der Mikroprobennahme in der Rhizosphäre liegen (kontinuierliches Aufsaugen von Bodenlösung und Adsorption der Analyten an C18-Material).

Mit der Anionenaustauscher-SPE nach alkalischer Hydrolyse existiert erstmals ein Verfahren zur Aufreinigung der Analyten aus Bakterienkulturen, das hinsichtlich des zeitlichen Aufwands (30 min SPE-Extraktion von bis zu 20 Parallelproben und anschließendes Einengen) der bisher verwendeten Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (dreimaliges Ausschütteln von mehreren hundert Millilitern Kulturüberstand im Scheidetrichter, Trocknen, Einrotieren etc.: vgl. Abschnitt C2) deutlich überlegen ist und die Bearbeitung einer großen Anzahl an Kulturproben in kurzer Zeit ermöglicht. Untersuchungen zur Kinetik von HSL-Produktion und HSL-Abbau werden hierdurch deutlich erleichtert, bzw. erst ermöglicht (vgl. Abschnitt 4.2). Ein weiterer wichtiger Vorteil der entwickelten Extraktionsmethode ist die Möglichkeit zur getrennten Erfassung von HSL und HS (Abbauprodukte) in bakteriellen Medien: Die Selbstregulation bakteriellen QS und die sich hieraus ergebenden Konsequenzen (vgl. Abschnitt 1.4) sind in ihren Details bisher nur wenig bearbeitet. Die durch die Anionenaustauscher-SPE erzielten Selektivitäten im Cleanup übertreffen zudem bei weitem die der klassischen Extraktion mit organischen Lösungsmitteln: in letzterer ist aufgrund des großen Hydrophobizitätsbereichs der Analyten (vgl. Abschnitt 3.4.3 und Abbildung D1) im Grunde lediglich eine sehr grobe Aufreinigung durch Abtrennung von hochpolaren Matrixbestandteilen zu erwarten. Zwar liegt die Wiederfindung nach der Anionenaustauscher-SPE im vorliegenden Fall nur wenig über 50%, allerdings konnten durch die Verwendung des internen Standards C7-HSL ausreichende quantitative Aussagen erzielt werden, um erstmals eine verlässliche mengenmäßige Erfassung von HSL und HS in Bakterienkulturen zu ermöglichen. Die Methode erlaubt die Bestimmung eines Summenparameters aus HSL und HS (nach Gesamthydrolyse) sowie die Bestimmung autochtoner HS (in nichthydrolysierten Proben), die Homoserinlactone lassen sich hingegen nur indirekt (durch Subtraktion der HS-Konzentration von den Summenparametern) erfassen. Durch Vergleich mit (semi-) quantitativen LC-Messungen konnte jedoch die weitgehende Richtigkeit der HSL-Bestimmung gezeigt werden.

Die Ergebnisse der Kapillarzonenelktrophorese von aufgereinigten Homoserinen waren im Vergleich zu allen anderen entwickelten Verfahren am besten reproduzierbar. Wie bereits in Abschnitt 1.6 dargestellt, existieren nur wenige verlässliche Daten zu den Konzentrationen der HSL (und gar keine zu den Konzentrationen von HS) in Bakterienkulturen; die in der CZE erzielbaren Nachweisgrenzen (0,01 µg/ml nach zehnfacher

Aufkonzentrierung durch die Anionenaustauscher-SPE) reichen jedoch für Detektion der meisten in Tabelle 1.4 dargestellten Konzentrationen aus (zur Diskrepanz zwischen *produzierter* und *in vitro effektiver* Konzentration vgl. Abschnitt 1.6). Ob die Methodensensitivität in Realproben aus Biofilmen, im Labor vorgenommenen Wachstumsversuchen, Rhizotronen, der unter Feldbedingungen existierenden Rhizosphäre etc. jedoch ausreicht und in diesem Fall quantitative Aussagen möglich sind, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden; die wenigen Daten zur Konzentration von HSL in Biofilmen (bis zu 600  $\mu\text{M}$ , vgl. Tabelle 1.4) sind in diesem Zusammenhang jedoch vielversprechend.

In Kapitel 4. sind Anwendungsbeispiele für die Identifikation und Quantifizierung von HSL und HS aus mikrobiologischen Proben dargestellt, Abschnitt 5. stellt weitere Perspektiven für den Einsatz der entwickelten Methoden vor.



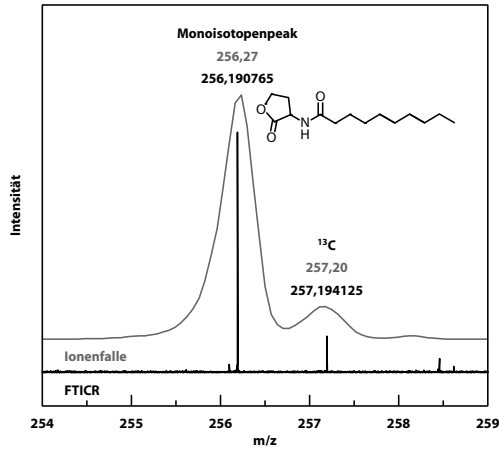
## 4. Anwendungsbeispiele

### 4.1 Identifikation von HSL durch Nano-LC/MS und FT-MS

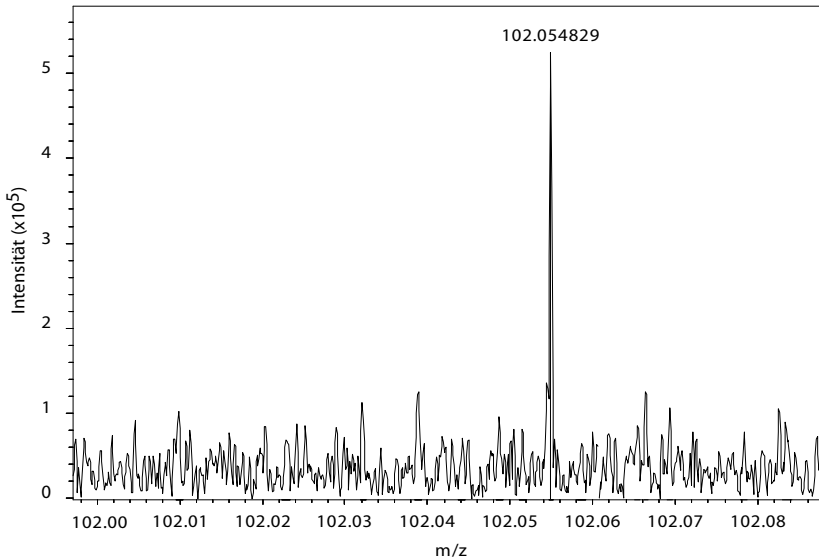
Die *Fourier Transform Ion Cyclotron-* (FTICR- oder FT-) Massenspektrometrie ermöglicht eine ultrahochauflösende Messung komplexer Proben mit einer Massengenauigkeit, die die aller anderen existierenden Gerätetypen übertrifft. Die hohe Massengenauigkeit erlaubt aufgrund des atomaren Massendefekts zumindest bei kleineren Massen ( $M \leq 500$ ) die eindeutige Zuordnung von Summenformeln. Abbildung 4.1 zeigt einen Vergleich zwischen der Massenbestimmung mit IT-Massenspektrometrie und FTICR. FTICR erlaubt eine extrem selektive und gleichzeitig hochsensitive Bestimmung von Einzelverbindungen, homologen Serien und Makromolekülen (vgl. u. a. HEEREN *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2002; WETTERHALL *et al.*, 2002a,b; KUJAWINSKI *et al.*, 2002; HUGHEY *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2000; HOFSTADLER *et al.*, 1996b; VALASKOVIC *et al.*, 1996) in hochkomplexen Mischungen wie Erdöl, NOM und biologischen Flüssigkeiten. Die FTICR-Massenspektrometrie - auch im Hinblick auf andere Metaboliten in der Rhizosphäre und komplexe Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen - steht im Zentrum künftiger Arbeiten an der GSF. Die tatsächliche analytische Komplexität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakterienkulturen ist bereits in Abschnitt 1.6 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen stand kein FTICR-Massenspektrometer in der Arbeitsgruppe zur Verfügung, die Experimente wurden daher im Rahmen einer Testmessung bei der Firma Bruker Daltonik GmbH in Bremen durchgeführt. Bakterielle Kulturextrakte (*B. cepacia* LA-5, *B. cepacia* JA-9 und *Acidovorax* sp. N-35; vgl. Abschnitt C2) wurden hier erstmals mittels FTICR-Massenspektrometrie im Hinblick auf HSL untersucht, die Messungen dienten dabei einerseits der Bestätigung der durch die vorangestellten Untersuchungen detektierten Verbindungen; in einem Extrakt (*Acidovorax* sp. N-35) wurde ein bisher unbekanntes (d. h., nicht durch einen internen Standard belegtes) Molekül eindeutig nachgewiesen.

Abbildung 4.2 zeigt das Signal mit  $m/z$  102 aus der Messung eines Kulturüberstands von *B. cepacia* JA-9 mit FTICR-MS nach Infrarotlaser-Multiphotoneniondissoziation auf C10-HSL ( $[M + Na]^+$ ). Die geringe Abundanz des detektierten Peaks (wie aus dem Signal-Rausch-Verhältnis ersichtlich) erklärt sich dabei durch die Anwesenheit von  $Na^+$ : Na-kationisierte Ionen zeigen generell geringere Fragmentierungstendenz, allerdings war das protonierte ( $[M + H]^+$ ) Ion in zu geringer Abundanz vorhanden, um hiermit Fragmentierungsversuche durchführen zu können. Die Masse ( $m/z$ ) des Fragments wurde mit 102,054829 bestimmt; für die Summenformel kommt damit nur  $C_4H_8NO_2$  in Frage (Abweichung 1,230 ppm); die in den Abbildungen 3.14 und 3.45 dargestellten Fragmentierungsmechanismen sind damit bestätigt.

In Abbildung 3.14 ist die Messung eines Kulturextrakts aus *B. cepacia* LA-5 durch Na-



**Abbildung 4.1.** Vergleich der Massenbestimmung von C10-HSL aus *B. cepacia* LA-5 in der Ionenfalle (grau, Peakmaximum des in Abbildung 4.3 dargestellten Nano-LC-Laufs) und im FTICR-Massenspektrometer (schwarz, Direktinfusion wie in Abschnitt B1) dargestellt.



**Abbildung 4.2.** Bestätigung des Fragmentierungsschemas der HSL durch FTICR-Massenspektrometrie: Infrarotlaser-Dissoziation (*B. cepacia* JA-9) zur Bildung des Homoserinlacton-Fragmentierungsproduktes (vgl. Abbildung 3.14). C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>; Massenabweichung 1,230 ppm.

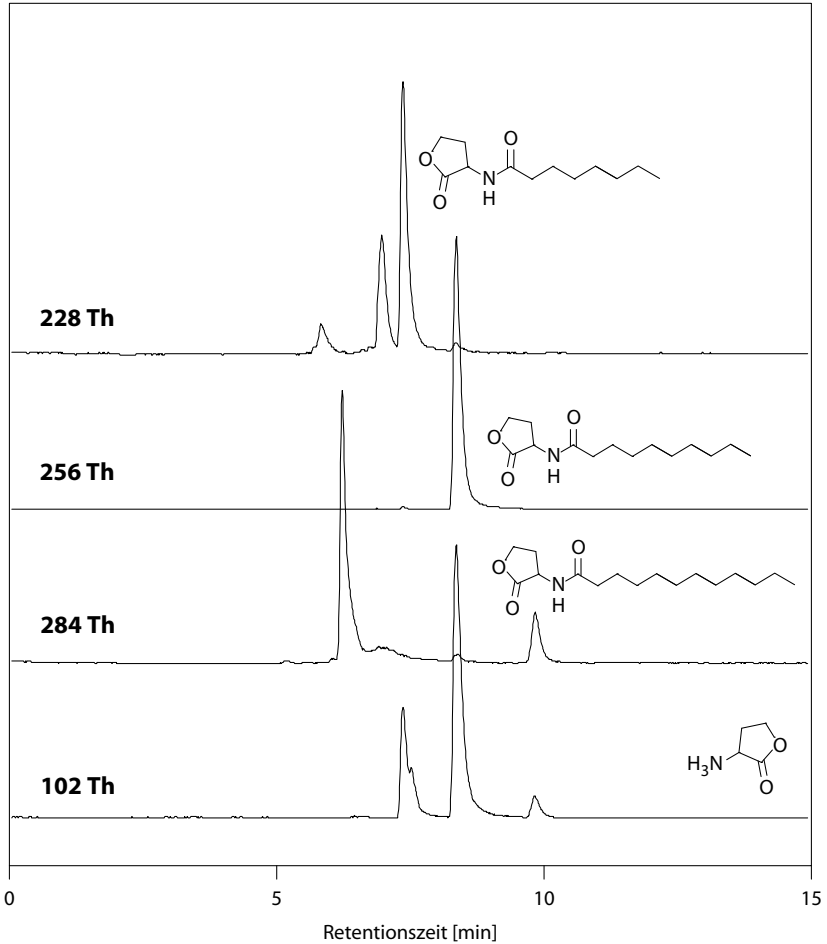
no-LC/MS dargestellt (vgl. Abschnitt 3.3 und B2); die Messung erfolgte mit 20% *source fragmentation*, um die Analyten über das Homoserinlactonfragment ( $m/z$  102) nachweisen zu können. In der Probe wurden hierdurch C8-, C10- und C12-HSL detektiert, das Fragmentierungsmuster entspricht dem der kommerziell erhältlichen Standards (siehe auch Abbildung 3.27 und 3.28). In *Acidovorax* sp. N-35 (Abbildung 4.4) ergab die Messung einen deutlichen Peak mit  $m/z$  272; ein Vergleich mit möglichen HSL-Massen (Tabelle D1) lieferte den Hinweis auf ein hydroxyliertes C10-HSL (OH-C10-HSL). Bereits das in Abbildung 4.5 dargestellte Fragmentierungsmuster erhärtet diesen Hinweis.

Abbildung 4.6 zeigt die Bestimmung ausgewählter HSL aus den unterschiedlichen Proben; in der Regel kann hierbei sowohl das Natrium-kationisierte ( $[M + Na]^+$ ) als auch das protonisierte ( $[M + H]^+$ ) Ion detektiert werden. Tabelle 4.1 faßt die Ergebnisse zusammen. In allen Extrakten wurde unerwarteterweise OH-C10-HSL gemessen; allerdings in den *Burkholderia*-Kulturen nur mit geringer Intensität; die *Burkholderia*-Kulturen produzieren als Hauptsignalmolekül C10-HSL (wie auch in allen anderen in Abschnitt 3. dargestellten Messungen festgestellt); Hauptprodukt bei *Acidovorax* ist das OH-C10-HSL. Die Messung mit FTICR-MS erlaubt dabei zwar nur eine überschlagsmäßige Quantifizierung; die Befunde sind jedoch vielversprechend (Vergleich zwischen der Messung von *B. cepacia* LA-5 mit FTICR und CZE/MS in Abbildung 4.7) und sollten bei weiterer Optimierung eine Quantifizierung der HSL über einen internen Standard durch Direktinfusion (d. h. ohne vorherige Trennung) ermöglichen.

## 4.2 Produktions- und Abbaukinetik von HSL

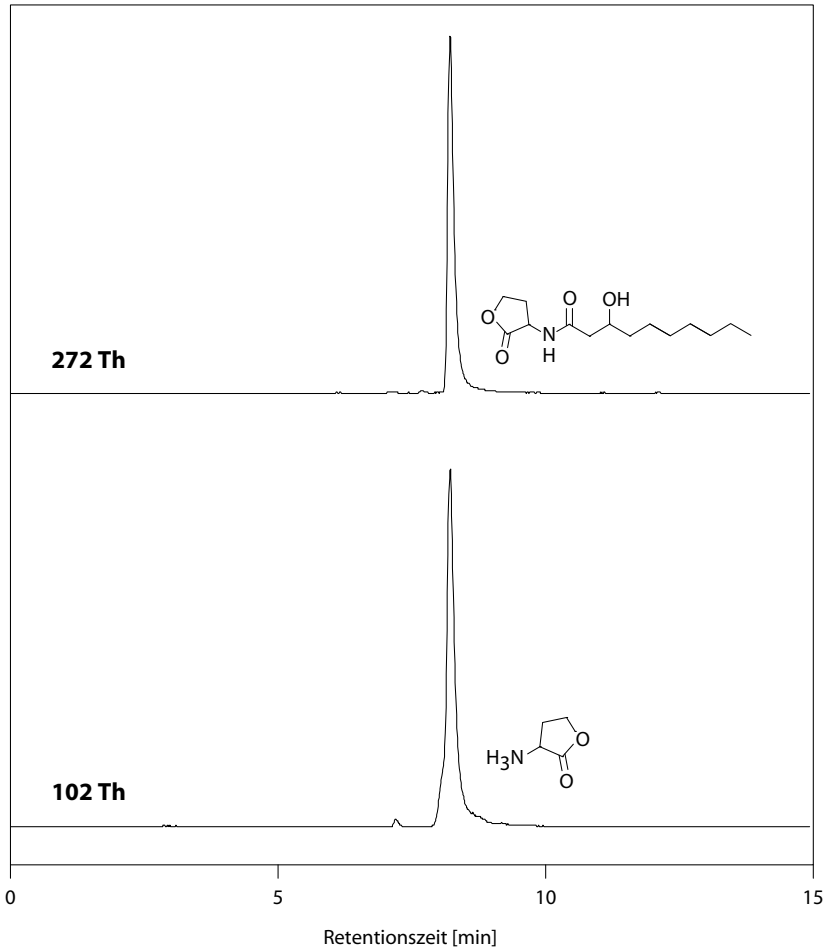
Die Kinetik der HSL-Produktion und der nichtenzymatische Abbau der Signalmoleküle zu den Homoserinen ist mit konventionellen Methoden bisher nur unzureichend untersucht, nur vereinzelt existieren entsprechende Publikationen (siehe Abschnitt 1.4). Der Grund hierfür liegt wohl einerseits in der aufwendigen HSL-Extraktion durch organische Lösungsmittel und andererseits an der nur unzureichenden Quantifizierbarkeit der Analyten in der Dünnschichtchromatographie: Die Abbauprodukte zeigen im Bioassay keine Aktivität, daher sind über die Hydrolyse der HSL hier immer nur indirekte Aussagen möglich.

Im vorliegenden Versuch wurden unterschiedliche Isolate von Bodenbakterien über 24 h kultiviert; die Probenahme erfolgte nach 5, 8, 12 und 24 Stunden. Bei der Probenahme wurden jeweils die optische Dichte (als Maß für die Zelldichte) und der pH der Kultur erfaßt. Jeweils 10 ml des Kulturüberstands (zur Herstellung vgl. Abschnitt C2 im Anhang) wurden für die Analysen herangezogen. Ein Aliquot der Probe (5 ml) wurde unter Standardbedingungen (Abschnitt B6 im Anhang) hydrolysiert, beim zweiten Aliquot (5 ml) erfolgte die Zugabe von Natronlauge und Phosphorsäure in umgekehrter Reihenfolge, wodurch identische Matrixkonzentrationen in der Probe erzielt werden, der pH-Wert jedoch durchweg im Sauren bleibt. Durch diese Herangehensweise werden im ersten Aliquot sowohl in der Probe enthaltene Lactone als auch die bereits vorliegenden Säuren als Summenparameter erfaßt; im zweiten Aliquot wer-

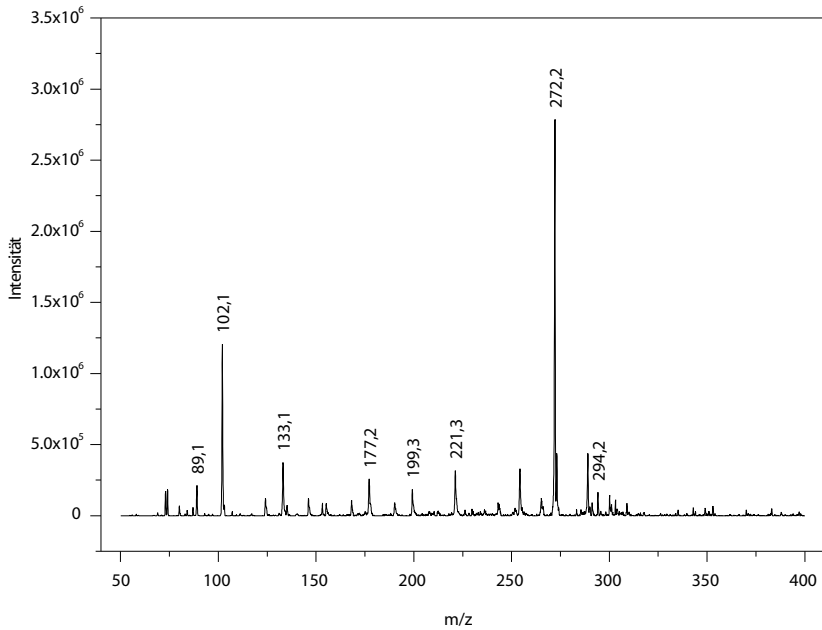


**Abbildung 4.3.** Bestimmung von C8-, C10- und C12-HSL in *B. cepacia* sp. LA-5 mit Nano-LC/MS (Ionenfalle) unter den in Abschnitt 3.3 dargestellten Standardbedingungen (20 cm/75  $\mu\text{m}$ -Kapillare mit 5  $\mu\text{m}$  Hypersil ODS, 150 bar, 80% Methanol, 1  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen) und Identifizierung der Peaks über das Homoserinlactonfragment mit  $m/z$  102 (vgl. Abbildung 3.14).

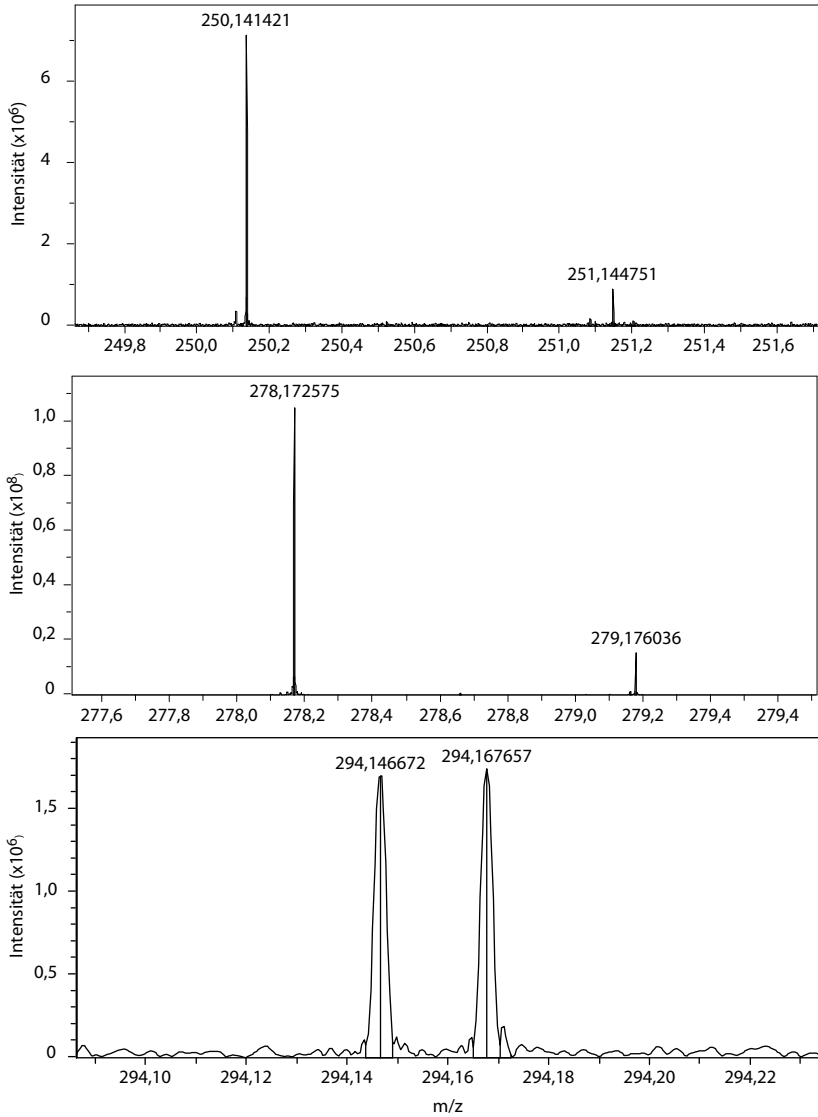




**Abbildung 4.4.** Bestimmung des putativen OH-C10-HSL in *Acidovorax* sp. N-35 mit Nano-LC/MS (Ionenfalle) unter den in Abschnitt 3.3 dargestellten Standardbedingungen (20 cm/75  $\mu\text{m}$ -Kapillare mit 5  $\mu\text{m}$  Hypersil ODS, 150 bar, 80% Methanol, 1  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen) und Identifizierung des Peaks über das Homoserinlactonfragment mit  $m/z$  102 (vgl. Abbildung 3.14).



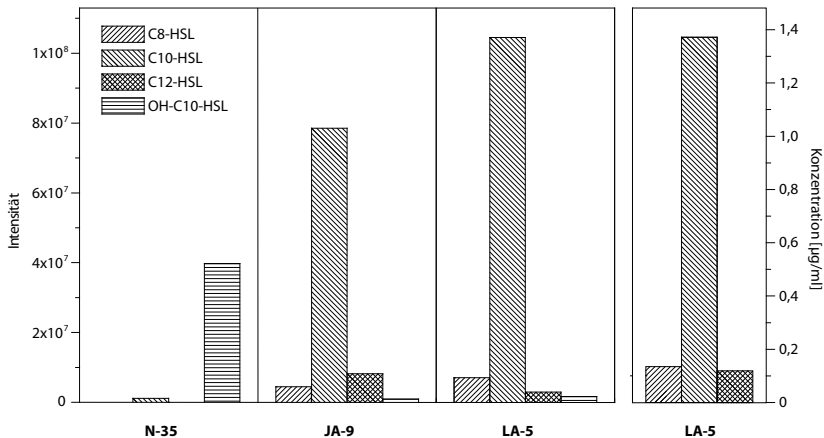
**Abbildung 4.5.** Fragmentmuster des putativen OH-C10-HSL mit  $m/z$  272 aus *Acidovorax* sp. (Peakmaximum der Abbildung 4.4).



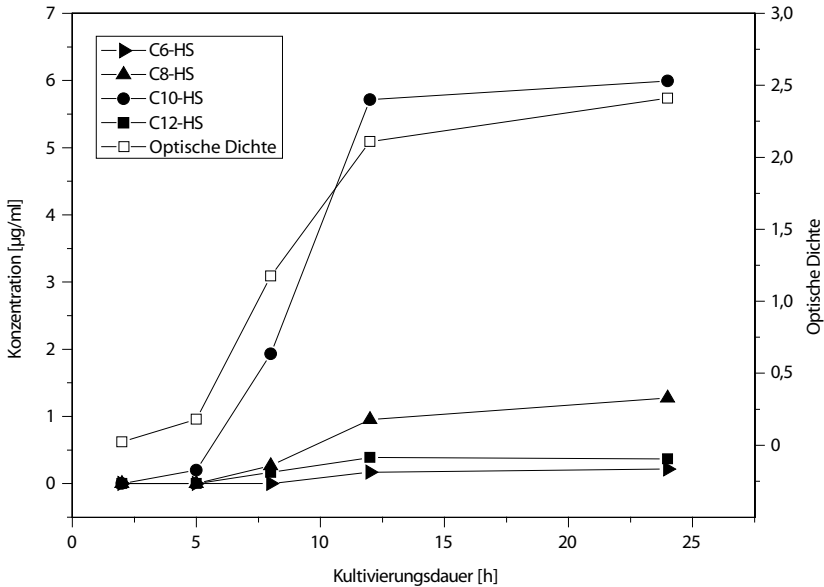
**Abbildung 4.6.** Identifizierung von HSL durch FTICR-Massenspektrometrie. **Oben:** C8-HSL ( $[M + Na]^+$ ), **Mitte:** C10-HSL ( $[M + Na]^+$ ) aus *B. cepacia* JA-9. **Unten:** OH-C10-HSL in *Acidovorax* sp. N-35.

**Tabelle 4.1.** Durch FTICR-Massenspektrometrie nachgewiesene Homoserinlactone in *B. cepacia* LA-5 und JA-9 sowie *Acidovorax* sp. N-35 (n. b. - nicht bestimmt).

<i>B. cepacia</i> LA-5	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	OH-C10-HSL
Theoret. Masse (protoniert)	228,151595	256,190720	284,222020	272,185635
Exp. Masse (protoniert)	n. b.	256,190765	284,222080	n. b.
<b>Abweichung</b>	–	<b>0,457 ppm</b>	<b>- 0,537 ppm</b>	–
Theoret. Masse (Na-kationisiert)	250,141365	278,172665	306,203965	294,167579
Exp. Masse (Na-kationisiert)	250,141421	278,172575	306,204333	294,167657
<b>Abweichung</b>	<b>0,499 ppm</b>	<b>0,050 ppm</b>	<b>- 0,344 ppm</b>	<b>- 0,331 ppm</b>
<i>B. cepacia</i> JA-9	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	OH-C10-HSL
Theoret. Masse (protoniert)	228,151595	256,190720	284,222020	272,185635
Exp. Masse (protoniert)	n. b.	256,190837	284,222173	n. b.
<b>Abweichung</b>	–	<b>0,457 ppm</b>	<b>- 0,537 ppm</b>	–
Theoret. Masse (Na-kationisiert)	250,141365	278,172665	306,203965	294,167579
Exp. Masse (Na-kationisiert)	250,141490	278,172651	306,204070	294,167677
<b>Abweichung</b>	<b>0,499 ppm</b>	<b>0,050 ppm</b>	<b>- 0,344 ppm</b>	<b>- 0,331 ppm</b>
<i>Acidovorax</i> sp. N-35	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	OH-C10-HSL
Theoret. Masse (protoniert)	228,151595	256,190720	284,222020	272,185635
Exp. Masse (protoniert)	n. b.	n. b.	n. b.	272,185685
<b>Abweichung</b>	–	–	–	<b>0,185 ppm</b>
Theoret. Masse (Na-kationisiert)	250,141365	278,172665	306,203965	294,167579
Exp. Masse (Na-kationisiert)	n. b.	278,172732	n. b.	294,167575
<b>Abweichung</b>	–	<b>0,050 ppm</b>	–	<b>0,016 ppm</b>



**Abbildung 4.7.** Quantitative Abschätzung von HSL durch FTICR-Massenspektrometrie. **Linke Graphik:** Peakintensitäten der nachgewiesenen HSL (Na-Addukte) in den untersuchten Stämmen; **Rechte Graphik:** Quantifizierung in der CZE nach Anionenaustauscher-SPE (8-Stunden-Probe).



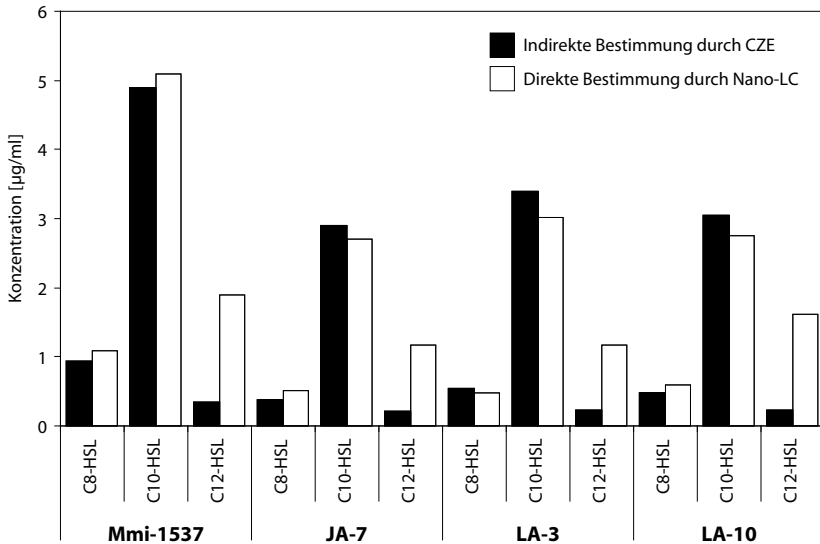
**Abbildung 4.8.** Produktion von HSL und HS (Summenparameter nach Totalhydrolyse) durch *B. cepacia* Mmi-1537.

den nur die bereits vorliegenden Säuren gemessen. Die Zugabe des internen Standards (5 µg/ml C7-HSL) erfolgte in beiden Fällen in hydrolysierten Form unmittelbar vor der Extraktion; die Messung erfolgte durch Kapillarzonenlektrophorese wie in Abschnitt 3.4 dargestellt.

In den Stämmen Mmi-1537, JA-7, LA-1, LA-3, LA-5 und LA-10 konnten HSL bzw. HS detektiert werden. Die Identifizierung der HS aus Mmi-1537 und der verwendete Quantifizierungsansatz ist bereits in Abschnitt 3.4.7 dokumentiert. Abbildung 4.8 zeigt die aus dem hydrolysierten Aliquot ermittelten Werte (also hydrolysierte Homoserinlactone und in der Probe bereits vorhandene Homoserine als Summenparameter).

Zur indirekten Bestimmung der HSL-Konzentration wurden die HS-Konzentrationen aus der unhydrolysierten Probe von den Werten der hydrolysierten Probe subtrahiert; Abbildung 4.10 zeigt die hierdurch ermittelten HSL- und die direkt gemessenen HS-Konzentrationen. Die Konzentrationen konnten durch semiquantitative Nano-LC/MS-Messungen (siehe Abschnitt 3.3.7) größenordnungsmäßig bestätigt werden (vgl. Abbildung 4.9): Die Werte stimmen für C8- und C10- gut überein, für C12- ergibt sich in der LC eine Über- bzw. in der CZE eine Unterbestimmung. Grund hierfür könnte die relativ schlechte Erfassbarkeit von C12-HSL in der LC aufgrund der hohen Retentionszeit sein.

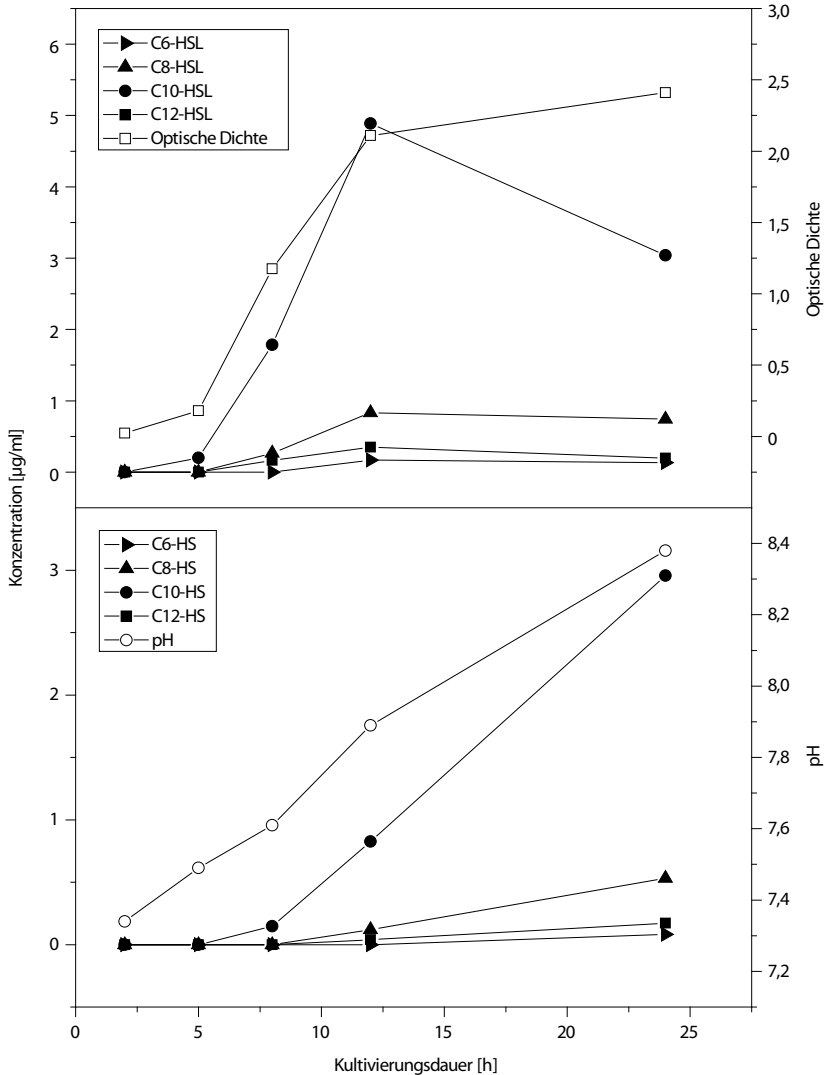
Der Gehalt an HSL + HS korreliert in allen Fällen auffällig mit der optischen Dichte



**Abbildung 4.9.** Quantifizierung von C8-, C10- und C12-HSL in den untersuchten Stämmen durch CZE/MS (indirekte Bestimmung, vgl. Text) und (semiquantitative) Nano-LC/MS (Abschnitt 3.3.7).

der Kultur; anscheinend findet damit *keine* verstärkte Produktion von HSL bei höheren Zelldichten statt. Entweder ist der in Abschnitt 1.1 dargestellte kritische Schwellenwert, ab dem in Form einer verstärkten Rückkopplung eine verstärkte HSL-Bildung einsetzt hier bereits bei sehr viel niedrigeren Zelldichten überschritten oder die positive Induktion der HSL-Produktion ist bei *B. cepacia* nicht deutlich ausgeprägt. Eine weitere Erklärung für das beobachtete Phänomen könnte in einem anderen, durch die Analytik nicht erfaßten Abbaupfad für HSL (d. h. nicht zu den Homoserinen) liegen (entsprechende Abbauprodukte wie Fettsäuren wurden in den Messungen nicht nachgewiesen). Die Kulturen erreichen in der stationären Phase bereits eine Situation des Ressourcenmangels, in der die Produktion von HSL durchaus bereits gedrosselt sein könnte, oder aber die gebildeten HSL (oder fettsäureähnliche Abbauprodukte) verstoffwechselt werden könnten.

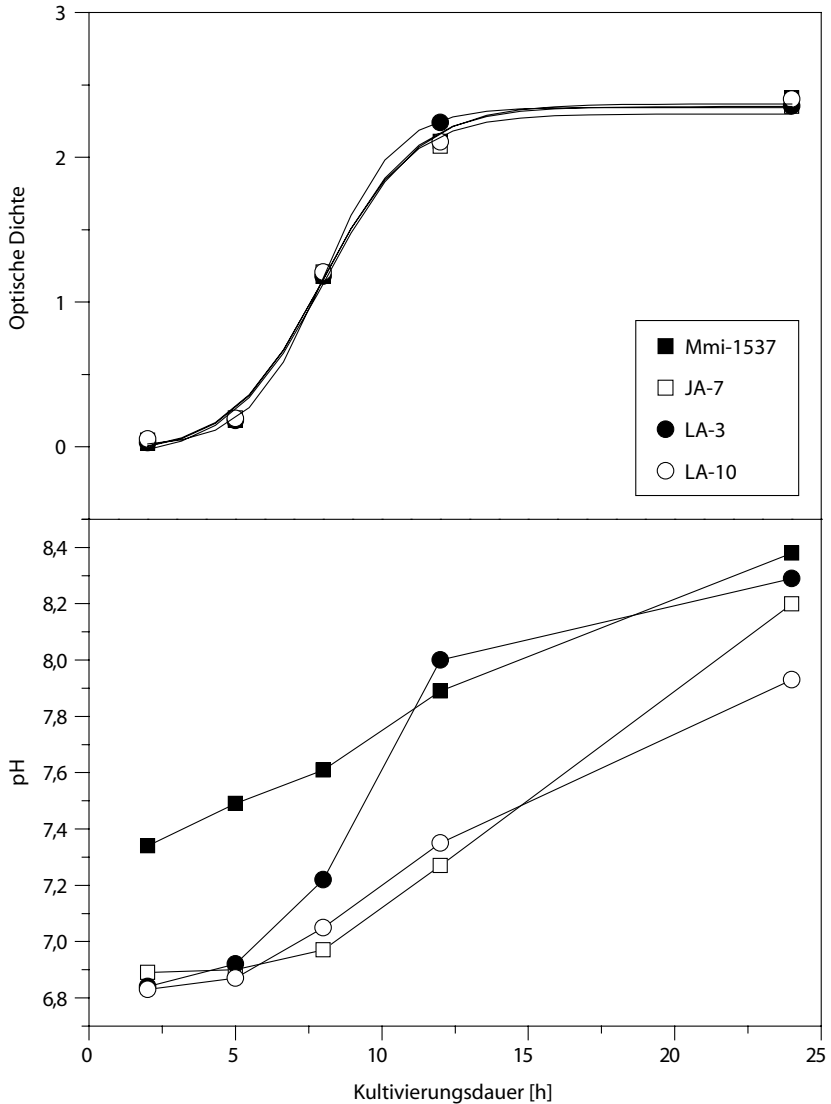
Abbildung 4.11 und 4.12 zeigt einen Vergleich zwischen vier Rhizosphärenisolaten von *B. cepacia*, aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abbildung 4.12 hierbei nur die C10-HSL bzw. C10-HS-Werte dargestellt. Die Entwicklung der optischen Dichte (Abbildung 4.11 oben) verläuft in allen vier Stämmen nahezu identisch. Nach Erreichen der *lag*-Phase kommt die Produktion von C10-HSL offensichtlich vollständig zum Erliegen (die Summe aus HSL und HS bleibt nahezu gleich), die Abbaurrate der Lactone korreliert auffällig mit dem in allen Fällen ansteigenden pH der Kulturen (Abbildung



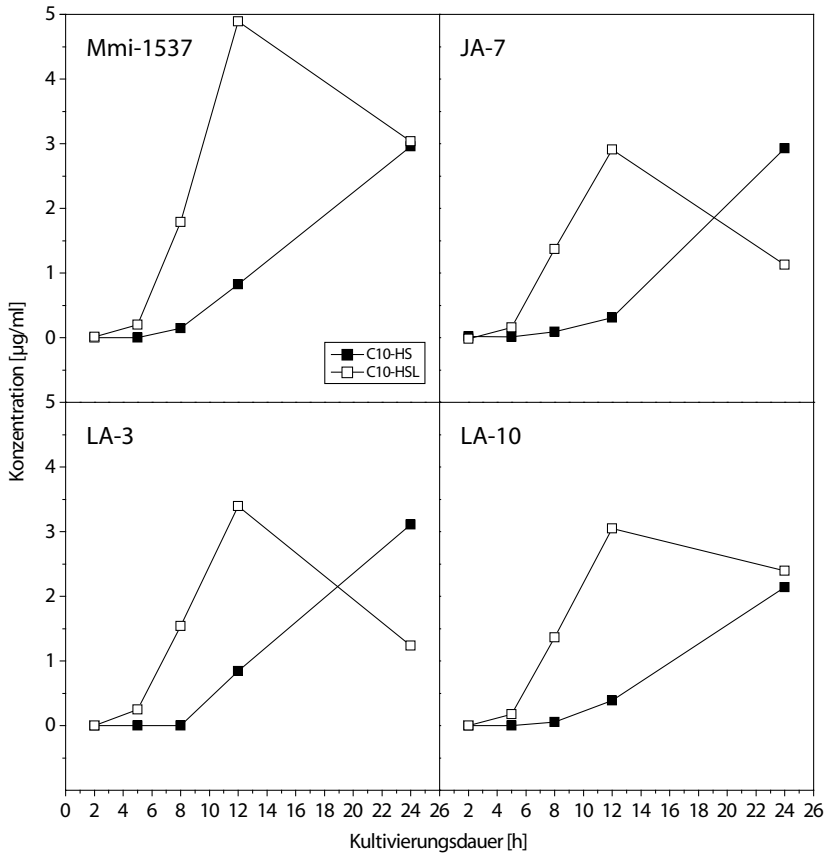
**Abbildung 4.10. Oben:** Produktion von HSL (Bestimmung durch Subtraktion der HS-Werte aus unhydrolysierten Proben von den Summenparametern in Abbildung 4.8). **Unten:** Auftreten der HS (HSL-Abbauprodukte, Messung von unhydrolysierten Proben). **B. cepacia** Mmi-1537, zu Details siehe Text.

4.11 unten, der pH-Anstieg ist auf die Produktion von Ammoniak aus dem Proteinabbau zurückzuführen). Die Konzentration von C10-HS (und damit der Abbau von C10-HSL) ist bei den Stämmen Mmi-1537 und LA-3 nach 12 Stunden doppelt so hoch wie in den beiden anderen Kulturen, gleichzeitig ist der pH hier deutlich erhöht. Die in dieser Arbeit nur ansatzweise untersuchten Produktions- und Abbaukinetiken der HSL stehen im Zentrum künftiger Arbeiten und bilden die Basis für die mathematische Modellierung des QS.





**Abbildung 4.11.** Wachstumskurven (**oben**: sigmoidal-gefitzte Änderungen in der optischen Dichte bei 600 nm) und pH-Verlauf in Kulturen von *B. cepacia* (Isolate Mmi 1537, JA-7, LA-3 und LA-10) über 24 h.



**Abbildung 4.12.** Konzentrationsverlauf von C10-HSL und C10-HS in Kulturen von *B. cepacia* (Isolate Mmi 1537, JA-7, LA-3 und LA-10) über 24 h.

## 5. Schlußfolgerungen und Ausblick

Bereits in Abschnitt 1.1 ist die umfangreiche Bedeutung des bakteriellen Quorum Sensing vor dem Hintergrund ökologischer, landwirtschaftlich-ökonomischer und medizinischer Fragestellungen diskutiert. Bis zum Beginn der hier vorgestellten Arbeit existierten - neben den konventionell angewandten Biotests - lediglich wenige Verfahren zur Analyse der beteiligten bakteriellen Semiochemikalien, die zudem aufgrund der erforderlichen Konzentrationen oder der spezifischen Derivatisierung auf Ausnahmefälle oder Untergruppen der Analyten beschränkt bleiben mußten. Erst nach den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen zur Nano-LC/MS-Analytik wurde durch MORIN *et al.* (2003) eine universeller einsetzbare Methode zum Nachweis von HSL veröffentlicht, die jedoch auf klassischer HPLC/MS (mit 4,6 mm-Säulen) beruht und die aufwendige Dichlormethanextraktion bakterieller Kulturextrakte nicht umgeht. Aufgrund der hierdurch verbrauchten Probenmenge (und der erzielten Ergebnisse) erscheint diese Technik daher für die in der Arbeitsgruppe (in Kooperation mit anderen Partnern an der GSF) bestehende Zielsetzung (Untersuchung von Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen in der Rhizosphäre durch gezielte Probenahme und Analyse geringster Probenmengen) als kaum geeignet.

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war daher die Entwicklung von MS-gekoppelten Kapillartechniken zum Nachweis von HSL aus komplexen mikrobiologischen Proben (für eine detailliertere Diskussion vgl. Abschnitt 1.6 und 2.2), die die Option zur *in situ*-Analytik offenhält. Ein zentraler Aspekt war der Einsatz weitgehend *unabhängiger* Trenn- und, wo möglich, auch *unabhängiger* Detektionssysteme, um die gewonnenen Ergebnisse wechselseitig qualitativ, aber auch quantitativ abzusichern. Durch den Einsatz der *partial filling*-MEKC (Abschnitt 3.2), der miniaturisierten Flüssigkeitschromatographie (Abschnitt 3.3) und der Kapillarzonenelektrophorese nach Anionenaustauscher-SPE (Abschnitt 3.4) - diese in Kopplung mit der Ionenfallen-Massenspektrometrie - und der GC/MS als Ergänzung (Abschnitt 3.5) wurde somit auch nahezu die gesamte Bandbreite der verfügbaren analytischen Techniken abgedeckt. Alle Methoden erwiesen sich für die Detektion der Zielverbindungen unter Realbedingungen (Bakterienkulturen) als geeignet. Die Ergebnisse entsprechen einander qualitativ dabei weitestgehend: wo eine Quantifizierung möglich war (in der Nano-LC/MS und der CZE-MS) stimmen die gewonnenen Ergebnisse zumindest größenordnungsmäßig überein. Die qualitativen Aussagen der obengenannten Methoden wurden hierbei durch FTICR-Massenspektrometrie bestätigt (Abschnitt 4.1). Die Ergebnisse der einzelnen Techniken sind bereits in Abschnitt 3.6 vergleichend diskutiert.

Die *partial filling*-MEKC ist hierbei von überwiegend akademischem Interesse; zwar erlaubt sie Aussagen über den Tensidcharakter der Analyten (und damit über eine biologisch außerordentlich bedeutsame physikochemische Eigenschaft, vgl. Abschnitt 3.6),

gegen einen routinemäßigen Einsatz in der HSL-Analytik sprechen jedoch die geringe Reproduzierbarkeit in der Quantifizierung und der hohe Optimierungsaufwand zur Erzielung optimaler Ergebnisse. Im Gegensatz zur Kombination aus chromatographischen und elektrophoretischen Trennprinzipien, wie sie die MEKC darstellt, erwies sich die rein elektrophoretische Trennung der HSL-Hydrolysate durch die CZE hingegen nach Optimierung und bei Kopplung mit dem entwickelten *sheath-liquid* ESI-Interface als außerordentlich robuste und hinreichend sensitive analytische Methode. Durch die Eichung mit dem internen Standard C7-HSL erlaubt das Verfahren Aussagen über die Produktions- und Hydrolysekinetik der HSL. In Verbindung mit der bereits angelaufenen mathematischen Modellierung (GSF, Institut für Biomathematik und Biometrie) werden die Meßergebnisse vertiefte Einblicke in die Mechanismen der Quorum Sensing erlauben.

Eine Beispielrechnung verdeutlicht in diesem Zusammenhang die Leistungsfähigkeit der CE: Der einzig vergleichbare Artikel (MORIN *et al.*, 2003) gibt als *limit of detection* (LOD) der HPLC/MS einen Bereich von 0,3 pmol (C12-HSL) bis 9,3 pmol (C4-HSL) pro Injektion in dotierter Matrix an; in den in Abschnitt 3.4.6 dargestellten Versuchen mit CZE konnte noch eine Konzentration von 0,01 µg/ml (vor Aufkonzentrierung) bzw. 0,1 µg/ml (nach Aufkonzentrierung) der Einzelstandards nachgewiesen werden. Bei 5 s Injektionszeit sowie einer Säule mit 75 µm Innendurchmesser und 50 cm Länge ergibt sich aus Tabelle 2.3 ein injiziertes Volumen von ca. 34 nl. Für C6-HSL ( $M_r = 199$ ) ergibt sich hieraus eine Konzentration von nur 17 fmol - und damit mindestens eine Größenordnung weniger, als in der obengenannten Publikation. Die Nano-LC (Abschnitt 3.3.6) erreicht Detektionslimits bei geringeren Konzentrationen (im einstelligen nM-Bereich), aber vergleichbaren Absolutmengen (4-6 fmol). Eine weitere Erhöhung der Sensitivität auf der MS-Seite erscheint damit schwierig und stößt an die physikalische Grenzen des verwendeten Massenspektrometers, hingegen sind die Aufkonzentrierungsmöglichkeiten v. a. auf der CE-Seite noch kaum ausgeschöpft (vgl. OSBOURN *et al.*, 2000; BRITZ-MCKIBBIN & TERABE, 2003) und sollten auch für die Analytik der HSL erprobt werden. Die Kopplung von CE und *sheathless-* bzw. *nano-spray*-ESI erwies sich als problematisch - vielversprechender scheint ein Ansatz mit Mikrofraktionssammlung und *offline*-ESI (in Chipform) zu sein, wie am Ende dieses Kapitels diskutiert.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt (Abschnitte 3.3.7 und 3.1.5) ist die Nano-LC-Methode zwar hinsichtlich reproduzierbarer quantitativer Aussagen der Kapillarzonenelektrophorese unterlegen, erlaubt jedoch die Bestimmung geringster Analytenkonzentrationen und damit eine hochsensitive Nachweisanalytik. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfordert die Analyse zwar noch die vorherige Aufreinigung der Proben - bei der Verwendung von zweidimensionalen Nano-LC Trennverfahren (LC×LC) könnte diese Einschränkung jedoch umgangen werden. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise an die Kopplung einer Anionenaustauscher-Säule und einer C18-Säule, und damit die *online*-Kopplung der in Abschnitt 3.4.3 dargestellten Extraktion und der in Abschnitt 3.3 dargestellten Trennung auf Basis der Hydrophobizität zu denken. Erste Versuche in dieser Richtung sind bereits angelaufen (Kooperation Prof. Dr. Zhang, Fudan University, Shanghai). Weitere Optionen sind die Verwendung von (Vor-) Säulen mit *restricted*

access-Materialien (RAM: BOOS, 2004; BOOS & GRIMM, 1999), die einen *cutoff* oberhalb definierter Molekülgrößen (z. B. 15 oder 70 kD) gewährleisten. Hierdurch ist es bereits heute möglich, komplexe Proben wie Plasma, Serum, Milch etc. direkt im *column switching*-Verfahren zu analysieren. Eine Miniaturisierung auch dieser Technik ist denkbar.

Aufgrund der schnellen und kostengünstigen Herstellung der Säulen besteht die Perspektive, diese nicht ausschließlich für die *Trennung*, sondern auch für das *Sampling* einzusetzen: Die Beprobung von Wurzeln erfolgt unter anderem auch in Rhizotronen unter Einsatz von Saugkerzen unter kontinuierlichem, langsamem Abpumpen der Bodenlösung und der *on line*-Adsorption an SPE-Kartuschen (Prof. Dr. A. Göttlein, pers. Mittlg.); in diesem Zusammenhang ist denkbar, im Sinne einer Miniaturisierung die Kapillaren entsprechend einzusetzen und damit zu einer echten *in situ*-Probennahme zu gelangen.

Zwar ist die GC/MS von HSL in ihrem gegenwärtigen Entwicklungsstand eher als eine ergänzende Technik zu sehen und erfordert noch Optimierungsbedarf; Perspektiven für ihren Einsatz bestehen jedoch vor allem im Hinblick auf chirale Trennungen: Die ausschließliche L-Konfiguration der HSL wird zwar häufig in der Literatur erwähnt und erscheint aufgrund des in Abbildung 1.4 dargestellten Biosynthesewegs auch wahrscheinlich, ist jedoch bisher noch keineswegs eindeutig nachgewiesen. Weitere Einsatzgebiete der GC/MS werden aufgrund der höheren Verfügbarkeit entsprechender Instrumente bei der Routineanalytik von HSL-haltigen Proben (klinische Isolate, Lebensmittel) gesehen.

Ein weiterer, wichtiger Schritt im Hinblick auf künftige Messungen ist die Synthese definierter HSL, da bisher erhältliche kommerzielle Standards (vgl. Tabelle D2) bei weitem nicht die Bandbreite der in der Natur vorkommenden Verbindungen (vgl. v. a. Tabelle 1.3) abdecken. In diesem Zusammenhang ist insbesondere auch an isopenmarkierte (und damit »echte« interne Standards), aber auch an enantiomerenreine Verbindungen zu denken (siehe auch oben).

Bisher wurde in der hier vorgestellten Analytik (vgl. Abschnitt 3.3.7 und 3.4) mit dem internen Standard C7-HSL gearbeitet, da Homoserinlactone mit ungeradzahigen Seitenketten in der Natur aufgrund der Biosynthese (vgl. Abschnitt 1.3) nicht zu erwarten sind (und, wie durch Kontrollmessungen bestätigt, auch in den hier untersuchten Proben nicht auftraten). Gleichzeitig wurde jedoch durch LITHGOW *et al.* (2000) bzw. HORNG *et al.* (2002) bei *Rhizobium leguminosarum* und *Serratia marcescens* C7-HSL nachgewiesen. Durch die mittlerweile schnelle Analytik (SPE und CZE/MS) sollte es möglich sein, die Herkunft dieser Verbindung (durch die Bestimmung eventuell vorhandener Vorläufermoleküle) nachzuweisen, wobei gerade die hochauflösende Massenspektrometrie eine wichtige Rolle spielen wird.

Die FTICR-Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 4.1) bietet ein außerordentlich hohes Potential für die Charakterisierung bekannter (durch Standards belegter aber auch strukturanaloger) HSL und bisher unbekannter Signalverbindungen in hochkomplexen mikrobiologischen Proben. Durch die extrem hohe Massenauflösung (bei einem gleichzeitig hohen Massenbereich) war es in der vorgestellten Arbeit möglich, Einzelverbindungen in den extrahierten Kulturüberständen ohne vorhergehende chromat-

graphische oder elektrophoretische Trennung nachzuweisen (zur Komplexität der Proben vgl. Abbildung 1.6). In den zukünftig zu erwartenden Realproben (Bodenlösungen und rein mineralische Puffer, also Proben mit geringeren Matrixkonzentrationen) wird es in Verbindung mit miniaturisierten Probenaufgabe- und Ionisierungsverfahren wie *on chip*-ESI (ZAMFIR *et al.*, 2004; BINDILA *et al.*, 2004) damit möglich sein, Probenmengen in Nanolitermaßstab - mit oder ohne vorheriger Auftrennung und Mikrofraktionierung - analysieren zu können. Die FTICR-Massenspektrometrie ist zwar nicht primär eine Methode zur Quantifizierung, wie in Abbildung 4.7 gezeigt werden konnte, erlaubt die Technik jedoch sehr wohl eine überschlagsmäßige Mengenabschätzung der bakteriell gebildeten Signalmoleküle. Die Genauigkeit dieser Quantifizierung könnte hierbei durch die Verwendung isotoopenmarkierter Verbindungen deutlich erhöht werden. Sowohl die in Abschnitt 3.3 dargestellte Nano-LC, als auch die CZE (Abschnitt 3.4) sind dabei mit FTICR koppelbar und erweitern damit die erzielbaren Ergebnisse um eine weitere Dimension.

## Literaturverzeichnis

- ABIAN, J. (1999). The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **34**: 157.
- AEBI, B. & HENION, J. D. (1996). The reduction of chemical noise in an atmospheric pressure ionization/ion-spray interface for mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 947.
- AGROFOLIO, L. A., CAHOURS, X., TRAN, T. T., DESSANS, H., KIEDA, C. & MORIN, P. (2001). Analysis of anti-HIV nucleoside inhibitors by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleosid. Nucleotid.* **20**: 375.
- AGUILAR, C., HOFTE, A. J. P., TJJADEN, U. R. & VAN DER GREEF, J. (2001). Analysis of histones by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **926**: 57.
- AHRER, W. & BUCHBERGER, W. (1999). Determination of haloacetic acids by the combination of non-aqueous capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **365**: 604.
- (2001). Combination of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry for the determination of drug residues in water. *Monatsh. Chem.* **132**: 329.
- ALBRECHT, V. (2002). Charakterisierung von N-Acyl-Homoserinlacton produzierenden Rhizosphärenbakterien verschiedener Pflanzen. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- ALEXANDER, J. N., SCHULTZ, G. A. & POLI, J. B. (1998). Development of a nano-electrospray mass spectrometry source for nanoscale liquid chromatography and sheathless capillary electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**: 1187.
- ANDERSEN, J., HEYDORN, A., HENTZER, M., EBERL, L., GEISENBERGER, O., CHRISTENSEN, B., MOLIN, S. & GIVSKOV, M. (2001). *gfp*-based N-acyl homoserine lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 575.
- ANIANSSON, E. A. G., WALL, S. N., ALMGREN, M., HOFFMANN, H., KIELMANN, I., ULBRICHT, W., ZANA, R., LANG, J. & TONDRE, C. (1976). Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactant. *J. Phys. Chem.-US* **80**: 905.

- ARAMENDIA, M. A., BORAU, V., GARCIA, I., JIMENEZ, C., LAFONT, F., MARINAS, J. M., PORRAS, A. & URBANO, F. J. (1995). Determination of isoflavones by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **S153**–S157.
- ASHCROFT, A. E., MAJOR, H. J., WILSON, I. D., NICHOLLS, A. & NICHOLSON, J. K. (1997). Application of capillary electrophoresis mass spectrometry to the analysis of urine samples from animals and man containing paracetamol and phenacetin and their metabolites. *Anal. Commun.* **34**: 41.
- ATKINSON, S., THROUP, J., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1999). A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol. Microbiol.* **33**: 1267.
- AURIOLA, S., THIBAUT, P., SADOVSKAYA, I. & ALTMAN, E. (1998). Enhancement of sample loadings for the analysis of oligosaccharides isolated from *Pseudomonas aeruginosa* using transient isotachopheresis and capillary zone electrophoresis-electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**: 2665.
- BACH, G. A. & HENION, J. (1998). Quantitative capillary electrophoresis-ion-trap mass spectrometry determination of methylphenidate in human urine. *J. Chromatogr. B* **707**: 275.
- BAINTON, N., BYCROFT, B., CHHABRA, S., STEAD, P., GLEDHILL, L., HILL, P., REES, C., WINSON, M., SALMOND, G. & STEWART, G. (1992a). A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* **116**: 87.
- BAINTON, N., STEAD, P., CHHABRA, S., BYCROFT, B., SALMOND, G., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1992b). *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* **288**: 997.
- BAKER, C. J., ATKINSON, M. M., ROY, M. A. & COLLMER, A. (1986). Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**: 217.
- BAKER, C. J., MOCK, N., ATKINSON, M. M. & HUTCHESON, S. W. (1990). Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digests of cell wall and of polygalacturonic acid. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**: 133.
- BALABAN, N., GOLDKORN, T., NHAN, R., DANG, L., SCOTT, S., RIDGLEY, R., RASOOLY, A., WRIGHT, S., LARRICK, J., RASOOLY, R. & CARLSON, J. (1998). Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science* **280**: 438.
- BANKS, J. F. (1996). High-sensitivity peptide mapping using packed-capillary liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **743**: 99.



- (1997). Recent advances in capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**: 2255.
- BANKS JR., J. F. (1995). Optimization of conditions for the analysis of a peptide mixture and a tryptic digest of cytochrome c by capillary electrophoresis-electrospray-ionization mass spectrometry with an improved liquid-sheath probe. *J. Chromatogr. A* **712**: 245.
- BARNIDGE, D. R., NILSSON, S., MARKIDES, K. E., RAPP, H. & HJORT, K. (1999). Metallized sheathless electrospray emitters for use in capillary electrophoresis orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 994.
- BARROSO, M. B. & DE JONG, A. P. (1998). A new design for large, dilute sample loading in capillary electrophoresis. *J. Capillary Electroph.* **5**: 1.
- BARRY, J. P., MUTH, J., LAW, S. J., KARGER, B. L. & VOUIROS, P. (1996). Analysis of modified oligonucleotides by capillary electrophoresis in a polyvinylpyrrolidone matrix coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **732**: 159.
- BASSLER, B. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 582.
- BATCHELOR, S., COOPER, M., CHHABRA, S., GLOVER, L., STEWART, G., WILLIAMS, P. & PROSSER, J. (1997). Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2281.
- BATEMAN, K. P. (1999). Electrochemical properties of capillary electrophoresis-nano-electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**: 309.
- BATEMAN, K. P., LOCKE, S. J. & VOLMER, D. A. (1997). Characterization of isomeric sulfonamides using capillary zone electrophoresis coupled with nano-electrospray quasi-MS/MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **32**: 297.
- BAUER, W. D. & MATHESIUS, U. (2004). Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 429.
- BAUER, W. D. & ROBINSON, J. B. (2002). Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 234.
- BEDNAR, P., LEMR, K., BARTAK, P., SEVCIK, J., HLAVAC, J., STYSKALA, J., WIEDERMANNNOVA, I. & STRANSKY, Z. (2002). Capillary electrophoresis/mass spectrometry: a promising tool for the control of some physiologically hazardous compounds. I - derivatives of 3-quinuclidinol. *J. Mass Spectrom.* **37**: 1213.
- BELDER, D. & STOCKIGT, D. (1996). Analysis of basic pharmaceuticals by capillary electrophoresis in coated capillaries and on-line mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **752**: 271.

- BENDAHL, L., HANSEN, S. H. & OLSEN, J. (2002). A new sheathless electrospray interface for coupling of capillary electrophoresis to ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 2333.
- BENSON, L. M., NAYLOR, S. & TOMLINSON, A. J. (1998). Investigation of Maillard reaction products using  $^{15}\text{N}$  isotope studies and analysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* **62**: 179.
- BENSON, L. M., TOMLINSON, A. J., MAYENO, A. N., GLEICH, G. J., WELLS, D. & NAYLOR, S. (1996). Membrane preconcentration capillary electrophoresis mass spectrometry (mPC-CE-MS) analysis of 3-phenylamino-1,2-propanediol (PAP) metabolites. *J. High Res. Chromatogr.* **19**: 291.
- VAN BERKEL, G. J. (1997). The electrolytic nature of electrospray. In: COLE, R. (Hg.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Kap. 2, 65–105. Wiley.
- BIANCO, G., SCHMITT-KOPPLIN, P., CRESCENZI, A., COMES, S., KETTRUP, A. & CATALDI, T. R. I. (2003). Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus  $\gamma$ -resistant potato plants (var. Desiree) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (nace-esi-ms). *Anal. Bioanal. Chem.* **375**: 799.
- BIANCO, G., SCHMITT-KOPPLIN, P., DE BENEDETTO, G., KETTRUP, A. & CATALDI, T. R. (2002). Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 2904.
- BINDILA, L., ALMEIDA, R., STERLING, A., ALLEN, M., PETER-KATALINIĆ, J. & ZAMFIR, A. (2004). Off-line capillary electrophoresis/fully automated nanoelectrospray chip quadrupole time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry for glycoconjugate analysis. *J. Mol. Struct.* **39**: 1190.
- BINGS, N. H., WANG, C., SKINNER, C. D., COLYER, C. L., THIBAUT, P. & HARRISON, D. J. (1999). Microfluidic devices connected to fused-silica capillaries with minimal dead volume. *Anal. Chem.* **71**: 3292.
- BJORNSDOTTIR, I., TJORNELUND, J. & HANSEN, S. H. (1998). Nonaqueous capillary electrophoresis - its applicability in the analysis of food, pharmaceuticals and biological fluids. *Electrophoresis* **19**: 2179.
- BLASCHKE, G. & CHANKVETADZE, B. (2000). Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques. *J. Chromatogr. A* **875**: 3.
- BECK V. BODMAN, S., BAUER, W. D. & COPLIN, D. L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 455.

- BECK V. BODMAN, S. & FARRAND, S. (1995). Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **177**: 5000.
- BOETTCHER, K. & RUBY, E. (1995). Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J. Bacteriol.* **177**: 1053.
- BONFICHI, R., SOTTANI, C., COLOMBO, L., COUTANT, J. E., RIVA, E. & ZANETTE, D. (1995). Preliminary investigation of glycosylated proteins by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis mass spectrometry using electrospray ionization and by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* S95–S106.
- BOOS, K. & GRIMM, C. (1999). High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. *TRAC-Trend. Anal. Chem.* **18**: 175.
- BOOS, K.-S. (2004). MS adequate processing of biofluids by means of on-line SPE-(LC). In: Proceedings of the 7th Sino-German Symposium on Chromatography, 9–11. Chongqing.
- BOSS, H. J., WATSON, D. B. & RUSH, R. S. (1998). Peptide capillary zone electrophoresis mass spectrometry of recombinant human erythropoietin: An evaluation of the analytical method. *Electrophoresis* **19**: 2654.
- BRAUN, R. M., BEYDER, A., XU, J. Y., WOOD, M. C., EWING, A. G. & WINOGRAD, N. (1999). Spatially resolved detection of attomole quantities of organic molecules localized in picoliter vials using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**: 3318.
- BRELLES-MARIÑO, G. & BEDMAR, E. (2001). Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *J. Biotechnol.* **91**: 197.
- BRITZ-MCKIBBIN, P. & TERABE, S. (2003). On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1000**: 917.
- VON BROCKE, A., NICHOLSON, G. & BAYER, E. (2001). Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 1251.
- BROWN, S. & JOHNSTONE, R. (2001). Cooperation in the dark: signalling and collective action in quorum-sensing bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **268**: 961.
- BRUINS, A. P. (1991). Mass-spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrom. Rev.* **10**: 53.

- BUZY, A., THIBAUT, P. & LAYCOCK, M. V. (1994). Development of a capillary electrophoresis method for the characterization of enzymatic products arising from the carbamoylase digestion of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Chromatogr. A* **688**: 301.
- CAHOURS, X., DESSANS, H., MORIN, P., DREUX, M. & AGROFOGLIO, L. (2000). Determination at ppb level of an anti-human immunodeficiency virus nucleoside drug by capillary electrophoresis-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **895**: 101.
- CAI, J. Y. & HENION, J. (1996). Elucidation of LSD in vitro metabolism by liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **20**: 27.
- CANCILLA, D. & QUE HEE, S. (1992). O-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl) methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds. *J. Chromatogr.* **627**: 1.
- CAO, J. & MEIGHEN, E. (1989). Purification and structural identification of an auto-inducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* **264**: 21670.
- CAO, J., WEI, Z. & MEIGHEN, E. (1995). The *lux* autoinducer-receptor interaction in *Vibrio harveyi*: binding parameters and structural requirements for the autoinducer. *Biochem. J.* **312**: 439.
- CAO, P. & MOINI, M. (1997). A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**: 561.
- (1998a). Analysis of peptides, proteins, protein digests, and whole human blood by capillary electrophoresis electro-spray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode sheathless interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**: 1081.
- (1998b). Capillary electrophoresis electro-spray ionization high mass accuracy time-of-flight mass spectrometry for protein identification using peptide mapping. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**: 864.
- (1998c). Pressure-assisted and pressure-programmed capillary electrophoresis/electrospray ionization time of flight - mass spectrometry for the analysis of peptide mixtures. *Electrophoresis* **19**: 2200.
- (1999). Separation and detection of the alpha- and beta-chains of hemoglobin of a single intact red blood cell using capillary electrophoresis/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**: 184.

- CAO, P. & STULTS, J. T. (2000). Mapping the phosphorylation sites of proteins casing on-line immobilized metal affinity chromatography/capillary electrophoresis/electrospray ionization multiple stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 1600.
- CAPPIELLO, A., FAMIGLINI, G. & BERLONI, A. (1997). Large volume injection of acidic pesticides by reversed-phase micro high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **768**: 215.
- CARBECK, J. D., SEVERS, J. C., GAO, J. M., WU, Q. Y., SMITH, R. D. & WHITESIDES, G. M. (1998). Correlation between the charge of proteins in solution and in the gas phase investigated by protein charge ladders, capillary electrophoresis, and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Phys. Chem. B* **102**: 10596.
- CARTER, S. J., LI, X. F., MACKEY, J. R., MODI, S., HANSON, J. & DOVICH, N. J. (2001). Biomonitoring of urinary tamoxifen and its metabolites from breast cancer patients using nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 2730.
- CASLAVSKA, J. & THORMANN, W. (2002). Rapid analysis of furosemide in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence and electrospray ionization-ion trap mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B* **770**: 207.
- CATALDI, T. R. I., BIANCO, G., FROMMBERGER, M. & SCHMITT-KOPPLIN, P. (2004). Direct analysis of selected *N*-acyl-L-homoserine lactones by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**: 1341.
- CHANG, S. Y. & YEUNG, E. S. (1997). Laser vaporization/ionization interface for capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 2251.
- CHANG, Y. Z., CHEN, Y. R. & HER, G. R. (2001). Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated tapered fused-silica capillary with a beveled edge. *Anal. Chem.* **73**: 5083.
- CHANG, Y. Z. & HER, G. R. (2000). Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated fused silica capillary. *Anal. Chem.* **72**: 626.
- CHARLTON, T., DE NYS, R., NETTING, A., KUMAR, N., HENTZER, M., GIVSKOV, M. & KJELLEBERG, S. (2000). A novel and sensitive method for the quantification of *N*-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ. Microbiol.* **2**: 530.
- CHARLWOOD, J., BIRRELL, H., GRIBBLE, A., BURDES, V., TOLSON, D. & CAMILLERI, P. (2000). A probe for the versatile analysis and characterization of n-linked oligosaccharides. *Anal. Chem.* **72**: 1453.

- CHE, F. Y., SONG, J. F., ZENG, R., WANG, K. Y. & XIA, Q. C. (1999). Analysis of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis-electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **858**: 229.
- CHEN, X., SCHAUDER, S., POTIER, N., DORSSELAER, A. V., PELCZER, I., BASSLER, B. L. & HUGHSON, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. **415**: 545.
- CHEN, Y. R. & HER, G. R. (2003). A simple method for fabrication of silver-coated sheathless electrospray emitters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**: 437.
- CHEN, Y. R., WEN, K. C. & HER, G. R. (2000). Analysis of coptisine, berberine and palmatine in adulterated chinese medicine by capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **866**: 273.
- CHENG, C. C. & CHU, Y. H. (1998). Affinity capillary electrophoresis mass spectrometry in combinatorial library screening. *Am. Lab.* **30**: 79.
- CHENG, H. L., TSENG, M. C., TSAI, P. L. & HER, G. R. (2001). Analysis of synthetic chemical drugs in adulterated chinese medicines by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**: 1473.
- CHERKAOUI, S., BEKKOUCHE, K., CHRISTEN, P. & VEUTHEY, J. L. (2001). Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts. *J. Chromatogr. A* **922**: 321.
- CHERKAOUI, S. & VEUTHEY, J. L. (2002). Use of negatively charged cyclodextrins for the simultaneous enantioseparation of selected anesthetic drugs by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**: 615.
- CHERNIN, L., WINSON, M., THOMPSON, J., HARAN, S., BYCROFT, B., CHET, I., WILLIAMS, P. & STEWART, G. (1998). Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **180**: 4435.
- CHERNUSHEVICH, I., LOBODA, A. & THOMSON, B. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**: 849.
- CHERVET, J., URSEM, M. & SALZMANN, J. (1996). Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. *Anal. Chem.* **68**: 1507.
- CHHABRA, S. R., HARTY, C., HOOI, D. S. W., DAYKIN, M., WILLIAMS, P., TELFORD, G., PRITCHARD, D. I. & BYCROFT, B. W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J. Med. Chem.* **46**: 97.

- CHIN-A-WOENG, T., VAN DEN BROEK, D., DE VOER, G., VAN DER DRIFT, K., TUINMAN, S., THOMAS-OATES, J., LUGTENBERG, B. & BLOEMBERG, G. (2001). Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 969.
- CHONG, B. E., KIM, J., LUBMAN, D. M., TIEDJE, J. M. & KATHARIOU, S. (2000). Use of non-porous reversed-phase high-performance liquid chromatography for protein profiling and isolation of proteins induced by temperature variations for siberian permafrost bacteria with identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **748**: 167.
- CHOUHDARY, G., APFFEL, A., YIN, H. F. & HANCOCK, W. (2000). Use of on-line mass spectrometric detection in capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **887**: 85.
- CHU, Y. H., DUNAYEVSKIY, Y. M., KIRBY, D. P., VOUIROS, P. & KARGER, B. L. (1996). Affinity capillary electrophoresis mass spectrometry for screening combinatorial libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 7827.
- CHUN, C. K., OZER, E. A., WELSH, M. J., ZABNER, J. & GREENBERG, E. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3587.
- COLE, R. B., VARGHESE, J., MCCORMICK, R. M. & KADLECEK, D. (1994). Evaluation of a novel hydrophilic derivatized capillary for protein analysis by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **680**: 363.
- COLÓN, L. A., MALONEY, T. D. & FERMIER, A. M. (2000). Packing columns for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **887**: 43.
- CONSTANTOPOULOS, T., JACKSON, G. & ENKE, C. (2000). Challenges in achieving a fundamental model for ESI. *Anal. Chim. Acta* **406**: 37.
- CONWAY, B.-A. & GREENBERG, E. (2002). Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J. Bacteriol.* **184**: 1187.
- COOPER, J. W., CHEN, J. Z., LI, Y. & LEE, C. S. (2003). Membrane-based nanoscale proteolytic reactor enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**: 1067.
- CRONAN, J. E. & ROCK, C. O. (1996). Biosynthesis of membrane lipids. In: NEIDHARDT, F. C., CURTISS III, R., INGRAHAM, J. L., LIN, E. C. C., LOW, K. B., MARGASANI, B., REZNIKOFF, W. S., RILEY, M., SCHAECHTER, M. & UMBARGER, H. E. (Hg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 612–636. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

- DENG, Y. Z., HENION, J., LI, J. J., THIBAUT, P., WANG, C. & HARRISON, D. J. (2001). Chip-based capillary electrophoresis/mass spectrometry determination of carnitines in human urine. *Anal. Chem.* **73**: 639.
- DETERDING, L. J., TOMER, K. B., WELLEMANS, J. M. Y., CERNY, R. L. & GROSS, M. L. (1999). Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry with array detection. *Europ. Mass Spectrom.* **5**: 33.
- DEVAULT, G. L. & SEPANIAC, M. J. (2000). Electrofilament deposition and off-column detection of analytes separated by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**: 1320.
- DI MANGO, E., ZAR, H., BRYAN, R. & PRINCE, A. (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J. Clin. Invest.* **96**: 2204.
- DILL, K. A. & FLORY, P. J. (1981). Molecular organization of micelles and vesicles. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 676.
- DING, J. & VOUROIS, P. (2000). Capillary electrochromatography-mass spectrometry for the separation and identification of isomeric polyaromatic hydrocarbon dna adducts derived from in vitro reactions. *J. Chromatogr. A* **887**: 103.
- DOLE, M., MACK, L. L. & HINES, R. L. (1968). Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **49**: 2240.
- DONABEDIAN, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J. Infect* **46**: 207.
- DONG, Y., WANG, L., XU, J., ZHANG, H., ZHANG, X. & ZHANG, L. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*. **411**: 813.
- DONG, Y.-H., GUSTI, A. R., ZHANG, Q., XU, J.-L. & ZHANG, L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1754.
- DONG, Y.-H., ZHANG, X.-F., XU, J.-L. & ZHANG, L.-H. (2004). Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 954.
- DUNAYEVSKIY, Y. M., LYUBARSKAYA, Y. V., CHU, Y. H., VOUROIS, P. & KARGER, B. L. (1998). Simultaneous measurement of nineteen binding constants of peptides to vancomycin using affinity capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Med. Chem.* **41**: 1201.



- DUNAYEVSKIY, Y. M., VOUIROS, P., WINTNER, E. A., SHIPPS, G. W., CARELL, T. & REBEK, J. (1996). Application of capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry in the determination of molecular diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6152.
- DUTEIL, S., GAREIL, P., GIRAULT, S., MALLET, A., FEVE, C. & SIRET, L. (1999). Identification of heparin oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis/ionspray-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 1889.
- EBERHARD, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**: 1101.
- EBERHARD, A., BURLINGAME, A., EBERHARD, C., KENYON, G., NEALSON, K. & OPPENHEIMER, N. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444.
- EBERL, L. (1999). N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 493.
- EBERL, L., WINSON, M., STERNBERG, C., STEWART, G., CHRISTIANSEN, G., CHHABRA, S., BYCROFT, B., WILLIAMS, P., MOLIN, S. & GIVSKOV, M. (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**: 127.
- EDMONDS, C. G., LOO, J. A., BARINAGA, C. J., UDSETH, H. R. & SMITH, R. D. (1989). Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **474**: 21.
- EGLAND, K. & GREENBERG, E. (1999). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol. Microbiol.* **31**: 1197.
- ELASRI, M., DELORME, S., LEMANCEAU, P., STEWART, G., LAUE, B., GLICKMANN, E., OGER, P. & DESSAUX, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1198.
- ELGSTOEN, K. B. P., ZHAO, J. Y., ANACLETO, J. F. & JELLUM, E. (2001). Potential of capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as diagnostic tools. *J. Chromatogr. A* **914**: 265.
- ENGBRECHT, J., NEALSON, K. & SILVERMAN, M. (1983). Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**: 773.

- ENSING, K., DE BOER, T., SCHREUDER, N. & DE ZEEUW, R. A. (1999). Separation and identification of neuropeptide  $\gamma$ , two of its fragments and their degradation products using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **727**: 53.
- FELICI, N. (1959). Recent developments and future trends in electrostatic generation. *Direct Current* **4**: 3.
- FENN, J., MANN, M., MENG, C., WONG, S. & WHITEHOUSE, C. (1989). Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64.
- FENN, J. B. (2003). Elektrospray: Molekulare Elefanten lernen das Fliegen (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem. Int. Edit.* **115**: 3999.
- FERNANDEZ, F. M., VADILLO, J. M., KIMMEL, J. R., WETTERHALL, M., MARKIDES, K., RODRIGUEZ, N. & ZARE, R. N. (2002). Hadamard transform time-of-flight mass spectrometry: A high-speed detector for capillary-format separations. *Anal. Chem.* **74**: 1611.
- FIDOPIASTIS, P., SØRUM, H. & RUBY, E. (1999). Cryptic luminescence in the cold-water fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Arch. Microbiol.* **171**: 205.
- FIGEYS, D. & AEBERSOLD, R. (1999). Microfabricated modules for sample handling, sample concentration and flow mixing: Application to protein analysis by tandem mass spectrometry. *J. Biomech. Eng.* **121**: 7.
- FIGEYS, D., DUCRET, A. & AEBERSOLD, R. (1997). Identification of proteins by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry - evaluation of an on-line solid-phase extraction device. *J. Chromatogr. A* **763**: 295.
- FIGEYS, D., GYGI, S. P., ZHANG, Y., WATTS, J., GU, M. & AEBERSOLD, R. (1998a). Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: Powerful tools for the analysis of proteins and proteomes. *Electrophoresis* **19**: 1811.
- FIGEYS, D., ZHANG, Y. & AEBERSOLD, R. (1998b). Optimization of solid phase microextraction capillary zone electrophoresis mass spectrometry for high sensitivity protein identification. *Electrophoresis* **19**: 2338.
- FISCHER, C.-H. & KENNDLER, E. (1997). Analysis of colloids ix. investigation of the electrical double layer of colloidal inorganic nanometer-particles by size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* **773**: 179.
- FLAVIER, A., GANOVA-RAEVA, L., SCHELL, M. & DENNY, T. (1997). Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* **179**: 7089.

- FLODGAARD, L. R., CHRISTENSEN, A. B., MOLIN, S., GIVSKOV, M. & GRAM, L. (2003). Influence of food preservation parameters and associated microbiota on production rate, profile and stability of acylated homoserine lactones from food-derived Enterobacteriaceae. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 145.
- FORET, F., KIRBY, D. P., VOUIROS, P. & KARGER, B. L. (1996). Electrospray interface for capillary electrophoresis mass spectrometry with fiber-optic UV detection close to the electrospray tip. *Electrophoresis* **17**: 1829.
- FORET, F. & PREISLER, J. (2002a). Liquid phase interfacing and miniaturization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* **2**: 360.
- (2002b). Liquid phase interfacing and miniaturization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* **2**: 360.
- FORET, F., ZHOU, H. H., GANGL, E. & KARGER, B. L. (2000). Subatmospheric electrospray interface for coupling of microcolumn separations with mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 1363.
- FRINDI, M., MICHELS, B. & ZANA, R. (1994). Ultrasonic absorption studies of surfactant exchange between micelles and the bulk phase in aqueous solutions of amphoteric surfactants. *J. Phys. Chem.-US* **98**: 6607.
- FROMHERZ, P. (1981). Micelle structure: A surfactant block model. *Chem. Phys. Lett.* **77**: 460.
- FROMMBERGER, M., HERTKORN, N., ENGLMANN, M., JAKOBY, S., HARTMANN, A., KETTRUP, A. & SCHMITT-KOPPLIN, P. (2005). Analysis of *N*-acylhomoserine lactones after alkaline hydrolysis and anion exchange solid phase extraction by capillary zone electrophoresis/mass spectrometry. *Electrophoresis* **im Druck**.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., MENZINGER, F., ALBRECHT, V., SCHMID, M., EBERL, L., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2003). Analysis of *N*-acyl-L-homoserine lactones produced by *Burkholderia cepacia* with partial filling micellar electrokinetic chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **24**: 3067.
- FROMMBERGER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., PING, G., FRISCH, H., SCHMID, M., ZHANG, Y., HARTMANN, A. & KETTRUP, A. (2004). A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration–nano-liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of *N*-acylhomoserine lactones. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 1014.
- FUQUA, C. & GREENBERG, E. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 183.

- FUQUA, C., WINANS, S. & GREENBERG, E. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 727.
- GALE, D. C. & SMITH, R. D. (1993). Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**: 1017.
- GAMBELLO, M. & IGLEWSKI, B. (1991). Cloning and characterisation of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* **173**: 3000.
- GARCIA, F. & HENION, J. D. (1992). Gel-filled capillary electrophoresis/mass spectrometry using a liquid-junction-ion spray interface. *Anal. Chem.* **64**: 985.
- GAUS, H. J., GOGUS, Z. Z., SCHMEER, K., BEHNKE, B., KOVAR, K. A. & BAYER, E. (1996). Separation and identification of designer drugs with capillary electrophoresis and on-line connection with ionspray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **735**: 221.
- GEISER, L., CHERKAOU, S. & VEUTHEY, J. L. (2000). Simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **895**: 111.
- (2002). Potential of formamide and n-methylformamide in nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry - application to the analysis of beta-blockers. *J. Chromatogr. A* **979**: 389.
- GELPI, E. (2002). Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. an update on recent developments. *J. Mass Spectrom.* **37**: 241.
- GENNARO, L. A., DELANEY, J., VOUIROS, P., HARVEY, D. J. & DOMON, B. (2002). Capillary electrophoresis/electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 192.
- GIVSKOV, M., DE NYS, R., MANEFIELD, M., GRAM, L., MAXIMILIEN, R., EBERL, L., MOLIN, S., STEINBERG, P. & KJELLEBERG, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.* **178**: 6618.
- GOHLKE, R. & MCLAFFERTY, F. (1993). Early gas chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**: 367.
- GOMEZ, A. & TANG, K. (1994). Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Phys. Fluids* **6**: 404.
- GONZÁLEZ, J. E. & MARKETON, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 574.

- GOTTSCHLICH, A., HUBER, B., GEISENBERGER, O., TÖGL, A., STEIDLE, A., RIEDEL, K., HILL, P., TÜMMLER, B., VANDAMME, P., MIDDLETON, B., CAMARA, M., WILLIAMS, P., HARDMAN, A. & EBERL, L. (2001). Synthesis of multiple *N*-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 1.
- GRAM, L., GROSSART, H.-P., SCHLINGLOFF, A. & KIØRBOE, T. (2002a). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter strains* isolated from marine snow. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4111.
- GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B. & GIVSKOV, M. (2002b). Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 79.
- GRARD, S., MORIN, P., DREUX, M. & RIBET, J. P. (2001). Efficient applications of capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry to the analysis of adrenoceptor antagonist enantiomers using a partial filling technique. *J. Chromatogr. A* **926**: 3.
- GREENBERG, E. (1997). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News* **63**: 371.
- GRUENHEID, S. & FINLAY, B. (2000). Crowd control: quorum sensing in pathogenic *E. coli*. *Trends Microbiol.* **8**: 442.
- GUO, J. H., WU, J. Y., SIUZDAK, G. & FINN, M. G. (1999). Measurement of enantiomeric excess by kinetic resolution and mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **38**: 1755.
- GUSEV, A. I. (2000). Interfacing matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with column and planar separations. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**: 691.
- GUZMAN, N. A. & STUBBS, R. J. (2001). The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: A powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications. *Electrophoresis* **22**: 3602.
- GÖTTLEIN, A., LINDENMAIR, J. & KUHN, A. (2001). Experimental approaches for studying rhizosphere chemistry and nutrient uptake of tree roots by in-situ methods. In: HORST, W., SCHENK, M., BÜRKERT, A., CLAASSEN, N. & FLESSA, H. (Hg.), Plant nutrition - food security and sustainability of agro-ecosystems, 536–537. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- HAI, B. (2002). Analyse von Signalstoffen (*N*-Acyl-Homoserinlactone, AHL) von Rhizosphärenbakterien und deren *in-situ*-Produktion in der Rhizosphäre. Diplomarbeit, Technische Universität München.

- HANZELKA, B. & GREENBERG, E. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 5291.
- HARDMAN, A., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 199.
- HARSCH, A. & VOUIROS, P. (1998). Interfacing of ce in a pvp matrix to ion trap mass spectrometry: Analysis of isomeric and structurally related (N-acetyl-amino)fluorene-modified oligonucleotides. *Anal. Chem.* **70**: 3021.
- HASTINGS, J. W. (2004). Bacterial quorum-sensing signals are inactivated by mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3993.
- HAU, J. & ROBERTS, M. (1999). Advantages of pressurization in capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**: 3977.
- HAWLEY, G. G. (Hg.) (1981). The condensed chemical dictionary. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 10. Aufl.
- HE, T., QUINN, D., FU, E. & WANG, Y. K. (1999). Analysis of diagnostic metabolites by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **727**: 43.
- HEEREN, M. R. A., KLEINNIJENHUIS, A. J., A., M. L. & MIZE, L. H. (2004). A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *VA-ABAC* **378**: 1048.
- HEINIG, K. & HENION, J. (1999). Determination of carnitine and acylcarnitines in biological samples by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **735**: 171.
- HEITMEIER, S. & BLASCHKE, G. (1999). Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **721**: 109.
- HENTZER, M. & GIVSKOV, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* **112**: 1300.
- HENTZER, M., RIEDEL, K., RASMUSSEN, T. B., HEYDORN, A., ANDERSEN, J. B., PARSEK, M. R., RICE, S. A., EBERL, L., MOLIN, S., HØIBY, N., KJELLEBERG, S. & GIVSKOV, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**: 87.
- HIRABAYASHI, Y., HIRABAYASHI, A. & KOIZUMI, H. (1999). A sonic spray interface for capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 712.

- HOANG, T. T., SULLIVAN, S. A., CUSICK, J. K. & SCHWEIZER, H. P. (2002). Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology* **148**: 3849.
- HOFFMANN, H., NAGEL, R., PLATZ, G. & ULBRICHT, W. J. (1976). Zur Kinetik der Mizellbildung von alkyipyridiniumhalogeniden. *Colloid Polym. Sci.* **254**: 812.
- HOFSTADLER, S. A., SEVERS, J. C., SMITH, R. D., SWANEK, F. D. & EWING, A. G. (1996a). Analysis of single cells with capillary electrophoresis electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 919.
- (1996b). Analysis of single cells with capillary electrophoresis electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **10**: 919.
- (1996c). High performance fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric detection for capillary electrophoresis. *J. High Res. Chromatogr.* **19**: 617.
- HOFSTADLER, S. A., WAHL, J., BRUCE, J. & R.D., S. (1993). On-line capillary electrophoresis with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 6983.
- HOFSTADLER, S. A., WAHL, J. H., BAKHTIAR, R., ANDERSON, G. A., BRUCE, J. E. & SMITH, R. D. (1994). Capillary electrophoresis fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with sustained off-resonance irradiation for the characterization of protein and peptide mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**: 894.
- HOITINK, M. A., HOP, E., BEIJNEN, J. H., BULT, A., KETTENES VAN DEN BOSCH, J. J. & UNDERBERG, W. J. M. (1997). Capillary zone electrophoresis mass spectrometry as a tool in the stability research of the luteinising hormone-releasing hormone analogue goserelin. *J. Chromatogr. A* **776**: 319.
- HOPFGARTNER, G., BEAN, K., HENION, J. & HENRY, R. (1993a). Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: A concentration- or a mass-flow-sensitive device? *J. Chromatogr. A* **647**: 51.
- HOPFGARTNER, G., WACHS, T., BEAN, K. & HENION, J. (1993b). High-flow ion spray liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **65**: 439.
- HOPFGARTNER, G., ZELL, M., HUSSER, C., MASCHKA-SELIG, A. & LAUSECKER, B. (1999). The application of liquid chromatography and capillary zone electrophoresis combined with atmospheric pressure ionisation mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical compounds in biological fluids. *Chimia* **53**: 469.

- HORNG, Y.-T., DENG, S.-C., DAYKIN, M., SOO, P.-C., WEI, J.-R., LUH, K.-T., HO, S.-W., SWIFT, S., LAI, H.-C. & WILLIAMS, P. (2002). The LuxR family protein in SpnR functions as a negative regulator of *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1655.
- HSIEH, F. Y. L., CAI, J. & HENION, J. (1994). Determination of trace impurities of peptides and alkaloids by capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **679**: 206.
- HSIEH, Y.-L., CAI, J., LI, Y.-T., HENION, J. D. & GANEM, B. (1995). Detection of noncovalent FKBP-FK506 and FKBP-rapamycin complexes by capillary electrophoresis-mass spectrometry and capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**: 85.
- HU, S. & DOVICH, N. J. (2002). Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers. *Anal. Chem.* **74**: 2833.
- HUANG, J. J., HAN, J.-I., ZHANG, L.-H. & LEADBETTER, J. R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5941.
- HUBER, C. G. & PREMSTALLER, A. (1999). Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of proteins - i. liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **849**: 161.
- HUCK, C. W., STECHER, G., AHRER, W., STOGGL, W. M., BUCHBERGER, W. & BONN, G. K. (2002). Analysis of three flavonoids by CE-UV and CE-ESI-MS. determination of naringenin from a phytomedicine. *J. Sep. Sci.* **25**: 904.
- HUGHEY, C. A., RODGERS, R. P. & MARSHALL, A. G. (2002). Resolution of 11 000 compositionally distinct components in a single electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrum of crude oil. *Anal. Chem.* **74**.
- HUIKKO, K. & KOSTIAINEN, R. (2000). Analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **872**: 289.
- HUIKKO, K., KOTIAHO, T. & KOSTIAINEN, R. (2002a). Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **16**: 1562.
- (2002b). Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 1562.
- HUTTON, T. & MAJOR, H. J. (1995). Characterizing biomolecules by electrospray ionization mass spectrometry coupled to liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 924.



- HWANG, I., LI, P., ZHANG, L., PIPER, K., COOK, D., TATE, M. & FARRAND, S. (1994). TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 4639.
- IKONOMOU, M., BLADES, A. & KEBARLE, P. (1991). Electrospray-ion spray: A comparison of mechanisms and performance. *Anal. Chem.* **63**: 1989.
- INFELTA, P. P. & GRÄTZEL, M. (1979). Statistics of solubilize distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model. *J. Chem. Phys.* **70**: 179.
- INGENDO, A., KIEHNE, A. & GREINER, M. (1999). CE-MS-MS of peptides using a novel orthogonal CE ESI sprayer and ion trap MS. *Chromatographia* **49**: S87.
- ISHIHAMA, Y., KATAYAMA, H., ASAKAWA, N. & ODA, Y. (2002a). Highly robust stainless steel tips as micro electro spray emitters. *Rapid Commun. Mass Sp.* **16**: 913.
- (2002b). Highly robust stainless steel tips as micro electro spray emitters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 913.
- ISRAELACHVILI, J. (1992). Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, London.
- ISSAQ, H. J. (2002). Thirty-five years of capillary electrophoresis: Advances and perspectives. *J. Liquid Chromatogr.* **25**: 1153.
- ISSAQ, H. J., CHAN, K. C., JANINI, G. M. & MUSCHIK, G. M. (1999). A simple two-dimensional high performance liquid chromatography high performance capillary electrophoresis set-up for the separation of complex mixtures. *Electrophoresis* **20**: 1533.
- JAMES, A. D., ROBINSON, B. H. & WHITE, N. C. (1977). Dynamics of small molecule-micelle interactions: charge and pH effects. *J. Coll. Interf. Sci.* **59**: 328.
- JAUREGUI, O., MOYANO, E. & GALCERAN, M. T. (2000). Capillary electrophoresis-electrospray ion-trap mass spectrometry for the separation of chlorophenols. *J. Chromatogr. A* **896**: 125.
- JAVERFALK, E. M., AMINI, A., WESTERLUND, D. & ANDREN, P. E. (1998). Chiral separation of local anaesthetics by a capillary electrophoresis/partial filling technique coupled on-line to micro-electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**: 183.
- JAVERFALK-HOYES, E. M., BONDESSON, U., WESTERLUND, D. & ANDREN, P. E. (1999). Simultaneous analysis of endogenous neurotransmitters and neuropeptides in brain tissue using capillary electrophoresis - microelectrospray-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **20**: 1527.

- JIANG, Y., CAMARA, M., CHHABRA, S., HARDIE, K., BYCROFT, B., LAZDUNSKI, A., SALMOND, G., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1998). In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-butanoyl-L-homoserine lactone. *Mol. Microbiol.* **28**: 193.
- JIN, X. Y., CHEN, Y. J., LUBMAN, D. M., MISEK, D. & HANASH, S. M. (1999). Capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry for analysis of proteins from two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 2327.
- JOHANSSON, I. M., HUANG, E. C., HENION, J. D. & ZWEIGENBAUM, J. (1991). Capillary electrophoresis-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the characterization of peptides: Instrumental considerations for mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **554**: 311.
- JOHNSON, K. L., TOMLINSON, A. J. & NAYLOR, S. (1996). Capillary conditioning and electrospray ionization configuration for optimal capillary electrophoresis mass spectrometry performance. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 1159.
- JOHNSON, S. K., HOUK, L. L., JOHNSON, D. C. & HOUK, R. S. (1999). Determination of small carboxylic acids by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **389**: 1.
- JOHNSON, T., BERGQUIST, J., EKMAN, R., NORDHOFF, E., SCHURENBERG, M., KLOPPPEL, K. D., MULLER, M., LEHRACH, H. & GOBOM, J. (2001). A ce-maldi interface based on the use of prestructured sample supports. *Anal. Chem.* **73**: 1670.
- JONES, S., YU, B., BAINTON, N., BIRDSALL, M., BYCROFT, B., CHHABRA, S., COX, A., GOLBY, P., REEVES, P. & STEPHENS, S. (1993). The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* **12**: 2477.
- JUSSILA, M., SINERVO, K., PORRAS, S. P. & RIEKKOLA, M. L. (2000). Modified liquid junction interface for nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 3311.
- KAMEOKA, J., CRAIGHEAD, H. G., ZHANG, H. W. & HENION, J. (2001). A polymeric microfluidic chip for ce/ms determination of small molecules. *Anal. Chem.* **73**: 1935.
- KAPLAN, H. & GREENBERG, E. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**: 1210.
- KARLSON, P. & LÜSCHER, M. (1959). Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 55.
- KATO, S., HARADA, S. & SAHARA, H. (1995). Ultrasonic relaxation and volumetric studies of the micelle/monomer exchange process in aqueous solutions of the nonionic surfactants C<sub>7</sub>E<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> and C<sub>8</sub>E<sub>5</sub>. *J. Phys. Chem.-US* **99**: 12570.

- KEBARLE, P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 804.
- KEBARLE, P. & TANG, L. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.* **65**: 972A.
- KELLY, J., MASOUD, H., PERRY, M. B., RICHARDS, J. C. & THIBAUT, P. (1996). Separation and characterization of o-deacylated lipooligosaccharides and glycans derived from moraxella catarrhalis using capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **233**: 15.
- KEMPNER, E. & HANSON, F. (1968). Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **95**: 975.
- KEOUGH, T., TAIGIKU, R., LACEY, M. P. & PURDON, M. (1992). Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of proteins isolated by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* **64**: 1594.
- KESKI-HYNNILA, H., RAANAA, K., TASKINEN, J. & KOSTIAINEN, R. (2000). Direct analysis of nitrocatechol-type glucuronides in urine by capillary electrophoresis-electro spray ionisation mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **749**: 253.
- KHANDURINA, J. & GUTTMAN, A. (2002). Micromachined capillary cross-connector for high-precision fraction collection. *J. Chromatogr. A* **979**: 105.
- DE KIEVIT, T. & IGLEWSKI, B. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**: 4839.
- KIRBY, D., THORME, J., GÖTZINGER, W. & KARGER, B. (1996). A CE/ESI-MS interface for stable, low-flow operation. *Anal. Chem.* **68**: 4451.
- KJELLEBERG, S. & MOLIN, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 254.
- KLAMPFL, C. W. & BUCHBERGER, W. (2001). Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **22**: 2737.
- KLEEREBEZEM, M. & QUADRI, L. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**: 1579.
- KNUDSEN, C. B., BJORNSDOTTIR, I., JONS, O. & HANSEN, S. H. (1998). Detection of metallothionein isoforms from three different species using on-line capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **265**: 167.

- KORNAHRENS, H., COOK, K. D. & ARMSTRONG, D. W. (1982). The mechanism of enhancement of analyte sensitivity by surfactants in flame atomic spectrometry. *Anal. Chem.* **54**: 1325.
- KOSTIAINEN, R., BRUINS, A. P. & HAKKINEN, V. M. A. (1993). Identification of degradation products of some chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **634**: 113.
- KRUKONIS, E. S. & DIRITA, V. J. (2003). From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 186.
- KUJAWINSKI, E., HATCHER, P. & FREITAS, M. (2002). High-resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids: improvements and comparisons. *Anal. Chem.* **74**: 413.
- KUNG, A., GALANSKI, M., BAUMGARTNER, C. & KEPPLER, B. K. (2002). Reaction of (SP-4-2)-dichlorobis(2-hydroxyethylamine)platinum(II) with 5'-GMP under simulated physiological conditions, a CZE-ESI-MS study. *Inorg. Chim. Acta* **339**: 9.
- KUO, A., BLOUGH, N. & DUNLAP, P. (1994). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **176**: 7558.
- LABOWSKY, M., FENN, J. & MORA DE LA, J. (2000). A continuum model for ion evaporation from a drop: effect of curvature and charge on ion solvation energy. *Anal. Chim. Acta* **406**: 105.
- LAFONT, F., ARAMENDIA, M. A., GARCIA, I., BORAU, V., JIMENEZ, C., MARINAS, J. M. & URBANO, F. J. (1999). Analyses of phenolic compounds by capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**: 562.
- LAI, C. C. & HER, G. R. (2000). Analysis of phospholipase A(2) glycosylation patterns from venom of individual bees by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 2012.
- LANE, S. J., BOUGHTFLOWER, R., PATERSON, C. & MORRIS, M. (1996). Evaluation of a new capillary electrochromatography mass spectrometry interface using short columns and high field strengths for rapid and efficient analyses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 733.
- LAO, W., KJELLEBERG, S., KUMAR, N., DENYS, R., READ, R. W. & STEINBERG, P. (1999). <sup>13</sup>C NMR study of *N*-acyl-S-homoserine lactone derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **37**: 157.

- LARSSON, M. & LUTZ, E. S. M. (2000). Transient isotachopheresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide analysis. *Electrophoresis* **21**: 2859.
- LARSSON, M., SUNDBERG, R. & FOLESTAD, S. (2001). On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid. *J. Chromatogr. A* **934**: 75.
- LATIFI, A., WINSON, M., FOGILINO, M., BYCROFT, B., STEWART, G., LAZDUNSKI, A. & WILLIAMS, P. (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **17**: 333.
- LAUE, B., JIANG, Y., CHHABRA, S., JACOB, S., STEWART, G., HARDMAN, A., DOWNIE, J., O'GARA, F. & WILLIAMS, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**: 2469.
- LAURELL, T. & MARKO-VARGA, G. (2002). Miniaturisation is mandatory unravelling the human proteome. *Proteomics* **2**: 345.
- LAUSECKER, B., HOPFGARTNER, G. & HESSE, M. (1998). Capillary electrophoresis mass spectrometry coupling versus micro-high-performance liquid chromatography mass spectrometry coupling: a case study. *J. Chromatogr. B* **718**: 1.
- LAW, J. & REGNIER, F. (1971). Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* **40**: 533.
- LAWRENCE, R., DUNN, W., BYCROFT, B., CAMARA, M., CHHABRA, S., WILLIAMS, P. & WILSON, V. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule, *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 845.
- LAZAR, I. M., LEE, E. D., ROCKWOOD, A. L. & LEE, M. L. (1997a). Evaluation of an electrospray interface for capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **791**: 269.
- (1998). General considerations for optimizing a capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry system. *J. Chromatogr. A* **829**: 279.
- LAZAR, I. M. & LEE, M. L. (1999a). Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry of paraquat and diquat herbicides. *J. Microcol. Sep.* **11**: 117.
- (1999b). Effect of electrospray needle voltage on electroosmotic flow in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**: 261.

- LAZAR, I. M., RAMSEY, R. S., JACOBSON, S. C., FOOTE, R. S. & RAMSEY, J. M. (2000). Novel microfabricated device for electrokinetically induced pressure flow and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **892**: 195.
- LAZAR, I. M., XIN, B. M., LEE, M. L., LEE, E. D., ROCKWOOD, A. L., FABBI, J. C. & LEE, H. G. (1997b). Design of a time-of-flight mass spectrometer as a detector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **69**: 3205.
- LAZDUNSKI, A. M., VENTRE, I. & STURGIS, J. N. (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 581.
- LEWENZA, S., CONWAY, B., GREENBERG, E. & SOKOL, P. (1999). Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J. Bacteriol.* **181**: 748.
- LEWIS, H., FURLONG, E., LAUBERT, B., EROSHKINA, G., BATIYENKO, Y., ADAMS, J., BERGSEID, M., MARSH, C., PEAT, T., SANDERSON, W., SAUDER, J. & BUCHANAN, S. (2001). A structural genomics approach to the study of quorum sensing: crystal structures of three LuxS orthologs. *Structure (Camb.)* **9**: 527.
- LEWIS, K. C., JORGENSON, J. W. & KAUFMAN, S. L. (1996). Capillary zone electrophoresis with electrospray condensation particle counting detection. *J. Capillary Electroph.* **3**: 229.
- LI, D. T., SHEEN, J. F. & HER, G. R. (2000). Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry using ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**: 292.
- LI, J., THIBAUT, P., MARTIN, A., RICHARDS, J. C., WAKARCHUK, W. W. & VAN DER WILP, W. (1998). Development of an on-line preconcentration method for the analysis of pathogenic lipopolysaccharides using capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry – application to small colony isolates. *J. Chromatogr. A* **817**: 325.
- LI, J. J., THIBAUT, P., BINGS, N. H., SKINNER, C. D., WANG, C., COLYER, C. & HARRISON, J. (1999). Integration of microfabricated devices to capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry using a low dead volume connection: Application to rapid analyses of proteolytic digests. *Anal. Chem.* **71**: 3036.
- LI, J. J., TREMBLAY, T. L., WANG, C., ATTIYA, S., HARRISON, D. J. & THIBAUT, P. (2001). Integrated system for high-throughput protein identification using a microfabricated device coupled to capillary electrophoresis/nanoelectrospray mass spectrometry. *Proteomics* **1**: 975.
- LIN, Y.-H., XU, J.-L., HU, J., WANG, L.-H., ONG, S. L., LEADBETTER, J. R. & ZHANG, L.-H. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* **47**: 849.

- LITHGOW, J., WILKINSON, A., HARDMAN, A., RODELAS, B., WISNIEWSKI-DYÉ, F., WILLIAMS, P. & DOWNIE, J. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* **37**: 81.
- LIU, C. S., LI, X. F., PINTO, D., HANSEN, E. B., CERNIGLIA, C. E. & DOVICH, N. J. (1998). On-line nonaqueous capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry of tricyclic antidepressants and metabolic profiling of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*. *Electrophoresis* **19**: 3183.
- LIU, H. B., LIN, D. Y. & YATES, J. R. (2002). Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. *Biotechniques* **32**: 898.
- LOH, J., PIERSON, E. A., PIERSON, L. S., STACEY, G. & CHATTERJEE, A. (2002). Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 285.
- LOOS, R., RIU, J., ALONSO, M. C. & BARCELO, D. (2000). Analysis of polar hydrophilic aromatic sulfonates in waste water treatment plants by CE/MS and LC/MS. *J. Mass Spectrom.* **35**: 1197.
- LU, W. Z. & COLE, R. B. (1998). Determination of chiral pharmaceutical compounds, terbutaline, ketamine and propranolol, by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **714**: 69.
- LU, W. Z., POON, G. K., CARMICHAEL, P. L. & COLE, R. B. (1996). Analysis of tamoxifen and its metabolites by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry employing nonaqueous media containing surfactants. *Anal. Chem.* **68**: 668.
- LUGTENBERG, B. J. J., CHIN-A-WOENG, T. F. C. & BLOEMBERG, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 373.
- LUO, Z.-Q., SMYTH, A. J., GAO, P., QIN, Y. & FARRAND, S. K. (2003). Mutational analysis of TraR. Correlating function with molecular structure of a quorum-sensing transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* **278**: 13173.
- LYUBARSKAYA, Y. V., DUNAYEVSKIY, Y. M., VOUIROS, P. & KARGER, B. L. (1997). Microscale epitope mapping by affinity capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 3008.
- MAJOR, H. J. & ASHCROFT, A. E. (1996). Analysis of a standard peptide mixture by capillary electrophoresis with mass spectrometry and with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 1421.
- MANEFIELD, M., HARRIS, L., RICE, S., DE NYS, R. & KJELLEBERG, S. (2000). Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2079.

- MANEFIELD, M., DE NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINBERG, P. & KJELLEBERG, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145**: 283.
- MANEFIELD, M., WELCH, M., GIVSKOV, M., SALMOND, G. & KJELLEBERG, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carba-penam antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phyto-pathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**: 131.
- MARCH, R. (1997). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**: 351.
- MARKETON, M. M., GRONQUIST, M. R., EBERHARD, A. & GONZÁLEZ, J. E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* **184**: 5686.
- MARSHALL, A. (2000). Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**: 331.
- MARTIN, S., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. & MARTO, J. (2000). Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**: 4266.
- MARTIN-GIRARDEAU, A. & RENOU-GONNORD, M. F. (2000). Optimization of a capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry method for the quantitation of the 20 natural amino acids in childrens blood. *J. Chromatogr. B* **742**: 163.
- MATYSIK, F. M. (2002). Special aspects of detection methodology in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**: 400.
- MCCLEAN, K., WINSON, M., FISH, L., TAYLOR, A., CHHABRA, S., CAMARA, M., DAYKIN, M., LAMB, J., SWIFT, S., BYCROFT, B., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143**: 3703.
- MCCLEAN, S., O'KANE, E., HILLIS, J. & SMYTH, W. F. (1999). Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **838**: 273.
- MCCLEAN, S., O'KANE, E. J. & SMYTH, W. F. (2000). The identification and determination of selected 1,4-benzodiazepines by an optimised capillary electrophoresis - electrospray mass spectrometric method. *Electrophoresis* **21**: 1381.



- MCCOMB, M. E., KRUTCHINSKY, A. N., ENS, W., STANDING, K. G. & PERREAULT, H. (1998). Sensitive high-resolution analysis of biological molecules by capillary zone electrophoresis coupled with reflecting time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **800**: 1.
- MCCOMB, M. E. & PERREAULT, H. (2000). Design of a sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry probe for operation with a Z-spray (TM) ionization source. *Electrophoresis* **21**: 1354.
- MCGOWAN, S., HOLDEN, M., BYCROFT, B. & SALMOND, G. (1999). Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 135.
- MCLEOD, G. S., AXELSSON, J., SELF, R. & DERRICK, P. J. (1997). Comparison of novel sampling methods for the analysis of capillary electrophoresis fractions by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**: 214.
- MEIER, H. & BLASCHKE, G. (2000). Capillary electrophoresis-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and nanoelectrospray-mass spectrometry of praziquantel metabolites. *J. Chromatogr. B* **748**: 221.
- MEIGHEN, E. (1994). Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 117.
- MERCIER, J. P., CHAIMBAULT, P., MORIN, P., DREUX, M. & TAMBUTE, A. (1998). Identification of phosphonic acids by capillary electrophoresis ionspray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **825**: 71.
- MERCIER, J. P., MORIN, P. & DREUX, M. (1999). Combination of lc-ms and ce-ms analysis for the separation and the identification of phosphonic acids. *Chimia* **53**: 511.
- MESSINA, P., MORINI, M. A., SCHULZ, P. C. & FERRAT, G. (2002). The aggregation of sodium dehydrocholate in water. *Colloid Polym. Sci.* **280**: 328.
- MICHAEL, B., SMITH, J., SWIFT, S., HEFFRON, F. & AHMER, B. (2001). SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* **183**: 5733.
- MICHALKE, B., SCHRAMEL, O. & KETTRUP, A. (1999). Capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (cE/ICP-MS) and to electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS): An approach for maximum species information in speciation of selenium. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**: 456.
- MICHELS, J., ALLAIN, E., BORCHARDT, S., HU, P. & MCCOY, W. (2000). Degradation pathway of homoserine lactone bacterial signal molecules by halogen antimicrobials identified by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **898**: 153.

- MIDDLETON, B., RODGERS, H. C., CÁMARA, M., KNOX, A. J., WILLIAMS, P. & HARDMAN, A. (2002). Direct detection of *N*-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**: 1.
- MILTON, D., CHALKER, V., KIRKE, D., HARDMAN, A., CÁMARA, M. & WILLIAMS, P. (2001). The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. *J. Bacteriol.* **183**: 3537.
- MILTON, D., HARDMAN, A., CAMARA, M., CHHABRA, S., BYCROFT, B., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* **179**: 3004.
- MOINI, M. (2001). Design and performance of a universal sheathless capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a split-flow technique. *Anal. Chem.* **73**: 3497.
- MOINI, M., DEMARS, S. M. & HUANG, H. L. (2002). Analysis of carbonic anhydrase in human red blood cells using capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **74**: 3772.
- MOLINA, M., WIEDMER, S. K., JUSSILA, M., SILVA, M. & RIEKKOLA, M. L. (2001). Use of a partial filling technique and reverse migrating micelles in the study of *n*-methylcarbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **927**: 191.
- DE LA MORA, J. F., VAN BERKEL, G. J., ENKE, C. G., COLE, R. B., MARTINEZ-SANCHEZ, M. & FENN, J. B. (2000). Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**: 939.
- MORIN, D., GRASLAND, B., VALLÉE-RÉHEL, K., DUFAU, C. & HARAS, D. (2003). On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr. A* **1002**: 79.
- MOYANO, E., GAMES, D. E. & GALCERAN, M. T. (1996). Determination of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 1379.
- MURRAY, K. K. (1997). Coupling matrix-assisted laser desorption/ionization to liquid separations. *Mass Spectrom. Rev.* **16**: 283.
- NACHIN, L. & BARRAS, F. (2000). External pH: an environmental signal that helps to rationalize *pel* gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 882.

- NAYLOR, S., JI, Q. C., JOHNSON, K. L., TOMLINSON, A. J., KIEPER, W. C. & JAMESON, S. C. (1998). Enhanced sensitivity for sequence determination of major histocompatibility complex class I peptides by membrane preconcentration - capillary electrophoresis - microspray - tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**: 2207.
- NAYLOR, S. & TOMLINSON, A. J. (1996). Membrane preconcentration capillary electrophoresis mass spectrometry in the analysis of biologically derived metabolites and biopolymers. *Biomed. Chromatogr.* **10**: 325.
- (1998). Membrane preconcentration-capillary electrophoresis tandem mass spectrometry (mpc-ce-ms/ms) in the sequence analysis of biologically derived peptides. *Talanta* **45**: 603.
- MCNEAL, C. J., MACFARLANE, R. D. & THURSTON, E. L. (1979). Thin film deposition by the electro spray method for Californium-252 plasma desorption studies of involatile molecules. *Anal. Chem.* **51**: 2036 .
- NEALSON, K., PLATT, T. & HASTINGS, J. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol.* **104**: 313.
- NEUSUSS, C., PELZING, M. & MACHT, M. (2002). A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 3149.
- NEWTON, J. & FRAY, R. (2004). Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* **6**: 213.
- NIESSEN, W. M. A., TJADEN, U. R. & VAN DER GREEF, J. (1993). Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **636**: 3.
- NILSSON, S., WETTERHALL, M., BERGQUIST, J., NYHOLM, L. & MARKIDES, K. E. (2001). A simple and robust conductive graphite coating for sheathless electrospray emitters used in capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**: 1997.
- NUNEZ, O., MOYANO, E. & GALCERAN, M. T. (2002). Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. *J. Chromatogr. A* **974**: 243.
- DE NYS, R., KUMAR, N., SHARARA, K., SRINIVASAN, S., BALL, G. & KJELLEBERG, S. (2001). A new metabolite from the marine bacterium *Vibrio angustum* S14. *J. Nat. Prod.* **64**: 531.
- OCHSNER, U. & REISER, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 6424.

- OLIVARES, J., NGUYEN, N., YONKER, C. & SMITH, R. (1987). Online mass spectrometry detection for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* **59**: 1230.
- OOSTERKAMP, A., GELPI, E. & ABIAN, J. (1998a). Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**: 976.
- OOSTERKAMP, A. J., GELPI, E. & ABIAN, J. (1998b). Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**: 976.
- OSBOURN, D. M., WEISS, D. & LUNTE, C. (2000). On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**: 2769.
- OTSUKA, K., SMITH, C. J., GRAINGER, J., BARR, J. R., PATTERSON, D. G., TANAKA, N. & TERABE, S. (1998). Stereoselective separation and detection of phenoxy acid herbicide enantiomers by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **817**: 75.
- OTTO, M., ECHNER, H., VOELTER, W. & GÖTZ, F. (2001). Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**: 1957.
- OZAKI, H., ITOU, N., TAKADA, Y., SAKAIRI, M. & KOIZUMI, H. (1995a). Micellar elektrokinetic chromatography-mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant; on-line coupling with an electrospray ionization interface. *J. Chromatogr.* **716**: 69.
- OZAKI, H., ITOU, N., TERABE, S., TAKADA, Y., SAKAIRI, M. & KOIZUMI, H. (1995b). Micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant on-line coupling with an electrospray ionization interface. *J. Chromatogr. A* **716**.
- PALFREYMAN, R., WATSON, M., EDEN, C. & SMITH, A. (1997). Induction of biologically active interleukin-8 from lung epithelial cells by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* products. *Infect. Immun.* **65**: 617.
- PALMER, M. E., TETLER, L. W. & WILSON, I. D. (2000). Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 808.
- PARK, S.-Y., LEE, S. J., OH, T.-K., OH, J.-W., KOO, B.-T., YUM, D.-Y. & LEE, J.-K. (2003). AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* **149**: 1541.
- PARSEK, M. & GREENBERG, E. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8789.

- PATIST, A., JHA, B. K., OH, S.-G. & SHAH, D. O. (1999). Importance of micellar relaxation time on detergent properties. *J. Surf. Deterg.* **2**: 317.
- PAWLAK, K. P., PALACIOS, O., CAPDEVILA, M., GONZALEZ-DUARTE, P. & LOBINSKI, R. (2002). Monitoring of the metal displacement from the recombinant mouse liver metallothionein Zn-7-complex by capillary zone electrophoresis with electro-spray MS detection. *Talanta* **57**: 1011.
- PEARSON, J., DELDEN, C. V. & IGLEWSKI, B. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**: 1203.
- PEARSON, J., GRAY, K., PASSADOR, L., TUCKER, K., EBERHARD, A., IGLEWSKI, B. & GREENBERG, E. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 197.
- PEARSON, J., PASSADOR, L., IGLEWSKI, B. & GREENBERG, E. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 1490.
- PERI-OKONNY, U. L., KENNDLER, E., STUBBS, R. J. & GUZMAN, N. A. (2003). Characterization of pharmaceutical drugs by a modified nonaqueous capillary electrophoresis mass spectrometry method. *Electrophoresis* **24**: 139.
- PERKINS, J. & TOMER, K. (1994). CE-ESI/MS using a high performance magnetic sector mass spectrometer. *Anal. Chem.* **66**: 2835.
- PESCI, E., MILBANK, J., PEARSON, J., MCKNIGHT, S., KENDE, A., GREENBERG, E. & IGLEWSKI, B. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 11229.
- PETERS, L., KÖNIG, G. M., WRIGHT, A. D., PUKALL, R., STACKEBRANDT, E., EBERL, L. & RIEDEL, K. (2003). Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3469.
- PETERSON, Z. D., COLLINS, D. C., BOWERBANK, C. R., LEE, M. L. & GRAVES, S. W. (2002). Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **776**: 221.
- PETERSSON, M. A., HULTHE, G. & FOGELQVIST, E. (1999). New sheathless interface for coupling capillary electrophoresis to electrospray mass spectrometry evaluated by the analysis of fatty acids and prostaglandins. *J. Chromatogr. A* **854**: 141.
- PIERSON, L., WOOD, D. & PIERSON, E. (1998). Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 207.

- PIIRMA, I. (1992). *Polymeric Surfactants*. Marcell Dekker, New York.
- PING, G., ZHANG, Y., ZHANG, W., ZHANG, L., ZHANG, L., SCHMITT-KOPPLIN, P. & KETTRUP, A. (2004). On-line concentration of neutral and charged species in capillary electrochromatography with a methacrylate-based monolithic stationary phase. *Electrophoresis* **95**: 421.
- PINTO, D. M., BOYD, R. K. & VOLMER, D. A. (2002). Ultra-high resolution for mass spectrometric analysis of complex and low-abundance mixtures - the emergence of FTICR-MS as an essential analytical tool. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 378.
- PLEASANCE, S., THIBAUT, P. & KELLY, J. (1992). Comparison of liquid-junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to compounds of concern to the aquaculture industry. *J. Chromatogr. A* **591**: 325.
- POIGER, T., RICHARDSON, S. D. & BAUGHMAN, G. L. (2000). Identification of reactive dyes in spent dyebaths and wastewater by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **886**: 271.
- PREISLER, J., HU, P., REJTAR, T. & KARGER, B. L. (2000). Capillary electrophoresis-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a vacuum deposition interface. *Anal. Chem.* **72**: 4785.
- PURNELL, J. H. (1962). *Gas Chromatography*. Wiley, New York.
- QIN, Y., LUO, Z., SMYTH, A., GAO, P., BECK V. BODMAN, S. & FARRAND, S. (2000). Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J.* **19**: 5212.
- RAMSEIER, A., SIETHOFF, C., CASLAVSKA, J. & THORMANN, W. (2000). Confirmation testing of amphetamines and designer drugs in human urine by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 380.
- RASMUSSEN, T., MANEFIELD, M., ANDERSEN, J., EBERL, L., ANTHONI, U., CHRISTOPHERSEN, C., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S. & GIVSKOV, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* **146**: 3237.
- RAYLEIGH, L. (1882). On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Phil. Mag.* **14**: 184.
- (1945). *The Theory of Sound*, Kap. XX. Dover Publications, New York.
- REIMMANN, C., GINET, N., MICHEL, L., KEEL, C., MICHAUX, P., KRISHNAPILLAI, V., ZALA, M., HEURLIER, K., TRIANDAFILLU, K., HARMS, H., DÉFAGO, G. & HAAS, D. (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**: 923.

- REINHOUD, N. J., SCHRODER, E., TJADEN, U. R., NIESSEN, W. M. A., DE BRAUW, M. C. T. N. & VAN DER GREEF, J. (1990). Static and scanning array detection in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **516**: 147.
- REINHOUD, N. J., TINKE, A. P., TJADEN, U. R., NIESSEN, W. M. A. & VAN DER GREEF, J. (1992). Capillary isotachophoretic analyte focusing for capillary electrophoresis with mass spectrometric detection using electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **627**: 263.
- REJTAR, T., HU, P., JUHASZ, P., CAMPBELL, J. M., VESTAL, M. L., PREISLER, J. & KARGER, B. L. (2002). Off-line coupling of high-resolution capillary electrophoresis to maldi-tof and tof/tof ms. *J. Prot. Res.* **1**: 171.
- REN, D., SIMS, J. & WOOD, T. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* **3**: 731.
- REZAI, M. A., FAMIGLINI, G. & CAPPIELLO, A. (1996). Enhanced detection sensitivity by large volume injection in reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **742**: 69.
- RIU, J., EICHHORN, P., GUERRERO, J. A., KNEPPER, T. P. & BARCELO, D. (2000). Determination of linear alkylbenzenesulfonates in wastewater treatment plants and coastal waters by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-UV detection and confirmation by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **889**: 221.
- RODELAS, B., LITHGOW, J., WISNIEWSKI-DYE, F., HARDMAN, A., WILKINSON, A., ECONOMOU, A., WILLIAMS, P. & DOWNIE, J. (1999). Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *J. Bacteriol.* **181**: 3816.
- RODRIGUEZ, R., MANES, J. & PICO, Y. (2003). Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. *Anal. Chem.* **75**: 452.
- RODRIGUEZ, R., PICO, Y., FONT, G. & MANES, J. (2002). Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **949**: 359.
- ROHDE, E., TOMLINSON, A. J., JOHNSON, D. H. & NAYLOR, S. (1998). Comparison of protein mixtures in aqueous humor by membrane preconcentration capillary electrophoresis mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**: 2361.
- ROSNACK, K. J., STROH, J. G., SINGLETON, D. H., GUARINO, B. C. & ANDREWS, G. C. (1994). Use of capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of synthetic peptides. *J. Chromatogr. A* **675**: 219.

- ROWBURY, R. & GOODSON, M. (2001). Extracellular sensing and signalling pheromones switch-on thermotolerance and other stress responses in *Escherichia coli*. *Sci. Prog.* **84**: 205.
- RUBY, E. & MCFALL-NGAI, M. (1999). Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonisation of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol.* **7**: 414.
- RUBY, E. & NEALSON, K. (1976). Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*: A model of symbiosis based on bacterial studies. *Biol. Bull.* **151**: 574.
- RUDAZ, S., CHERKAOUI, S., DAYER, P., FANALI, S. & VEUTHEY, J. L. (2000). Simultaneous stereoselective analysis of tramadol and its main phase I metabolites by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **868**: 295.
- RUDAZ, S., CHERKAOUI, S., GAUVRIT, J. Y., LANTERI, P. & VEUTHEY, J. L. (2001). Experimental designs to investigate capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry enantioseparation with the partial-filling technique. *Electrophoresis* **22**: 3316.
- RUIZ-CALERO, V., MOYANO, E., PUIGNOU, L. & GALCERAN, M. T. (2001). Pressure-assisted capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of heparin depolymerised disaccharides. *J. Chromatogr. A* **914**: 277.
- RUNDLETT, K. L. & ARMSTRONG, D. W. (1996). Mechanism of signal suppression by an ionic surfactants in capillary electrophoresis electro-spray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68**: 3493.
- RUSSEL, W., SAVILLE, D. & SCHOWALTER, W. (1989). Colloidal Dispersions. Cambridge University Press, Cambridge.
- SALEH, A., FIGARELLA, C., KAMMOUNI, W., MARCHAND-PINATEL, S., LAZDUNSKI, A., TUBUL, A., BRUN, P. & MERTEN, M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits expression of P2Y receptors in cystic fibrosis tracheal gland cells. *Infect. Immun.* **67**: 5076.
- SAMSKOG, J., WETTERHALL, M., JACOBSSON, S. & MARKIDES, K. (2000). Optimization of capillary electrophoresis conditions for coupling to a mass spectrometer via a sheathless interface. *J. Mass Spectrom.* **35**: 919.
- SCHAEFER, A., VAL, D., HANZELKA, B., CRONAN, J. & GREENBERG, E. (1996). Gratification of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 9505.



- SCHAEFER, A. L., TAYLOR, T. A., BEATTY, J. T. & GREENBERG, E. (2002). Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J. Bacteriol.* **184**: 6515.
- SCHAUDER, S., SHOKAT, K., SURETTE, M. & BASSLER, B. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* **41**: 463.
- SCHEMBRI, M. A., GIVSKOV, M. & KLEMM, P. (2002). An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. *Sci. STKE* **2002**: RE6.
- SCHMIDT, F. (2004). The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 335.
- SCHMITT-KOPPLIN, P. (2002). Comprehensive approaches for the characterization of polydisperse natural organic matter (NOM) with capillary electrophoresis-electrospray ionization/mass spectrometry (CE-ESI/MS). Habilitationsschrift, Technische Universität München.
- SCHMITT-KOPPLIN, P. & FROMMBERGER, M. (2003). Capillary electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* **24**: 3837.
- SCHRAMMEL, O., MICHALKE, B. & KETTRUP, A. (1998). Analysis of metal species by using electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **819**: 231.
- (1999). Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS) as a powerful tool for trace element speciation. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**: 452.
- SCHRAMM, L. L. (2000). *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. Cambridge University Press, Cambridge.
- SCHRIPSEMA, J., DE RUDDER, K., VAN VLIET, T., LANKHORST, P., DE VROOM, E., KIJNE, J. & VAN BRUSSEL, A. (1996). Bacteriocin *small* of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* **178**: 366.
- SCHWEDA, E. K. H., LI, J., MOXON, E. R. & RICHARDS, J. C. (2002). Structural analysis of lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by non-typeable *Haemophilus influenzae* strain 176. *Carbohydr. Res.* **337**: 409.
- SENTELLAS, S., PUIGNOU, L., MOYANO, E. & GALCERAN, M. T. (2000). Determination of ebrotidine and its metabolites by capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* **888**: 281.

- SERWE, M. & ROSS, G. (1999). Peptide characterization by CE-ESI-MS with orthogonal spray. *Chromatographia* **49**: S73.
- SETTLAGE, R. E., RUSSO, P. S., SHABANOWITZ, J. & HUNT, D. F. (1998). A novel  $\mu$ -ESI source for coupling capillary electrophoresis and mass spectrometry: Sequence determination of tumor peptides at the attomole level. *J. Microcol. Sep.* **10**: 281.
- SEVERS, J. C., HOFSTADLER, S. A., ZHAO, Z., SENH, R. T. & SMITH, R. D. (1996a). The interface of capillary electrophoresis with high performance fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for biomolecule characterization. *Electrophoresis* **17**: 1808.
- (1996b). The interface of capillary electrophoresis with high performance Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for biomolecule characterization. *Electrophoresis* **17**: 1808.
- SEVERS, J. C. & SMITH, R. D. (1997). Characterization of the microdialysis junction interface for capillary electrophoresis microelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 2154.
- SHADEL, G., DEVINE, J. & BALDWIN, T. (1990). Control of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri*. *J. Biolumin. Chemilumin.* **5**: 99.
- SHAMSI, S. A. (2002). Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry: Modes and applications. *Electrophoresis* **23**: 4036.
- SHAW, P., PING, G., DALY, S., CHA, C., CRONAN, J., RINEHART, K. & FARRAND, S. (1997). Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6036.
- SHEN, J. W. & BUKO, A. (2002). Rapid identification of proteins in polyethylene glycol-containing samples using capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **311**: 80.
- SHEPPARD, R. L. & HENION, J. (1997). Determination of ethylenediaminetetraacetic acid as the nickel chelate in environmental water by solid-phase extraction and capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**: 287.
- SHIAO, S. Y., CHHABRA, V., PATIST, A., FREE, M. L., HUIBERS, P. D. T., GREGORY, A., PATEL, S. & SHAW, D. O. (1998). Chain length compatibility effects in mixed surfactant systems for technological applications. *J. Coll. Interf. Sci.* **74**: 1.
- SHUI, W., YU, Y., XU, X., HUANG, Z., XU, G. & YANG, P. (2003). Microelectrospray with stainless steel emitters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**: 1541.
- SIMO, C., SOTO-YARRITU, P. L. & CIFUENTES, A. (2002). Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 2288.

- SJODAHL, J., MELIN, J., GRISS, P., EMMER, A., STEMME, G. & ROERAADE, J. (2003). Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nano-electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**: 337.
- SLAUGHTER, J. E. (1999). The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **74**: 259.
- SMITH, A. D. & MOINI, M. (2001a). Control of electrochemical reactions at the capillary electrophoresis outlet/electrospray emitter electrode under CE/ESI-MS through the application of redox buffers. *Anal. Chem.* **73**: 240.
- (2001b). Control of electrochemical reactions at the capillary electrophoresis outlet/electrospray emitter electrode under ce/esi-ms through the application of redox buffers. *Anal. Chem.* **73**: 240.
- SMITH, H. (2000a). Questions about the behaviour of bacterial pathogens in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**: 551.
- SMITH, J. L., FRATAMICO, P. M. & NOVAK, J. S. (2004). Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J. Food. Prot.* **67**: 1053.
- SMITH, R., FEDYK, E., SPRINGER, T., MUKAIDA, N., IGLEWSKI, B. & PHIPPS, R. (2001a). IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer *N*-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J. Immunol.* **167**: 366.
- SMITH, R., LOO, J., EDMONDS, C., BARINAGA, C. & UDSETH, H. (1990a). New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.* **62**: 882.
- SMITH, R. D. (2000b). Evolution of ESI-mass spectrometry and fourier transform ion cyclotron resonance for proteomics and other biological applications. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**: 509.
- SMITH, R. D., BARINAGA, C. & UDSETH, H. (1988a). Improved ESI interface for CE-MS. *Anal. Chem.* **60**: 1948.
- SMITH, R. D., LOO, J. A., EDMONDS, C. G., BARINAGA, C. J. & UDSETH, H. R. (1990b). Sensitivity considerations for large molecule detection by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **516**: 157.
- SMITH, R. D., OLIVARES, J., NGUYEN, N. & UDSETH, H. (1988b). Cze-ms using a esi interface. *Anal. Chem.* **60**: 436.

- SMITH, R. D., PASA-TOLIC, L., LIPTON, M. S., JENSEN, P. K., ANDERSON, G. A., SHEN, Y. F., CONRADTS, T. P., UDSETH, H. R., HARKIEWICZ, R., BELOV, M. E., MASSELON, C. & VEENSTRA, T. D. (2001b). Rapid quantitative measurements of proteomes by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 1652.
- SMITH, R. D., UDSETH, H. R., BARINAGA, C. J. & EDMONDS, C. G. (1991). Instrumentation for high-performance capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **559**: 197.
- SMITH, R. D., UDSETH, H. R., LOO, J. A., WRIGHT, B. W. & ROSS, G. A. (1989). Sample introduction and separation in capillary electrophoresis, and combination with mass spectrometric detection. *Talanta* **36**: 161.
- SMITH, R. D., UDSETH, H. R., WAHL, J. H., GOODLETT, D. R. & HOFSTADLER, S. A. (1996). Capillary electrophoresis mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **271**: 448.
- SMITH, R. S. & IGLEWSKI, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 56.
- SMITH, R. S., KELLY, R., IGLEWSKI, B. H. & PHIPPS, R. P. (2002). The *Pseudomonas* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J. Immunol.* **169**: 2636.
- SOGA, T. & HEIGER, D. N. (2000). Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**: 1236.
- SOGA, T., UENO, Y., NARAOKA, H., MATSUDA, K., TOMITA, M. & NISHIOKA, T. (2002). Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal. Chem.* **74**: 6224.
- STOCKIGT, D., LOHMER, G. & BELDER, D. (1996). Separation and identification of basic dendrimers using capillary electrophoresis on-line coupled to a sector mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 521.
- STOCKIGT, D., UNGER, M., BELDER, D. & STOCKIGT, J. (1997). Analysis of *Rauwolfia* alkaloids employing capillary electrophoresis mass spectrometry. *Nat. Prod. Lett.* **9**: 265.
- STOCKIGT, J., SHELUDKO, Y., UNGER, M., GERASIMENKO, I., WARZECHA, H. & STOCKIGT, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *J. Chromatogr. A* **967**: 85.

- STRASERS, J. K. & KHALEDI, M. G. (1991). Migration behaviour of cationic solutes in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* **63**: 2503.
- STRICKMANN, D. B., KUNG, A. & KEPPLER, B. K. (2002). Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the investigation of the binding behavior of oxaliplatin to 5'-GMP in the presence of the sulfur-containing amino acid L-methionine. *Electrophoresis* **23**: 74.
- STUBBERUD, K., FORSBERG, A., CALLMER, K. & WESTERLUND, D. (2002). Partial filling micellar electrokinetic chromatography optimization studies of ibuprofen, codeine and degradation products, and coupling to mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 572.
- STURM, S. & STUPPNER, H. (1998). Analysis of isoquinoline alkaloids in medicinal plants by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**: 3026.
- STURME, M. H. J., KLEEREBEZEM, M., NAKAYAMA, J., AKKERMANS, A. D. L., VAUGHAN, E. E. & DE VOS, W. M. (2002). C to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 233.
- SULLIVAN (1998). Molecular genetics of biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 263.
- SWIFT, S., DOWNIE, J., WHITEHEAD, N., BARNARD, A., SALMOND, G. & WILLIAMS, P. (2001). Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **45**: 199.
- SWIFT, S., KARLYSHEV, A., FISH, L., DURANT, E., WINSON, M., CHHABRA, S., WILLIAMS, P., MACINTYRE, S. & STEWART, G. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* **179**: 5271.
- SWIFT, S., LYNCH, M., FISH, L., KIRKE, D., TOMÁS, J., STEWART, G. & WILLIAMS, P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **67**: 5192.
- SWIFT, S., WINSON, M., CHAN, P., BAINTON, N., BIRDSALL, M., REEVES, P., REES, C., CHHABRA, S., HILL, P. & THROUP, J. (1993). A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**: 511.
- TAKEDA, S., TANAKA, Y., YAMANE, M., SIROMA, Z., WAKIDA, S., OTSUKA, K. & TERABE, S. (2001). Ionization of dichlorophenols for their analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **924**: 415.

- TAMINIAU, B., DAYKIN, M., SWIFT, S., BOSCHIROLI, M.-L., TIBOR, A., LESTRATE, P., BOLLE, X. D., O'CALLAGHAN, D., WILLIAMS, P. & LETESSON, J.-J. (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* **70**: 3004.
- TANAKA, Y., KISHIMOTO, Y., OTSUKA, K. & TERABE, S. (1998). Strategy for selecting separation solutions in capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **817**: 49.
- TANAKA, Y., OTSUKA, K. & TERABE, S. (2000). Separation of enantiomers by capillary electrophoresis-mass spectrometry employing a partial filling technique with a chiral crown ether. *J. Chromatogr. A* **875**: 323.
- (2003). Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 1889.
- TANG, F. P. W., LEUNG, G. N. W. & WAN, T. S. M. (2001). Analyses of quaternary ammonium drugs in horse urine by capillary electrophoresis - mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 2201.
- TANG, K. & GOMEZ, A. (1994). Generation by electrospray of monodisperse water droplets for targeted drug delivery by inhalation,. *J. Aerosol Sci.* **25**: 1237.
- TAYLOR, G. I. (1964). Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A* **280**: 397.
- TELFORD, G., WHEELER, D., WILLIAMS, P., TOMKINS, P., APPLEBY, P., SEWELL, H., STEWART, G., BYCROFT, B. & PRITCHARD, D. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* **66**: 36.
- TERABE, S., OTSUKA, K. & T., A. (1985). Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal. Chem.* **57**: 834.
- TETLER, L. W., COPPER, P. A. & POWELL, B. (1995). Influence of capillary dimensions on the performance of a coaxial capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry interface. *J. Chromatogr. A* **700**: 21.
- THOMSON, J. J. (1913). Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis. Longmans Green, London.
- THORMANN, W., LANZ, M., CASLAVSKA, J., SIEGENTHALER, P. & PORTMANN, R. (1998). Screening for urinary methadone by capillary electrophoretic immunoassays and confirmation by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Electrophoresis* **19**: 57.

- THROUP, J., CAMARA, M., BRIGGS, G., WINSON, M., CHHABRA, S., BYCROFT, B., WILLIAMS, P. & STEWART, G. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* **17**: 345.
- TOMER, K. B., MOSELEY, M. A., DETERDING, L. J. & PARKER, C. E. (1994). Capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **13**: 431.
- TOMLINSON, A. J., BENSON, L. M., GORROD, J. W. & NAYLOR, S. (1994). Investigation of the in vitro metabolism of the H<sub>2</sub>-antagonist mifentidine by on-line capillary electrophoresis–mass spectrometry using non-aqueous separation conditions. *J. Chromatogr. B* **657**: 373.
- TOMLINSON, A. J., BENSON, L. M., JAMESON, S. & NAYLOR, S. (1996). Rapid loading of large sample volumes, analyte cleanup, and modified moving boundary transient isotachopheresis conditions for membrane preconcentration–capillary electrophoresis in small diameter capillaries. *Electrophoresis* **17**: 1801.
- TOMLINSON, A. J., BENSON, L. M., JOHNSON, K. L. & NAYLOR, S. (1993). Investigation of the metabolic fate of the neuroleptic drug haloperidol by capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **621**: 239.
- TOMLINSON, A. J., BRADDOCK, W. D., BENSON, L. M., ODA, R. P. & NAYLOR, S. (1995). Preliminary investigations of preconcentration–capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **669**: 67.
- TOMLINSON, A. J. & NAYLOR, S. (1995). Systematic development of on-line membrane preconcentration capillary electrophoresis mass spectrometry for the analysis of peptide mixtures. *J. Capillary Electroph.* **2**: 225.
- TONDRE, C., LANG, J. & ZANA, R. (1975). On the use of dyes for the kinetic study of micellar equilibria. *J. Coll. Interf. Sci.* **52**: 372.
- TONG, W., LINK, A., ENG, J. K. & YATES, J. R. (1999). Identification of proteins in complexes by solid phase microextraction multistep elution capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**: 2270.
- TOUSSAINT, B., PALMER, M., CHIAP, P., HUBERT, P. & CROMMEN, J. (2001). On-line coupling of partial filling–capillary zone electrophoresis with mass spectrometry for the separation of clenbuterol enantiomers. *Electrophoresis* **22**: 1363.
- TSAI, C. Y., CHEN, Y. R. & HER, G. R. (1998). Analysis of triazines by reversed electroosmotic flow capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **813**: 379.

- TSAI, J. L., WU, W. S. & LEE, H. H. (2000). Qualitative determination of urinary morphine by capillary zone electrophoresis and ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 1580.
- TSYBIN, Y. O., HAKANSSON, P., WETTERHALL, M., MARKIDES, K. E. & BERGQUIST, J. (2002). Capillary electrophoresis and electron capture dissociation fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for peptide mixture and protein digest analysis. *Europ. J. Mass Spectrom.* **8**: 389.
- UDSETH, H. R., LOO, J. A. & SMITH, R. D. (1989). Capillary isotachyphoresis/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **61**: 228.
- ULRICH, R. L., HINES, H. B., PARTHASARATHY, N. & JEDDELOH, J. A. (2004). Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *J. Bacteriol.* **186**: 4350.
- UNGER, M., STOCKIGT, D., BELDER, D. & STOCKIGT, J. (1997). Alkaloid determination in crude extracts from *Cortex quebracho* and opium applying capillary electrophoresis and capillary electrophoresis mass spectrometry coupling. *Pharmazie* **52**: 691.
- VALADE, E., THIBAUT, F., GAUTHIER, Y., PALENCIA, M., POPOFF, M. & VIDAL, D. (2004). The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J. Bacteriol.* **186**: 2288.
- VALASKOVIC, G. A., KELLEHER, N. L. & MCLAFFERTY, F. W. (1996). Attomole protein characterization by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Science* **273**: 1199.
- VALASKOVIC, G. A. & MCLAFFERTY, F. W. (1996a). Long-lived metallized tips for nanoliter electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**: 1270.
- (1996b). Sampling error in small-bore sheathless capillary electrophoresis electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**: 825.
- VANNINI, A., VOLPARI, C., GARGIOLI, C., MURAGLIA, E., CORTESE, R., FRANCESCO, R. D., NEDDERMANN, P. & MARCO, S. D. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J.* **21**: 4393.
- VARESEO, E., CHERKAOU, S. & VEUTHEY, J. L. (1998). Optimization of CE-ESI-MS parameters for the analysis of ecstasy and derivatives in urine. *J. High Res. Chromatogr.* **21**: 653.



- VARESIO, E., RUDAZ, S., KRAUSE, K. H. & VEUTHEY, J. L. (2002). Nanoscale liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry for the detection of amyloid-beta peptide related to Alzheimer's disease. *J. Chromatogr. A* **974**: 135.
- VARGHESE, J. & COLE, R. B. (1993). Cetyltrimethylammonium chloride as a surfactant buffer additive for reversed-polarity capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **652**: 369.
- VARJO, S. J. O., JUSSILA, M., PALONEN, S. & RIEKKOLA, M. L. (2002). Interface for coupling nonaqueous wide-bore capillary electrophoresis with mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 437.
- VAN VEELLEN, P. A., TJADEN, U. R., VAN DER GREEF, J., INGENDOH, A. & HILLENKAMP, F. (1993). Off-line coupling of capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **647**: 367.
- VENTURI, V., FRISCINA, A., BERTANI, I., DEVESCOVI, G. & AGUILAR, C. (2004). Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Res. Microbiol.* **155**: 238.
- VERHEIJ, E. R., TJADEN, U. R., NIESSEN, W. M. A. & VAN DER GREEF, J. (1991). Pseudo-electrochromatography-mass spectrometry: a new alternative. *J. Chromatogr. A* **554**: 339.
- VERWEY, E. J. W. & OVERBEEK, J. T. H. G. (1948). Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. Elsevier, New York.
- VISICK, K. & MCFALL-NGAI (2000). An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Eupymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* **182**: 1779.
- VOLLMERHAUS, P. J., TEMPELS, F. W. A., KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J. & HECK, A. J. R. (2002). Molecular interactions of glycopeptide antibiotics investigated by affinity capillary electrophoresis and bioaffinity electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**: 868.
- VROUWE, E. X., GYSLER, J., TJADEN, U. R. & VAN DER GREEF, J. (2000). Chip-based capillary electrophoresis with an electrodeless nanospray interface. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 1682.
- VUORENSOLA, K., SIREN, H. & KARJALAINEN, U. (2003). Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **788**: 277.
- VUORENSOLA, K., SIREN, H., KOSTIAINEN, R. & KOTIAHO, T. (2002). Analysis of catecholamines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-nanospray mass spectrometry - use of aqueous and non-aqueous solutions compared with physical parameters. *J. Chromatogr. A* **979**: 179.

- WACHS, T. & HENION, J. (2001). Electrospray device for coupling microscale separations and other miniaturized devices with electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**: 632.
- WACHS, T., SHEPPARD, R. L. & HENION, J. (1996). Design and applications of a self-aligning liquid junction electrospray interface for capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **685**: 335.
- WAHL, J. H., GALE, D. C. & SMITH, R. D. (1994). Sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry using 10  $\mu\text{m}$  i.d. capillaries: Analyses of tryptic digests of cytochrome c. *J. Chromatogr. A* **659**: 217.
- WAHL, J. H., GOODLETT, D. R., UDSETH, H. R. & SMITH, R. D. (1992). Attomole level capillary electrophoresis-mass spectrometric protein analysis using 5- $\mu\text{m}$ -i.d. capillaries. *Anal. Chem.* **64**: 3194.
- WANG, C., OLESCHUK, R., OUCHEN, F., LI, J. J., THIBAUT, P. & HARRISON, D. J. (2000). Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**: 1377.
- WANG, L.-H., WENG, L.-X., DONG, Y.-H. & ZHANG, L.-H. (2004). Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching *N*-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *J. Biol. Chem.* **279**: 13645.
- WANG, Q. G., LUO, G. A., WANG, R. J., ZHOU, W. H. & ZHAO, Y. F. (1996). Analysis of the reaction products of *N*-(*o,o*-diisopropyl)phosphorylthreonine with uridine by capillary zone electrophoresis with diode array detection and capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **745**: 263.
- WARD, T. J., ARMSTRONG, D. W., CZECH, B. P., KOSZUK, J. F. & BARTSCH, R. A. (1982). Effect of crown-ether surfactants on flame atomic absorption and flame emission signals of some monovalent cations. *Anal. Chim. Acta* **188**: 301.
- WARNKE, U., GYSLER, J., HOFTE, B., TJADEN, U. R., VAN DER GREEF, J., KLOFT, C., SCHUNACK, W. & JAEHDE, U. (2001). Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 97.
- WATERVAL, J. C. M., HOMMELS, G., BESTEBREURTJE, P., VERSLUIS, C., HECK, A. J. R., BULT, A., LINGEMAN, H. & UNDERBERG, W. J. M. (2001). Capillary electrophoretic bioanalysis of therapeutically active peptides with UV and mass spectrometric detection after on-capillary preconcentration. *Electrophoresis* **22**: 2709.
- WATSON, W. T., MINOGUE, T. D., VAL, D. L., BECK V. BODMAN, S. & CHURCHILL, M. E. A. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell* **9**: 685.

- WEINBERGER, R. (2001). Capillary electrophoresis of venoms and toxins. *Electrophoresis* **22**: 3639.
- WEINMANN, W., PARKER, C. E., DETERDING, L. J., PAPAC, D. I., HOYES, J., PRZYBYLSKI, M. & TOMER, K. B. (1994). Capillary electrophoresis-matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry of proteins. *J. Chromatogr. A* **680**: 353.
- WELCH, M., TODD, D., WHITEHEAD, N., MCGOWAN, S., BYCROFT, B. & SALMOND, G. (2000). *N*-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *EMBO J.* **19**: 631.
- WEN, J., LIN, Y. H., XIANG, F., MATSON, D. W., UDSETH, H. R. & SMITH, R. D. (2000). Microfabricated isoelectric focusing device for direct electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 191.
- WETTERHALL, M., KLETT, O., MARKIDES, K. E., NYHOLM, L. & BERGQUIST, J. (2003). A comparison of the electrochemical stabilities of metal, polymer and graphite coated nanospray emitters. *Analyst* **128**: 728.
- WETTERHALL, M., PALMBLAD, M., HAKANSSON, P., MARKIDES, K. E. & BERGQUIST, J. (2002a). Rapid analysis of tryptically digested cerebrospinal fluid using capillary electrophoresis-electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **1**: 361.
- (2002b). Rapid analysis of tryptically digested cerebrospinal fluid using capillary electrophoresis-electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry. *J. Prot. Res.* **1**: 361.
- WEY, A. B., CASLAVSKA, J. & THORMANN, W. (2000). Analysis of codeine, dihydrocodeine and their glucuronides in human urine by electrokinetic capillary immunoassays and capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **895**: 133.
- WEY, A. B. & THORMANN, W. (2001). Capillary electrophoresis-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for analysis and confirmation testing of morphine and related compounds in urine. *J. Chromatogr. A* **916**: 225.
- (2002). Capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-ion trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation and identification of oxycodone and its major metabolites in human urine. *J. Chromatogr. B* **770**: 191.
- WHEAT, T. E., LILLEY, K. A. & BANKS, J. F. (1997). Capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry detection for low-molecular-mass compounds. *J. Chromatogr. A* **781**: 99.
- WHITEHEAD, N., BARNARD, A., SLATER, H., SIMPSON, N. & SALMOND, G. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365.

- WHITEHEAD, N. A., BYERS, J. T., COMMANDER, P., CORBETT, M. J., COULTHURST, S. J., EVERSON, L., HARRIS, A. K. P., PEMBERTON, C. L., SIMPSON, N. J. L., SLATER, H., SMITH, D. S., WELCH, M., WILLIAMSON, N. & SALMOND, G. P. C. (2002). The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 223.
- WIEDMER, S. K., JUSSILA, M. & RIEKKOLA, M. L. (1998). On-line partial filling micellar electrokinetic capillary chromatography electrospray ionization mass spectrometry of corticosteroids. *Electrophoresis* **19**: 1711.
- WILLEMS, A. V., DEFORCE, D. L., VAN DEN EECKHOUT, E. G., LAMBERT, W. E., VAN PETEGHEM, C. H., DE LEENHEER, A. P. & VAN BOCXLAER, J. F. (2002). Analysis of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry in conjunction with sample stacking. *Electrophoresis* **23**: 4092.
- WILLIAMS, P. (2002). Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert Opin. Ther. Targets* **6**: 257.
- WILLIAMS, P., CAMARA, M., HARDMAN, A., SWIFT, S., MILTON, D., HOPE, V., WINZER, K., MIDDLETON, B., PRITCHARD, D. & BYCROFT, B. (2000). Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355**: 667.
- WILM, M. & MANN, M. (1994). Electrospray and Taylor-cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom.* **136**: 167.
- (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**: 1.
- WINANS, S. (1998). Command, control and communication in bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **6**: 382.
- WINSON, M., CAMARA, M., LATIFI, A., FOGILINO, M., CHHABRA, S., DAYKIN, M., BALLY, M., CHAPON, V., SALMOND, G. & BYCROFT, B. (1995). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 9427.
- WINZER, K. & WILLIAMS, P. (2001). Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 131.
- WISNIEWSKI-DYÉ, F. & DOWNIE, J. A. (2002). Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 397.
- WISNIEWSKI-DYÉ, F., JONES, J., CHHABRA, S. & DOWNIE, J. (2002). *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **184**: 1597.

- WITHERS, H., SWIFT, S. & WILLIAMS, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 186.
- WOOD, D., GONG, F., DAYKIN, M., WILLIAMS, P. & PIERSON, L. (1997). *N*-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* **179**: 7663.
- WU, H., SONG, Z., HENTZER, M., ANDERSEN, J., MOLIN, S., GIVSKOV, M. & HØIBY, N. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**: 1054.
- WU, J. T., HE, L., LI, M. X., PARUS, S. & LUBMAN, D. M. (1997). On-line capillary separations tandem mass spectrometry for protein digest analysis by using an ion trap storage reflectron time-of-flight mass detector. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**: 1237.
- WU, J. T., QIAN, M. G., LI, M. X., ZHENG, K. F., HUANG, P. Q. & LUBMAN, D. M. (1998). On-line analysis by capillary separations interfaced to an ion trap storage reflectron time-of-flight mass spectrometer. *J. Chromatogr. A* **794**: 377.
- WYCHERLEY, D., ROSE, M. E., GILES, K., HUTTON, T. M. & RIMMER, D. A. (1996). Capillary electrophoresis with detection by inverse UV spectroscopy and electrospray mass spectrometry for the examination of quaternary ammonium herbicides. *J. Chromatogr. A* **734**: 339.
- XIN, B., PU, D., XIONG, S. X. & WANG, G. H. (2003). On-line separation and detection of peptides by capillary electrophoresis /electrospray FT-ICR-MS. *Chin. Chem. Lett.* **14**: 191.
- YAMASHITA, M. & FENN, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation of the free-jet theme. *J. Prot. Chem.* **88**: 4451.
- YANG, L. & LEE, C. S. (1997). Micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **780**: 207.
- YARWOOD, J. M. & SCHLIEVERT, P. M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**: 1620.
- YATES, E. A., PHILIPP, B., BUCKLEY, C., ATKINSON, S., CHHABRA, S. R., SOCKETT, R. E., GOLDNER, M., DESSAUX, Y., CÁMARA, M., SMITH, H. & WILLIAMS, P. (2002). *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **70**: 5635.

- YEUNG, B., PORTER, T. J. & VATH, J. E. (1997). Direct isoform analysis of high-mannose containing glycoproteins by on-line capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 2510.
- ZAFRAN, S., BEYNON, J. & KIDD, P. (1975). Prototype one millipound colloid thruster system. In: AIAA 11th Electric Propulsion Conference, Paper No. 75 392. New Orleans.
- ZAMFIR, A. & PETER-KATALINIC, J. (2001). Glycoscreening by on-line sheathless capillary electrophoresis/electrospray ionization-quadrupole time of flight-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 2448.
- ZAMFIR, A., ŽELJKA VUKELIĆ, BINDILA, L. & PETER-KATALINIĆ, J. (2004). Fully-automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometry of gangliosides from human cerebellum. *J. Am. Soc. Mass Spec.* **15**.
- ZELENY, J. (1917). Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev.* **10**: 1.
- ZHANG, B. L., FORET, F. & KARGER, B. L. (2000a). A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**: 1015.
- (2001). High-throughput microfabricated CE/ESI-MS: Automated sampling from a microwell plate. *Anal. Chem.* **73**: 2675.
- ZHANG, H., STOECKLI, M., ANDREN, P. E. & CAPRIOLI, R. M. (1999). Combining solid-phase preconcentration, capillary electrophoresis and off-line matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Intracerebral metabolic processing of peptide E in vivo. *J. Mass Spectrom.* **34**: 377.
- ZHANG, H.-B., WANG, C. & ZHANG, L.-H. (2004). The quorum degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**: 1389.
- ZHANG, L.-H. (2003). Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* **8**: 238.
- ZHANG, R.-G., PAPPAS, T., BRACE, J. L., MILLER, P. C., OULMASOV, T., MOLYNEAUX, J. M., ANDERSON, J. C., BASHKIN, J. K., WINANS, S. C. & JOACHIMIAK, A. (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature.* **417**: 971.
- ZHANG, Y., ZHU, J., ZHANG, L. & ZHANG, W. (2000b). High-efficiency on-line concentration technique of capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* **72**: 5744.
- ZHAO, J. Y., THIBAUT, P., TAZAWA, T. & QUILLIAM, M. A. (1997). Analysis of tetramine in sea snails by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **781**: 555.

- ZHAO, Y. I., SCHELFAUT, M., SANDRA, P. & BANKS, F. (1998). Capillary electrophoresis and capillary electrophoresis electrospray - mass spectroscopy for the analysis of heterocyclic amines. *Electrophoresis* **19**: 2213.
- ZHAO, Z. X., UDSETH, H. R. & SMITH, R. D. (1996). Characterization of metastable intermediates of enzymatic peroxidation of NAD(+) by on-line capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**: 193.
- ZHOU, G. H., LUO, G. A., ZHOU, Y., ZHOU, K. Y., ZHANG, X. D. & HUANG, L. Q. (1998). Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin. *Electrophoresis* **19**: 2348.
- ZHU, J. & WINANS, S. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 1507.
- ZHU, X. F., THIAM, S., VALLE, B. C. & WARNER, I. M. (2002). A colloidal graphite-coated emitter for sheathless capillary electrophoresis/nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **74**: 5405.





## Anhang A

### Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Sämtliche Lösungsmittel, organischen Säuren, Ammoniaklösung sowie die anorganischen Salze, Laugen und Säuren wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit (p. a.) von Merck (Darmstadt); Cholsäure, Deoxycholsäure und SDS von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Das Butylacrylat-/Butylmethacrylat-/Methacrylat-Kopolymer (BBMA) wurde durch Prof. Shigeru Terabe (Himeji Institute of Technology, Japan) zur Verfügung gestellt, dem an dieser Stelle hierfür gedankt sei. Die Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Von allen analytischen Standards (vgl. auch Abschnitt D; Fluka, Taufkirchen) wurden 1 mg/ml (Einzelstandards) bzw 100 µg/ml Stammlösungen (Standardmischungen) hergestellt. In den Untersuchungen mit Nano-LC/MS (Abschnitt 3.3) wurde bei Raumtemperatur nach bereits wenigen Tagen Methanolyse festgestellt; die Stammlösungen wurden daher bei –20 °C gelagert und erst unmittelbar vor den Untersuchungen auf die gewünschte Konzentration verdünnt (50% Methanol für die CZE/MS; 5% Acetonitril in 0,1% Ameisensäure bzw. Wasser für die Nano-LC).

Wasser wurde in doppelt destillierter bzw. deionisierter Form (18,2 MΩ) verwendet (Westdeutsche Quarzschmelze, Geesthacht/Milli-Q; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Zwischen beiden Aufreinigungsmethoden konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

In allen Experimenten wurde auf standardmäßig verfügbare Laborgeräte (Zentrifugen, Inkubatoren, Rüttler, Trockenschränke, Ultraschallbäder, Vakuumpumpen etc.) zurückgegriffen. Sofern für eine bestimmte Methode ein spezielles Gerät benötigt wurde, ist dieses in der jeweiligen Versuchsbeschreibung angegeben.



## Anhang B

### Analytische Techniken

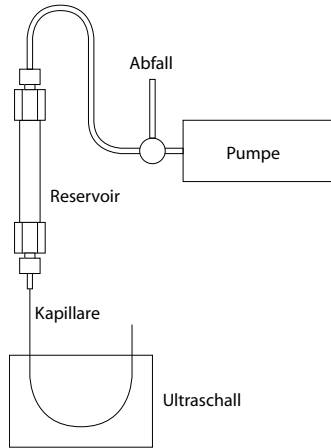
Die nachfolgenden Abschnitte geben die jeweils verwendeten Standard-Analysebedingungen wieder (Abweichungen und Optimierungen sind im Text des jeweiligen Abschnittes und/oder den Abbildungsunterschriften angeführt).

#### B1 Massenspektrometrie

Für die Kopplung von LC/MS und CE/MS wurde eine LCQ Duo-Ionenfalle (ThermoQuest, San José, USA) verwendet; die Optimierung der ESI-Ionenquelle ist in Abschnitt 3.1 dargestellt. FTMS-Versuche wurden an einem modifizierten 7 T-Instrument (Apex 3, Bruker Daltonik, Bremen) mit einer Standardionenquelle (Apollo) vorgenommen. Die Messung der Testlösungen (in 50% Methanol und 0,1% Ameisensäure) erfolgte in Direktinfusion mit 2 µl/min. Die Auswertung der Spektren erfolgte am PC mit Xcalibur (Ionenfalle: v1.3, ThermoQuest und Nachfolger, San José, USA), ChemStation (GC/MS: vB.02.05, Hewlett-Packard) und DataAnalysis 3.2 (FTICR: Bruker Daltonik, Bremen).

#### B2 Nano-LC/MS

Für die Packung der Säulen (50-100 µm Innendurchmesser, *fused silica*, Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA) wurde eine Füllstation auf Basis einer Series 200 (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) HPLC-Pumpe verwendet (Abbildung B1). Die Messung mit Nano-LC erfolgte standardmäßig mit 20 cm/75 µm-Kapillaren (5 µm Hypersil ODS: GROM, Rottenburg-Hailfingen; versuchsweise auch 4 µm Superspher ODS *endcapped* oder 4 µm Superspher ODS *non-endcapped*: Merck, Darmstadt), die entsprechend Abschnitt 3.3.1 bzw. Abschnitt 3.3.7 hergestellt wurden. Die Säulen (Gesamtlänge 30 cm) wurden mit einem Ende direkt mit einem VICI (Pfäffikon, Schweiz) CN2-Mikroventil (zur Injektion von 1 µl) verbunden, das entgegengesetzte Ende wurde direkt in das jeweils verwendete ESI-Interface geführt. Die mobile Phase (80% Methanol oder 60% Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure) wurde über eine Gilson (Middletown, Wisconsin, USA) 307-Pumpe mit 100-200 bar bereitgestellt und über einen 0,4 µm-Partikelfilter gereinigt. Die Ventilansteuerung erfolgte über das Massenspektrometer, die Anordnung ist in Abschnitt 3.1.1 dargestellt.



**Abbildung B1.** Füllstation zur Herstellung von HPLC-Kapillaren. Die Pumpe ist mit einer als Reservoir dienenden, geleerten HPLC-Kurzsaule (6 cm; 4,6 mm Innendurchmesser) verbunden, die ihrerseits auf einem Rüttler (Vortex Genie II; Bohemia, New York, USA) befestigt ist. Zur Verdichtung des Packungsmaterials dient Ultraschall.

### B3 CZE/MS und MEKC/MS

Die Messungen mit CZE/MS (Abschnitt 3.4) und MEKC/MS (Abschnitt 3.2) erfolgten mit einem P/ACE 5510-System (Beckman, Waldbronn), das im Verlauf der hier vorgestellten Arbeiten modifiziert wurde (Abschnitt 3.1.1).

In der MEKC/MS wurde die verwendete Kapillare vor Verwendung (und zu Beginn/Ende eines jeden Meßtages) 30 min mit 1 M Salzsäure (bei Anwendung von SDS) bzw. 0,1 M Natronlauge (bei Anwendung anderer Tenside) gespült, anschließend erfolgte jeweils ein Spülschritt mit (tensidfreiem) Puffer. Zwischen den Analysen wurden die jeweiligen Spülschritte auf 5 min reduziert. Nach Optimierung wurde als Micellarpuffer und Hintergrundelektrolyt 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,0 mit bzw. ohne 10 mM SDS verwendet. Die Injektion der Probe erfolgte 10 s bei 20 psi; die Teilfüllung der Kapillare mit Micellarpuffer (Berechnung über die Hagen-Poiseuille-Gleichung bei einer angenäherten Viskosität von 1) erfolgte zur Erzielung einer höheren Genauigkeit mit 0,5 psi. Als Trennungsspannung wurden 30 kV, als Ionisierungsspannung 5 kV (effektive Trennungsspannung 25 kV) eingestellt (Stromfluß in Standardpuffer ca. 12 µA). Die Kontaktflüssigkeit wurde über eine Hewlett-Packard 1100 (Palo Alto, USA) HPLC-Pumpe mit 1 µl/min bereitgestellt (50/49/1, v/v/v, Methanol/Wasser/Eisessig). Der Abstand zwischen Ionisierungsnadel und Eingang des Massenspektrometers (Oberfläche der Heizkapillare) wurde semisystematisch über die Stabilität des Taylor-Konus zu 5 mm optimiert.

Für die CZE/MS wichen folgende Parameter von der MEKC ab: Die Konditionierung

der Kapillare erfolgte durchweg mit 0,1 M Natronlauge (30 min/3 min, s. o.), die Trennung erfolgte in 20 mM Ammoniumcarbonat mit 10% 2-Propanol bei pH 9,2 und 15 kV Trenn- bzw. 4,2 kV Ionisierungsspannung. Als Kontaktflüssigkeit (4 µl/min) diente 50/50/0,5 (v/v/v) 2-Propanol/Wasser/Eisessig.

## B4 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Für die GC/MS-Analytik wurde ein Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) 6890-Gaschromatograph mit einem massenselektiven Detektor (Hewlett-Packard 5973, Quadrupol) verwendet. Zur Gerätesteuerung und Datenakquisition diente ChemStation (vB.02.05, Hewlett-Packard). Die Probenaufgabe erfolgte im Split-Modus (150:1) auf eine HP-5 MS-Kapillarsäule (30 m, 250 µm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke: Ph/Me-Siloxan). Als Trägergas diente hochreines Helium (99,999%, 0,8 ml/min). Das Temperaturprogramm wurde im Rahmen der Methodenoptimierung angepaßt (Abschnitt 3.5), die Temperatur der Transferleitung wurde auf 200 °C eingestellt. Die Ionisierung erfolgte mit 70 eV, und einem Emissionsstrom von 500 mA. Die Quadrupoltemperatur betrug 150 °C, die Temperatur der Ionenquelle 230 °C. Die Detektion erfolgte im *full scan* ( $m/z$  15-800) und im *single ion monitoring* (SIM,  $m/z$  143). Die Simulation der Fragmentierungsreaktionen erfolgte mit Mass Frontier (v1.0, HighChem, Bratislava).

## B5 NMR-Spektroskopie

NMR-Messungen wurden an den Modellanalyten C4-HSL, C8-HSL und C14-HSL durchgeführt. Die kristallinen Standards wurden in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol-*d*<sub>6</sub> und D<sub>2</sub>O (C4-HSL, C8-HSL) oder in absolutem Methanol-*d*<sub>6</sub> (C14-HSL) mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml gelöst. Komplementäre Messungen wurden jeweils vor und 90 s (Minimale Zeit zum Austausch der Probe) nach der Zugabe von 1/10 Volumen 1 N NaOD durchgeführt; zusätzliche Spektren wurden nach anschließendem Ansäuern (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 1) und nach 96 h Inkubation bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die Spektren wurden bei 303 K mit einem Bruker (Rheinstetten) DMX 500 NMR Spektrometer bei 500,13 MHz Protonenfrequenz und unter Verwendung eines 5 mm-Breitbandprobenkopfes mit inverser Geometrie und einer aktiv abgeschirmten *z*-Gradientenspule ( $90^\circ(^1\text{H}) = 7,3/9,8 \mu\text{s}$  CD<sub>3</sub>OD/0,1 M NaOD;  $90^\circ(^{13}\text{C}) = 21,5 \mu\text{s}$ ) aufgenommen. Die eindimensionalen <sup>1</sup>H Spektren (Akquisition 5,23 s, Relaxationsverzögerung 0,1 s, exponentielle Linienverbreiterung 0,3 Hz) wurden mit 20-90-Grad-Pulsen und Lösungsmittelunterdrückung (0,1 N NaOD) mit dem ersten Inkrement der *presat*-NOESY-Sequenz (Mischzeit 0 ms) aufgezeichnet.

Die HSQC-Spektren (F2 (<sup>1</sup>H): Akquisitionszeit 341 ms bei einer Spektrenbreite von 3000 Hz, Kopplungskonstante  $^1J(\text{CH}) = 150 \text{ Hz}$ , Relaxationsverzögerung 1,169 s, Anzahl an Scans 4-16; F1 (<sup>13</sup>C): Spektrenbreite 11319 Hz (90 ppm), 256 Inkremente) wurden entkoppelt [<sup>13</sup>C: GARP (70µs)] und mit einer 2048 × 512-Matrix mit typischen Fensterfunktionen in F2 (em: 3 Hz) und einer verschobenen Glockenkurve ( $\pi/4$ ) in F1

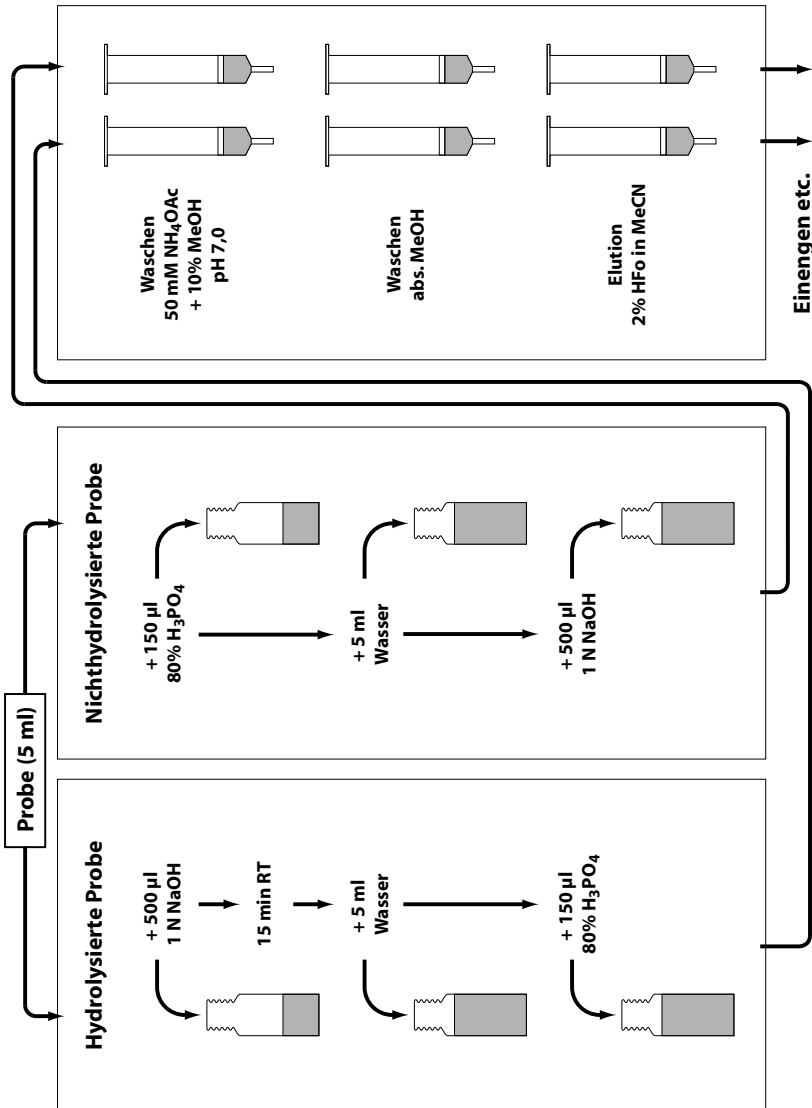
verrechnet. Gradienten- (Länge 1 ms; Recovery 450  $\mu$ s), aber nicht sensitivitätsverbesserte Sequenzen wurden für alle indirekt detektierten Spektren verwendet. Die COSY-Spektren (Akquisitionszeit 682 ms bei einer Spektrenbreite von 3000 Hz;  $4096 \times 256$ -512-Matrix) wurden mit einer quadrierten Sinusfunktion in F2 und F1 gerechnet. Die Spektren wurden auf Methanol-*d*<sub>6</sub> (3,30/49,00 ppm) oder (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>SiCD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>COONa normiert ( $\delta$ (<sup>1</sup>H) = -0,14 ppm; 0,1 N NaOD).

## B6 Extraktion von Homoserinen durch Anionenaustauscher-SPE

Für die Extraktion und die anschließende kapillarelektrophoretische Bestimmung wurde der interne Standard C7-HSL (bzw. sein Hydrolyseprodukt) verwendet. Zur Herstellung des hydrolysierten Standards wurde (entsprechend der Befunde der NMR-Messungen, vgl. Abschnitt 3.4.2) eine Lösung von 1 mg/ml C7-HSL in Methanol mit 400  $\mu$ l Wasser und 100  $\mu$ l 1 M NaOH versetzt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Das Hydrolysat wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 50  $\mu$ g/ml eingestellt. Der interne Standard ist bei Raumtemperatur mindestens drei Tage haltbar, wurde aber jeweils frisch angesetzt. Zur Aufreinigung wurden Waters (Eschborn) Oasis MAX *mixed mode*-Anionenaustauschersäulen (3 ml) verwendet. Die Säulen wurde nacheinander mit 1 Volumen Methanol und 1 Volumen Wasser konditioniert. Nach Optimierung wie in Abschnitt 3.4.3 dargestellt wurden die Proben entsprechend folgendem Protokoll extrahiert (vgl. Abbildung B2):

1. Für die Bestimmung von Homoserinlactonen und in der Probe bereits vorhandenen Homoserinen *zusammen* (Summenparameter; in der Folge »hydrolysierte Probe«) wurden 5 ml Kulturüberstand mit 500  $\mu$ l 1 M NaOH versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die hydrolysierte Probe wurde mit 5 ml Wasser verdünnt und mit 150  $\mu$ l 85% Phosphorsäure auf einen pH von 1,5 angesäuert.
2. Für die Bestimmung der in der Probe bereits vorhandenen Homoserine (ohne Lactone; in der Folge: »nichthydrolysierte Probe«) wurde analog zu 1. verfahren, allerdings wurde hier zuerst angesäuert und erst anschließend NaOH zugegeben, um den pH durchgängig im Sauren zu halten (und damit eine Hydrolyse zu unterdrücken), die Matrixkonzentration jedoch vergleichbar zu halten.

In beiden Fällen erfolgte die Zugabe des internen Standards unmittelbar vor der Extraktion (0,5  $\mu$ g/ml). Die Probe wurde auf die konditionierte Säule appliziert; anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 1 Volumen 50 mM Ammoniumacetat (pH 7,0) in 10% Methanol um eine Dissoziation der Carboxylgruppen zu erreichen und die Analyten an der Säule zu fixieren. Neutrale Spezies wurden mit 1 Volumen Methanol ausgewaschen. Die Elution erfolgte mit 2% Ameisensäure in Acetonitril (5 ml). Das Eluat wurde unter Stickstoff bis zur Trockne eingengt und mit 500  $\mu$ l 50% Methanol unmittelbar vor der Messung rekonstituiert. Wie aus den Ergebnissen der NMR-Messungen in Schwefelsäure abzuleiten war, ist bei kurzzeitigem Kontakt mit Ameisensäure keine Rückreaktion (Säure zu Lacton) zu erwarten.



**Abbildung B2.** Schema der Hydrolyse von HSL und der Anionenaustauscher-SPE-Extraktion für die Bestimmung von Homoserinlactonen und in der Probe bereits vorhandenen Homoserinen *zusammen* (Summenparameter, »hydrolysierte Probe«) und die Bestimmung der in der Probe bereits vorhandenen Homoserine (ohne Lactone, »nichthydrolysierte Probe«). Die Zugabe des internen Standards (0,5 µg/ml C7-HS) erfolgt vor der Extraktion. Zu Details vgl. Text.





## Anhang C

### Mikrobiologische Techniken

#### C1 **Verwendete Stämme und Kulturbedingungen**

Die jeweils verwendeten Bakterienstämme (*Burkholderia cepacia* und verwandte Bodenmikroorganismen) wurden durch vorangegangene Arbeiten bereits hinreichend gut taxonomisch und metabolisch charakterisiert (ALBRECHT, 2002; HAI, 2002). Glycerinkulturen der verwendeten Isolate wurden auf NB-Agar vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden in NB-Flüssigmedium transferiert und im Regelfall bis zu einer optischen Dichte von 1 (CE 3021; Cecil, Cambridge, UK) in Schüttelkultur kultiviert (Ausnahmen sind in den jeweiligen Abschnitten angegeben). Für die anschließende Extraktion der HSL und HS wurden die Kulturüberstände verwendet. Hierzu wurden die Kulturen mit 5000 U/min 40 min zentrifugiert (Varifuge 3.2 RS; Heraeus, München).

#### C2 **Dichlormethanextraktion**

Die Kulturüberstände wurden 2× mit jeweils 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden nach Trocknung mit Magnesiumsulfat gefiltert (Whatman 3 MM-Papier: Whatman, Maidstone, Großbritannien) und bei 42 °C einrotiert. Die Rückstände wurden unmittelbar vor den Analysen mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel aufgenommen.



## Anhang D

### Untersuchte Verbindungen

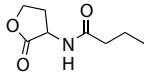
In den Tabellen D2 bis D7 sind Strukturen der untersuchten Analyten (kommerziell erhältliche Standards: Fluka, Taufkirchen) und von Modellverbindungen dargestellt. Letztere wurden zur Berechnung der erforderlichen analytischen Parameter herangezogen und kommen teilweise in der Natur nicht vor (zu Details vgl. Tabellen 1.2 und 1.3). Die Abbildung D1 gibt einen Überblick über die berechneten LogP-Werte der Lactone und ihrer Hydrolyseprodukte (Homoserine). In Tabelle D1 sind die  $m/z$ -Werte der Quasimolekülonen in der ESI dargestellt.

**Tabelle D1.**  $m/z$ -Werte der Homoserine und ihrer Hydrolyseprodukte in der ESI:  $[M+H]^+$ . Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Homoserine ist in der Regel auch der Lactoneak (obere Tabelle) zu detektieren (vgl. Abschnitt 3.4.4).

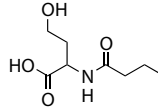
Seitenkette	HSL	OH-HSL	O-HSL	N:1-HSL	OH-N:1-HSL	O-N:1-HSL
<b>C4</b>	172	188	186	170	188	184
<b>C6</b>	200	216	214	198	216	212
<b>C7</b>	214	230	228	212	230	226
<b>C8</b>	228	244	242	226	244	240
<b>C10</b>	256	272	270	254	272	268
<b>C12</b>	284	300	298	282	300	296
<b>C14</b>	312	328	326	310	328	324
<b>C16</b>	340	356	354	338	356	352
<b>C18</b>	368	384	382	366	384	380

Seitenkette	HS	OH-HS	O-HS	N:1-HS	OH-N:1-HS	O-N:1-HS
<b>C4</b>	190	206	204	188	206	202
<b>C6</b>	218	234	232	216	234	230
<b>C7</b>	232	248	246	230	248	244
<b>C8</b>	246	262	260	244	262	258
<b>C10</b>	274	290	288	272	290	286
<b>C12</b>	302	318	316	300	318	314
<b>C14</b>	330	346	344	328	346	342
<b>C16</b>	358	374	372	356	374	370
<b>C18</b>	386	402	400	384	402	398

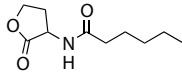
**Tabelle D2.** Untersuchte Standards (unsubstituierte, gesättigte *N*-Acyl-Homoserinlactone), ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



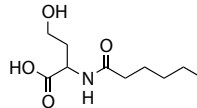
*N*-Butanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C4-HSL**



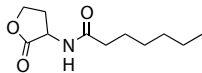
*N*-Butanoyl-D/L-Homoserin  
**C4-HS**



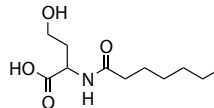
*N*-Hexanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C6-HSL**



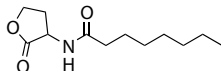
*N*-Hexanoyl-D/L-Homoserin  
**C6-HS**



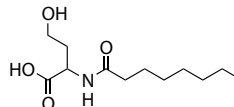
*N*-Heptanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C7-HSL**



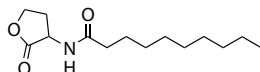
*N*-Heptanoyl-D/L-Homoserin  
**C7-HS**



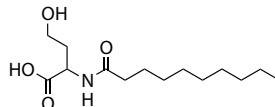
*N*-Octanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C8-HSL**



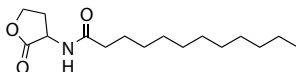
*N*-Octanoyl-D/L-Homoserin  
**C8-HS**



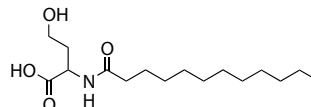
*N*-Decanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C10-HSL**



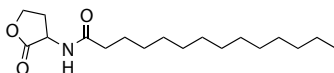
*N*-Decanoyl-D/L-Homoserin  
**C10-HS**



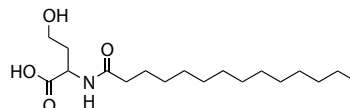
*N*-Dodecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C12-HSL**



*N*-Dodecanoyl-D/L-Homoserin  
**C12-HS**

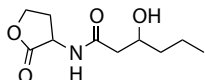


*N*-Tetradecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C14-HSL**

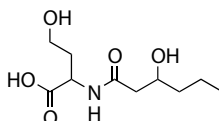


*N*-Tetradecanoyl-D/L-Homoserin  
**C14-HS**

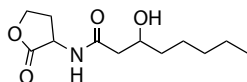
**Tabelle D3.** 3-Hydroxy-*N*-Acyl-Homoserinlactone, ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



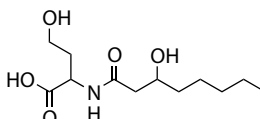
3-Hydroxy-*N*-Hexanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C6-HSL**



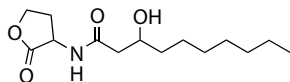
3-Hydroxy-*N*-Hexanoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C6-HS**



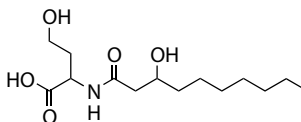
3-Hydroxy-*N*-Octanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C8-HSL**



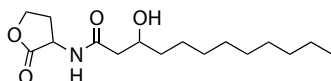
3-Hydroxy-*N*-Octanoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C8-HS**



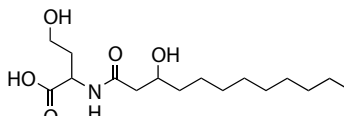
3-Hydroxy-*N*-Decanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C10-HSL**



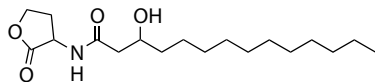
3-Hydroxy-*N*-Decanoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C10-HS**



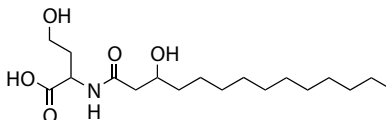
3-Hydroxy-*N*-Dodecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C12-HSL**



3-Hydroxy-*N*-Dodecanoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C12-HS**

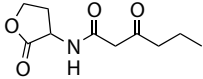


3-Hydroxy-*N*-Tetradecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C14-HSL**

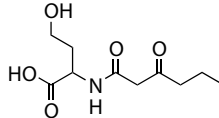


3-Hydroxy-*N*-Tetradecanoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C14-HS**

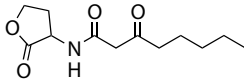
**Tabelle D4.** 3-oxo-N-Acyl-Homoserinlactone, ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



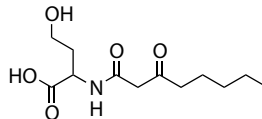
3-oxo-N-Hexanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C6-HSL**



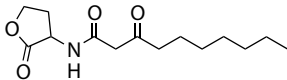
3-oxo-N-Hexanoyl-D/L-Homoserin  
**O-C6-HS**



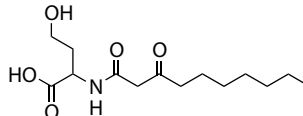
3-oxo-N-Octanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C8-HSL**



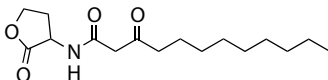
3-oxo-N-Octanoyl-D/L-Homoserin  
**O-C8-HS**



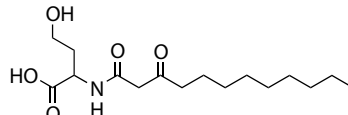
3-oxo-N-Decanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C10-HSL**



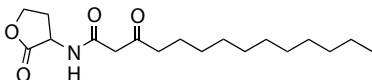
3-oxo-N-Decanoyl-D/L-Homoserin  
**O-C10-HS**



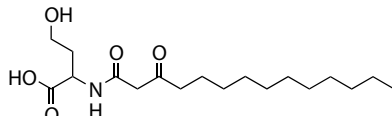
3-oxo-N-Dodecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C12-HSL**



3-oxo-N-Dodecanoyl-D/L-Homoserin  
**O-C12-HS**

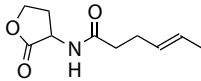


3-oxo-N-Tetradecanoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C14-HSL**

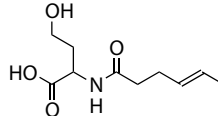


3-oxo-N-Tetradecanoyl-D/L-Homoserin  
**O-C14-HS**

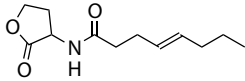
**Tabelle D5.** Einfach ungesättigte *N*-Acyl-Homoserinlactone, ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



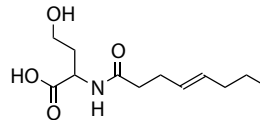
*N*-Hexenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C6:1-HSL**



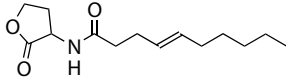
*N*-Hexenoyl-D/L-Homoserin  
**C6:1-HS**



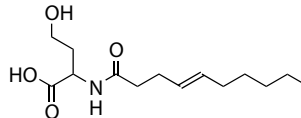
*N*-Octenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C8:1-HSL**



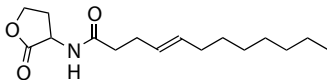
*N*-Octenoyl-D/L-Homoserin  
**C8:1-HS**



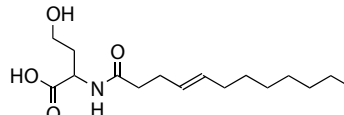
*N*-Decenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C10:1-HSL**



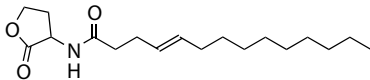
*N*-Decenoyl-D/L-Homoserin  
**C10:1-HS**



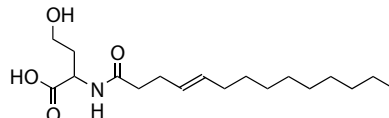
*N*-Dodecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C12:1-HSL**



*N*-Dodecenoyl-D/L-Homoserin  
**C12:1-HS**

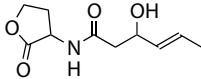


*N*-Tetradecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**C14:1-HSL**

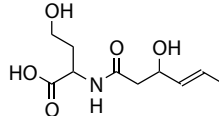


*N*-Tetradecenoyl-D/L-Homoserin  
**C14:1-HS**

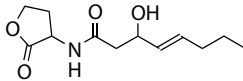
**Tabelle D6.** Einfach ungesättigte 3-hydroxy-N-Acyl-Homoserinlactone, ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



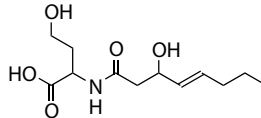
3-Hydroxy-N-Hexenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C6:1-HSL**



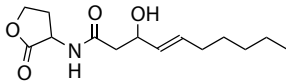
3-Hydroxy-N-Hexenoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C6:1-HS**



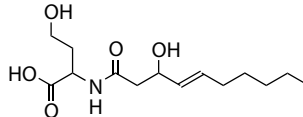
3-Hydroxy-N-Octenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C8:1-HSL**



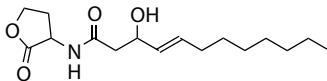
3-Hydroxy-N-Octenoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C8:1-HS**



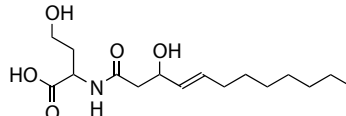
3-Hydroxy-N-Decenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C10:1-HSL**



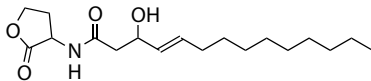
3-Hydroxy-N-Decenoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C10:1-HS**



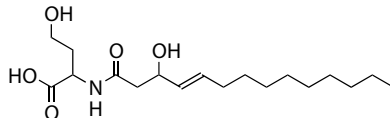
3-Hydroxy-N-Dodecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C12:1-HSL**



3-Hydroxy-N-Dodecenoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C12:1-HS**



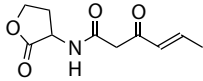
3-Hydroxy-N-Tetradecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**OH-C14:1-HSL**



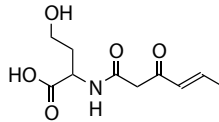
3-Hydroxy-N-Tetradecenoyl-D/L-Homoserin  
**OH-C14:1-HS**



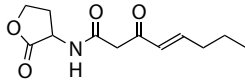
**Tabelle D7.** Einfach ungesättigte 3-oxo-N-Acyl-Homoserinlactone, ihre Hydrolyseprodukte (Homoserine) und verwendete Kurzbezeichnungen.



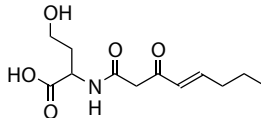
3-oxo-N-Hexenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C6:1-HSL**



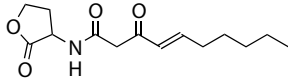
3-oxo-N-Hexenoyl-D/L-Homoserin  
**O-C6:1-HS**



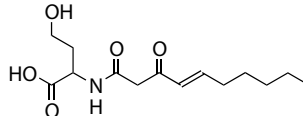
3-oxo-N-Octenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C8:1-HSL**



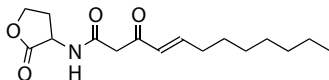
3-oxo-N-Octenoyl-D/L-Homoserin  
**O-C8:1-HS**



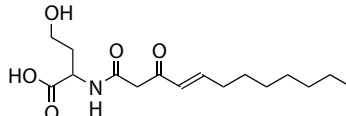
3-oxo-N-Decenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C10:1-HSL**



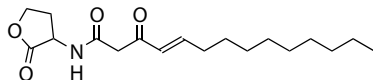
3-oxo-N-Decenoyl-D/L-Homoserin  
**O-C10:1-HS**



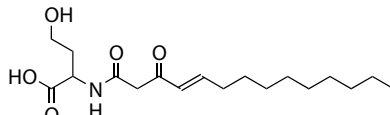
3-oxo-N-Dodecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C12:1-HSL**



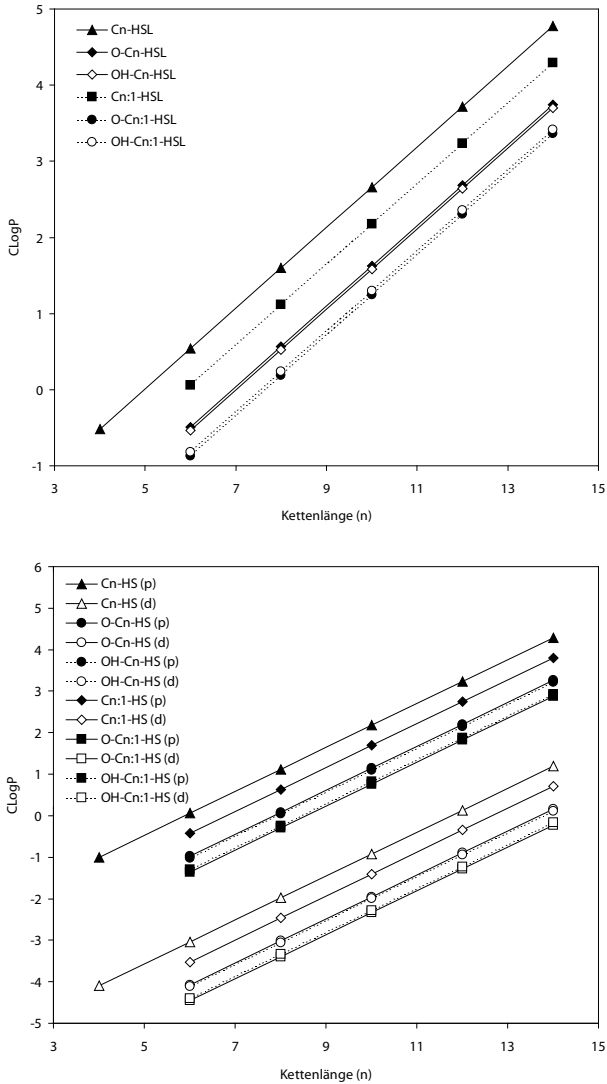
3-oxo-N-Dodecenoyl-D/L-Homoserin  
**O-C12:1-HS**



3-oxo-N-Tetradecenoyl-D/L-Homoserinlacton  
**O-C14:1-HSL**



3-oxo-N-Tetradecenoyl-D/L-Homoserin  
**O-C14:1-HS**



**Abbildung D1. Oben:** theoretische LogP-Werte der in den Tabellen D2 bis D7 dargestellten Lactone in Abhängigkeit von der Kettenlänge  $n$ . **Unten:** theoretische LogP-Werte der in den Tabellen D2 bis D7 dargestellten Hydrolyseprodukte (Homoserine) in protoniertem (p) und dissoziiertem (d) Zustand (CLogP, ChemOffice v6.0) in Abhängigkeit von der Kettenlänge  $n$ .

## Anhang E

### Literaturübersicht

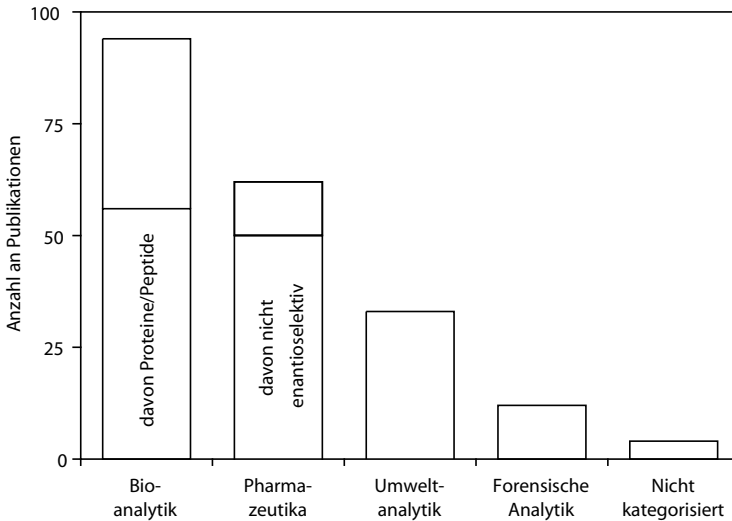
### Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie

Die Tabellen E3 bis E11 fassen die Ergebnisse einer umfangreichen Literaturrecherche bis März 2003 zusammen (vgl. SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003): Die verfügbaren Online-Datenbanken (Einzelverlage und das ISI Web of Science) wurden mit den Suchbegriffen »capillary electrophoresis« und »mass spectrometry« abgefragt. Aus den ca. 1 700 erhaltenen Einträgen wurden lediglich die Artikel zu online-CE/MS-Kopplungen berücksichtigt (CE/ICP-MS- und MALDI-Applikationen wurden aussortiert). Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über wichtige Übersichtsartikel (Tabelle E1), methodologische (Tabelle E2), und anwendungsbezogene Publikationen (Tabellen E3 bis E11).

Die verfügbaren Artikel der letzten Gruppe wurden kategorisiert und in die Themen Bioanalytik (»Life Science«), pharmazeutische Analytik, Umweltanalytik und forensische Anwendungen unterteilt. Abbildung E1 faßt die Ergebnisse zusammen. Der zahlenmäßig bedeutendste Sektor ist erwartungsgemäß die Bioanalytik, und hierunter die Analyse von Proteinen und Peptiden. Chirale Trennungen finden sich beinahe ausschließlich im pharmazeutischen Sektor, allerdings spielen sie auch hier nur eine untergeordnete Rolle. Wenn, wie im Arzneimittelbereich, Konzentrationen von geringerer Bedeutung sind, wird hier wohl eher auf klassische und etablierte Methoden mit CE/UV anstelle der möglicherweise problembehafteten CE/MS zurückgegriffen.

Die chronologische Entwicklung der CE/MS-Anwendungen (Abbildung E2) zeigt einen rapiden Anstieg in der Anzahl von Publikationen von 1997 bis 1998, für den fast ausschließlich der bioanalytische Sektor verantwortlich ist. Nach nur einem Jahr des Booms erfolgt ein deutlicher Einbruch, der jedoch teilweise durch die gestiegene Anzahl an Publikationen im pharmazeutischen Bereich kompensiert wird. Insgesamt bleibt die Anzahl an CE/MS-Applikationen während der letzten Jahre niedrig, aber konstant. Vorläufige Daten für die Folgejahre scheinen diesen Trend zu bestätigen.

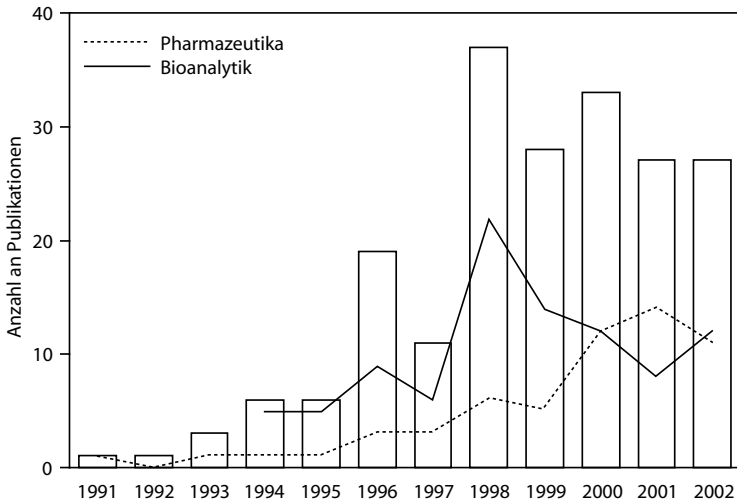
Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und ihre Modifikationen (wie unterschiedliche Aufkonzentrierungstechniken) ist der bei weitem am häufigsten verwendete CE-Modus bei der Kopplung an die Massenspektrometrie (77% der veröffentlichten Anwendungen), was auf die relativ unproblematische Realisierung und die geringeren Störeinflüsse zurückgeführt werden kann. Es folgen die nichtwäßrige Kapillarelektrophorese (NACE, 7%) und unterschiedliche chirale Trenntechniken (6%). Alle anderen Modi zusammen (unter anderem CIEF, MEKC und ihre Varianten, TCITP usw., vgl. Legende zu Tabelle E3) spielen nur eine untergeordnete Rolle.



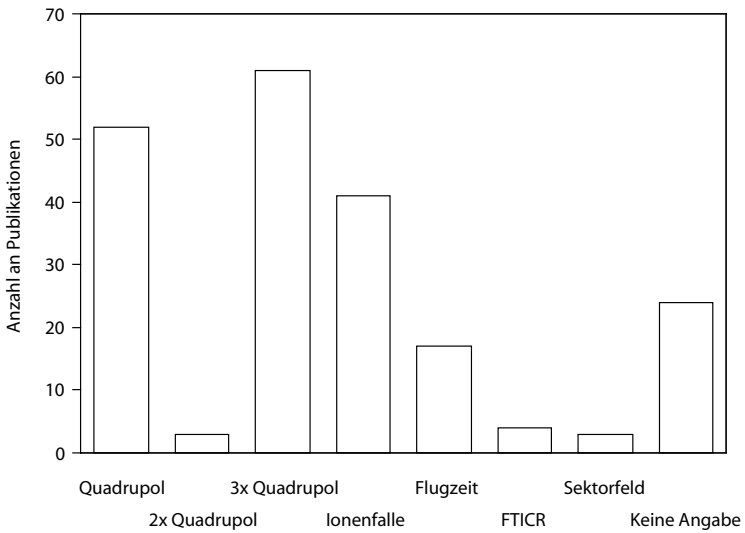
**Abbildung E1.** Übersicht über Applikationen in der CE/MS bis zum Jahr 2003 (kategorisiert).

Alle Anwendungsartikel verwenden die Elektrosprayionisierung (ESI, MALDI-Techniken wurden für die Recherche nicht berücksichtigt), obwohl diese oftmals unterschiedlich benannt wird (MicroIonspray, API/make-up-flow etc.). Das am häufigsten realisierte Kopplungsprinzip ist die Koaxialflüssigkeit (79%), gefolgt von flüssigkeitslosen Systemen (11%). Für den Rest erfolgte meist keine Angabe; eine der ältesten ESI-Typen, die Flüssigkeitsbrücke, spielt kaum noch eine Rolle (2%). Gründe hierfür sind wohl nicht nur in der höheren Robustheit von Systemen mit Koaxialflüssigkeit, sondern auch in der vorhandenen Laborausstattung (z. B. LC/MS-Systeme), die für die CE/MS mitbenutzt wird.

Die verwendeten Massenspektrometertypen sind der Vollständigkeit halber aufgeführt (Abbildung E3): In den wenigsten Fällen wird ein Massenspektrometer ausschließlich für die CE/MS beschafft werden; die vorgefundenen Typen spiegeln auch hier wohl eher die »übliche« Laborausstattung wider. Die Daten zeigen eine klare Dominanz der unterschiedlichen Quadrupolgeräte, gefolgt von der Ionenfalle. Sowohl ältere (wie Sektorfeldgeräte), als auch neuere Entwicklungen (wie FTICR) sind in geringerem Umfang vorzufinden. Flugzeit-Massenspektrometer (TOF) werden in der Regel mit MALDI-Ionisierung genutzt - CE/ESI-TOF ist vergleichsweise selten anzutreffen.



**Abbildung E2.** Übersicht über Applikationen in der CE/MS bis zum Jahr 2003 (chronologische Entwicklung).



**Abbildung E3.** Übersicht über in der CE/MS bis zum Jahr 2003 verwendete Massenspektrometer.

Tabelle E1. Wichtige Übersichtsartikel zur Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie (SCHMITT-KOPPLIN &amp; FROMMBERGER, 2003).

Jahr	Thema	Referenz
1989	Neuentwicklungen	EDMONDS <i>et al.</i> (1989)
1993	CE/MS	NIESEN <i>et al.</i> (1993)
1995	(Online-) Aufkonzentrierung, Mikroreakorttechnologie	TOMLINSON & NAYLOR (1995)
1996	CE/MS	SMITH <i>et al.</i> (1996)
1997	CE in Metabolismusstudien	NAYLOR & TOMLINSON (1996)
1997	Kopplung von CE und LC an MALDI-MS	MURRAY (1997)
1997	Neuentwicklungen	BANKS (1997)
1998	Affinitäts-CE/MS und Kombinatorische Bibliotheken	CHENG & CHU (1998)
1998	Protein- und Peptidanalytik durch CE/MS <sup>2</sup>	FIGEYS <i>et al.</i> (1998a)
1998	Anwendungen der nichtwässrigen CE	BJORNSDOTTIR <i>et al.</i> (1998)
1998	Kopplung der CE an IT-reTOF-MS	WU <i>et al.</i> (1998)
1999	Volatile Puffer für CE/MS, Beschichtung mit Polystyrol-Nanopartikeln	HUBER & PREMSTALLER (1999)
1999	CE/MS-Anwendungen für Arzneimittel aus biologischen Flüssigkeiten	HOPFGARTNER <i>et al.</i> (1999)
2000	CEC/MS	CHOUDHARY <i>et al.</i> (2000)
2000	ESI/FTICR-MS	SMITH (2000b)
2000	Enantiomertrennungen bei Arzneimitteln	BLASCHKE & CHANKVETADZE (2000)
2000	CEC/MS für die Untersuchung von PAH-DNA-Addukten	DING & VOURES (2000)
2000	Kopplung von linearen und planaren Trennungen an MALDI/MS	GUSEV (2000)
2001	(Online-) Aufkonzentrierung, Mikroreakorttechnologie	GUZMAN & STUBBS (2001)
2001	CE-Analytik von Venomen und Toxinen	WEINBERGER (2001)
2001	Neuentwicklungen	VON BROCKE <i>et al.</i> (2001)
2002	Neuentwicklungen in der Kopplung von CE und LC an MALDI-MS	GELPI (2002)
2002	Miniaturisierung in der Proteomik	SHAMSI (2002)
2002	Mehrdimensionale Trennungen in der Proteomik	LIU <i>et al.</i> (2002)
2002	35 Jahre CE	ISSAQ (2002)

Tabelle E1 (Fortsetzung)

Jahr	Thema	Referenz
	CE und CE/MS von Alkaloiden	STOCKIGT <i>et al.</i> (2002)
	Detektionstechnik in der NACE	MATYSIK (2002)
	Affinitäts- und Bioaffinitäts-CE	VOLLMERHAUS <i>et al.</i> (2002)
	Kopplung und Miniaturisierung mit MALDI	FORET & PREISLER (2002 <i>b</i> )
	CE/MS-Anwendungen in biologischen Mischungen	MOINI <i>et al.</i> (2002)
	CE-Anwendungen für Biopolymere	HU & DOVICHI (2002)
	CE/MS für chirale Trennungen	LAURELL & MARKO-VARGA (2002)

Tabelle E2. Historische Entwicklung der Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie: **Fettdruck** kennzeichnet das jeweilige Erstzitat, bedeutende Neuerungen in *Kursiv* (SCHWITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003).

Jahr	Thema	Analyten	Referenz
1987	Erste Beschreibung einer CZE/MS-Kopplung	Quaternäre Ammoniumsalze	OLIVARES <i>et al.</i> (1987)
1988	Interface für CZE/MS, Silberbeschichtung	Peptide	SMITH <i>et al.</i> (1988 <i>b</i> )
	Ionisierung mit Koaxialflüssigkeit	Diphenyllessigsäure, SDS, Amine	SMITH <i>et al.</i> (1988 <i>a</i> )
1989	Ionisierung mit Koaxialflüssigkeit	Quaternäre Phosphoniumsalze	SMITH <i>et al.</i> (1989)
	CITP-ESI-MS	Ammoniumsalze, Dopamin	UDSETH <i>et al.</i> (1989)
1990	Sensitivitätssteigerung (niedrigere Flußraten: CITP, CZE)	Cytochrom c	SMITH <i>et al.</i> (1990 <i>b</i> )
	Statische und <i>scanning array</i> -CF-FAB-MS-Detektion für CE	Peptide	REINHOUD <i>et al.</i> (1990)
1991	Kopplung eines kommerziellen CE-Systems (Beckman P/ACE 2000)	Proteine	SMITH <i>et al.</i> (1991)
	Kopplung an <i>IonSpray</i> -API-MS	Proteine	JOHANSSON <i>et al.</i> (1991)
	<b>Pseudo-Elektrochromatographie an CF-FAB-MS</b>	Nucleotide, Alkaloide	VERHEIJ <i>et al.</i> (1991)
	Vergleich Koaxialflüssigkeit/Flüssigkeitsbrücke	Antibiotika	PLEASANCE <i>et al.</i> (1992)
1992	CITP/ESI-MS	Anthracycline	REINHOUD <i>et al.</i> (1992)
	CZE und <i>offline</i> -MALDI-MS	Proteine	KEOUGH <i>et al.</i> (1992)
	Nachweisgrenzen in CE/MS (5 µm-Kapillaren, 600 amol)	Proteine	WAHL <i>et al.</i> (1992)
	<b>Gel-CE/ESI-MS</b>	Polyacrylsäuren, Peptide	GARCIA & HENION (1992)

Jahr	Thema	Analyten	Referenz
1993	CE/MALDI CE/FTICR-MS	Peptide, Endorphine	VAN VEELLEN <i>et al.</i> (1993)
1994	Umgekehrt-polare CE/MS (CTAC) Beschichtete Kapillaren für CE/MS CE/Magnetsektor-MS CE/FTICR-MS	Proteine Peptide Proteine Peptide, Venome, Hormone Peptide, Proteine	HOFSTADLER <i>et al.</i> (1993) VARGHESE & COLE (1993) COLE <i>et al.</i> (1994) PERKINS & TOMER (1994) HOFSTADLER <i>et al.</i> (1994)
1995	Analyten-Aufkonzentrierung für CE/MS <b>Online-Membranreicherung für CE/MS</b> Einfluß der Kapillardimensionen auf CE/MS MEKC/ESI-MS mit hochmolekularen Tensiden	Peptide, Proteine, Pharmazeutika Peptide Chimin, Phenyltrimethylammonium Proteine	TOMLINSON & NAYLOR (1995) TOMLINSON <i>et al.</i> (1995) TETLER <i>et al.</i> (1995) OZAKI <i>et al.</i> (1995a) SEEVERS <i>et al.</i> (1996b) LANE <i>et al.</i> (1996)
1996	CEC-ESI-MS Membranreicherung großer Volumen für CE/MS Selbstjustierende Flüssigkeitsbrücke für CE/ESI-MS Signalunterdrückung durch anionische Tenside in CE/ESI-MS <b>Einzelzellanalytik durch CE/FTICR-MS</b> <i>Metallbeschichtete Nadeln für ESI/MS</i> <i>Nachweisgrenzen in CE/MS (5 µm-Kapillaren, 600 amol)</i> Probennahmefehler ( <i>sheathless</i> CE/MS) CE/FTICR-MS	Peptide, Pharmazeutika β-Agonisten Peptide Erythrocyten Proteine Proteine	TOMLINSON <i>et al.</i> (1996) WACHS <i>et al.</i> (1996) RUNDLETT & ARMSTRONG (1996) HOFSTADLER <i>et al.</i> (1996a) VALASKOVIC <i>et al.</i> (1996) VALASKOVIC & MCLAFFERTY (1996a) VALASKOVIC & MCLAFFERTY (1996b) HOFSTADLER <i>et al.</i> (1996a) LANE <i>et al.</i> (1996)
1997	Kurzäulen-CEC/ESI-MS Rauschunterdrückung bei <i>IonSpray</i> -MS Säulenkonditionierung und ESI-Konfiguration CE/ESI-MS für niedrige Flüsse (CZE, CIEF) Mikrodialyse-Interface für CE/ESI-MS Faseroptische UV-Detektion an der ESI-Nadel Mikro-ESI mit Kondensationspartikelzählung Mikrodialysebrücke für CE/Mikroelektrospray-MS <b>Mikro-ESI-Interface für CE/TOF-MS</b>	Peptide, Proteine Proteine Proteine Peptide Aminosäuren, Proteine Benzolsulfonamide Enzephaline, Angiotensine	AEBI & HENION (1996) JOHNSON <i>et al.</i> (1996) KIRBY <i>et al.</i> (1996) SEEVERS <i>et al.</i> (1996b) FORET <i>et al.</i> (1996) LEWIS <i>et al.</i> (1996) SEEVERS & SMITH (1997) LAZAR <i>et al.</i> (1997a)

Tabelle E2 (Fortsetzung)



Tabelle E2 (Fortsetzung)

Jahr	Thema	Analyten	Referenz
	TOF-MS als Detektor für CE Laser-Verdampfungs/-Ionisierungs-Interface für CE/TOF-MS Online-SPE/CE/MS	Grammidin, Enzephaline Serotonin, Tryptamin Peptide	LAZAR <i>et al.</i> (1997b) CHANG & YEUNG (1997) FIGEYS <i>et al.</i> (1997)
	CE-Fraktionssammler für MALDI Elektrode in Kapillare für <i>sheathless</i> CE/ESI-MS <b>Affinitäts-CE/MS zur Epitopenkartierung</b>	Enzephaline Grammidin, Myoglobin Tryptischer $\beta$ -Endomorphinverdau	MCLEOD <i>et al.</i> (1997) CAO & MOINI (1997) LYUBARSKAYA <i>et al.</i> (1997)
<b>1998</b>	Membrananreicherung/transiente ITP/ESI-MS <b>3D-Darstellung für CE/TOF-MS</b> Online-SPE/CE/MS	Peptide Myelin Proteine Octylphenoethoxylat	SETTLAGE <i>et al.</i> (1998) Li <i>et al.</i> (1998) BARROSO & DE JONG (1998)
<b>1999</b>	Orthogonaler CE/ESI-Emitter <b>Zweidimensionales LC <math>\times</math> CE/MS-System</b> <b>Miniaturisierte Vorrichtung für CE/ESI-MS</b> Sensitivität (sub-Attomol) mit Chip- <i>nanospray</i> /TOF-MS Hochgeschwindigkeits-TOF-Detektion für CE IT-reTOF mit SWIFT-Technologie für CE CE/ESI-MS unter Druck Picoliter-Gefäße für Hochdurchsatz-TOF-MS Mikrofluß-Vorrichtung an CE/ESI-MS Effekt der Ionisierungsspannung auf den EOF Chrom-Goldbeschichtung für <i>sheathless</i> CE/ESI-MS <i>Sonic spray</i> -Interface für CE/MS Elektrochemie bei der ESI (CE/ <i>nanospray</i> -MS) CE an Tandem-Viersektor-MS Edelstahladeln für <i>sheathless</i> CE/MS Automatisierte SPE/CE/ESI-MS für Peptidanalytik Flüssigkeitslose Konfiguration des <i>Z-Spray</i> Flüssigkeitsbrücke für NACE/MS IEF/ESI-MS	Proteine Cytochrom c Cytochrom, Grammidin, Peptide Peptide Myelin Peptide, Carrageenane, Vitamin B1 Peptide, Proteine Aminosäuren Benzodiazepine Peptide, Proteine GABA, Dopamin Peptide, Nucleotide Peptide Fettsäuren, Prostaglandine Peptide Proteine, Peptide Pharmazeutika Myoglobin, Carboanhydrase	ALEXANDER <i>et al.</i> (1998) INGENDOH <i>et al.</i> (1999) ISSAQ <i>et al.</i> (1999) ZHANG <i>et al.</i> (1999) LAZAR & LEE (1999a) LAZAR & LEE (1999b) JIN <i>et al.</i> (1999) HAU & ROBERTS (1999) BRAUN <i>et al.</i> (1999) BINGS <i>et al.</i> (1999) LAZAR & LEE (1999a) BARNIDGE <i>et al.</i> (1999) HIRABAYASHI <i>et al.</i> (1999) BATEMAN (1999) DETERDING <i>et al.</i> (1999) PETERSON <i>et al.</i> (1999) FIGEYS & AEBERSOLD (1999) MCCOMB & PERREAULT (2000) JUSSILA <i>et al.</i> (2000) WEN <i>et al.</i> (2000)

Tabelle E2 (Fortsetzung)

Jahr	Thema	Analyten	Referenz
	Unterdruck-ESI-Interface für LC und CE/MS	Angiotensine	FORET <i>et al.</i> (2000)
	Graphitbeschichtung für <i>sheathless</i> CE/MS	Myoglobin	CHANG & HER (2000)
	Vakuumdeposition für CE/MALDI-TOF-MS	Peptide, Angiotensine	PREISLER <i>et al.</i> (2000)
	Microchip-CE/MS	Rhodamin, Peptide	LAZAR <i>et al.</i> (2000)
	Planare Elektroflamentdeposition nach CE-Trennung	Kitonrot, Eosin Y, Fluorescein	DEVAULT & SEPANIAK (2000)
	Microchip-CE mit elektrodlosem Nanospray-Interface	$\beta$ -Antagonisten	VROUWE <i>et al.</i> (2000)
	Wasserstoff-/Deuteriumaustausch in Koaxialflüssigkeit	Cimetidin, Propanolol, Atenolol	PALMER <i>et al.</i> (2000)
	Miniaturisierte CE/MS	Peptide, Proteine	ZHANG <i>et al.</i> (2000a)
	Miniaturisierte Vorrichtung für Hochdurchsatz-Proteomik	Proteine	LI <i>et al.</i> (2000)
	Mikrofluß-Chip (Polymer) für kleine Moleküle	Carnitin	KAMEOKA <i>et al.</i> (2001)
	Miniaturisierte <i>IonSpray</i> -Vorrichtung	Cytochrom c, Berberin	WACHS & HENION (2001)
	Automatisierte Probenahme von Mikrotiterplatten	Angiotensine, Proteine	ZHANG <i>et al.</i> (2001)
	<i>Sheathless</i> Interface für Online-Aufkonzentrierung	Gonadorelin, Angiotensine	WATERVAL <i>et al.</i> (2001)
	Graphitbeschichtete Ionisierungsadeln für <i>sheathless</i> CE/MS	Berberin, Coptisin, Palmatin	CHANG <i>et al.</i> (2001)
	Vorstrukturierte Probenplatten für CE/MALDI	Peptide, Proteine	JOHNSON <i>et al.</i> (2001)
	Graphitbeschichtung für <i>sheathless</i> ESI	Peptide	NILSSON <i>et al.</i> (2001)
	Redoxpuffer zur Kontrolle elektrochemischer Reaktionen	Cytochrom, Angiotensin	SMITH & MOINI (2001a)
	<i>Split-flow</i> -Interface für <i>sheathless</i> CE/MS	Cytochrom c, Angiotensin	MOINI (2001)
	Elektroneneinfang-Dissoziation für CE/ESI-FTICR	Proteine	TSYBIN <i>et al.</i> (2002)
	Routine- <i>online</i> -Aufkonzentrierung für CE/MS	Peptide, Proteine, Haloperidol	TOMLINSON & NAVLOR (1995)
	CE-Fraktionssammler aus miniaturisiertem Verbindungsstück	DNA-Fragmente	KHANDURINA & GUTTMAN (2002)
	Interface für NACE/MS (weiltumige Kapillaren)	Amphetamine	VARIO <i>et al.</i> (2002)
	<i>Ionisierungsadeln aus Edelstahl</i>	$\beta$ -Blocker, Peptide	ISHIHAMA <i>et al.</i> (2002b)
	CE/MALDI-TOF- und TOF-TOF-MS-Kopplung	BSA	REFJAR <i>et al.</i> (2002)
	Nickelbeschichtete Ionisierungsadeln für <i>sheathless</i> CE/MS	Imipraminanaloga	BENDAHL <i>et al.</i> (2002)
	Effekt von Gasflüssen auf CE/MS	Pharmazeutika	HUIKKO <i>et al.</i> (2002b)
	Hamard-Transformation-TOF-MS als Detektor für CE	Peptide	FERNANDEZ <i>et al.</i> (2002)
	Polymermaterial für <i>nanospray</i> -Ionisierungsadeln	Methionin, Enzephalin	WETTERHALL <i>et al.</i> (2002b)
	Kolloidale Graphitbeschichtung für <i>nanospray</i> -Ionisierungsadeln	Risperidon	ZHU <i>et al.</i> (2002)

Tabelle E2 (Fortsetzung)

Jahr	Thema	Analyten	Referenz
2003	APCI-Interface für CE/MS <i>Ionisierungsnadeln aus Edelstahl (unterschiedliche Geometrien)</i> Miniaturisierter proteolytischer Reaktor für Proteinverdau Niedrigfluß-Interface für CE/ESI-MS ( <i>sample stacking</i> , MEKC) Miniaturisierte Hohladeln für Nanospray	Reserpin, Pindolol u. a. Peptide Proteine Nitro- und Chlorphenole RNAse, Cytochrom c, Angiotensin	TANAKA <i>et al.</i> (2003) SHUI <i>et al.</i> (2003) COOPER <i>et al.</i> (2003) CHEN & HER (2003) SJODAHL <i>et al.</i> (2003)

**Tabelle E3.** Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der Bioanalytik (Proteine und Peptide). **Fußnoten:** 1. **ACE**, Affinitäts-CE; **CIEF**, Kapillarelektrophorese; **CZE**, Kapillarelektrophorese; **FASS**, *field amplified sample stacking*; **IMAC**, immobilisierte Metallaffinitätschromatographie; **KE**, Chiraler Selektor Kronenether; **(PF)-MEKC**, (*partial filling*-) Micellare Elektrokinetische Chromatographie; **MPC**, Membranretention; **NACE**, Nichtwässrige CE; **PVP**, Polyvinylpyrrolidon; **SPE**, Festphasenextraktion; **TITP**, Transiente Isotachophorese; **Vancomycin**, Chiraler Selektor Vancomycin. **2. Q**, Quadrupol; **2Q**, Tandem-Quadrupol; **3Q**, Dreifach-Quadrupol; **B**, Magnetfeld; **E**, Elektrisches Feld; **FSF**, Sektorfeld-MS; **FT**, Fourier Transform Ionenzyklotron-MS; **IT**, Ionenfalle; **(r)TOF**, (Reflektion-) Flugzeit-MS. **3. FB**, Flüssigkeitsbrücke; **IC**, Kapillarelektrode; **KF**, Koaxialflüssigkeit; **MD**, Mikrodialyse; **SL**, *sheathless*. Vergleiche auch SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER (2003).

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
ROSNACK <i>et al.</i> (1994)	Synthetische Peptide	CZE	3Q	KF
WAHL <i>et al.</i> (1994)	Cytochrom c-Verdau	CZE	3Q	SL
WEINMANN <i>et al.</i> (1994)	Proteinstandards	CZE	TOF	KF
BONFICHI <i>et al.</i> (1995)	Glykosylierte Proteine	CZE	3Q	KF
HUTTON & MAJOR (1995)	Proteinstandards	CZE	3Q	KF
BANKS JR. (1995)	Peptidmischungen, Cytochrom c-Verdau	CZE	Q	KF
KELLY <i>et al.</i> (1996)	Glykosylierte Proteine	CZE	3Q	KF
DUNAYEVSKIY <i>et al.</i> (1996)	Aminosäurebibliotheken	CZE	3Q	KF
MAJOR & ASHCROFT (1996)	Proteinstandards	CZE	3Q	KF
CHU <i>et al.</i> (1996)	d-Peptidbibliotheken	CZE	2Q	KF
TOMLINSON <i>et al.</i> (1996)	Isolierung, Sequenzierung von MHC I-Proteinen	Vancomycin	3Q	KF
VALASKOVIC <i>et al.</i> (1996)	Bovine und equine Proteine	MPC-CE	FT	

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
YEUNG <i>et al.</i> (1997)	Mannosehaltige Glycoproteine	CZE	Q	KF
HOITINK <i>et al.</i> (1997)	Goserelin	CZE	Q	KF
WU <i>et al.</i> (1997)	Protein- und Peptidstandards	CZE	IT-rTOF	SL
DUNAYEVSKIY <i>et al.</i> (1998)	Bindungskonstanten von Peptiden an Vancomycin	ACE	3Q	KF
BOSS <i>et al.</i> (1998)	Rekombinantes humanes Erythropoietin	CZE	3Q	KF
CARBECK <i>et al.</i> (1998)	Ladung von Proteinen in Lösung und in der Gasphase	CZE	3Q	MD
CAO & MOINI (1998b)	Peptide, Proteine, Proteinverdau, Gesamtblut	CZE	3Q	IC
CAO & MOINI (1998c)	Hämoglobinverdau	CZE	TOF	
CAO & MOINI (1998a)	Myoglobin- und Cytochrom c-Verdau	CZE	TOF	IC
McCOMB <i>et al.</i> (1998)	Protein- und Peptidstandards	CZE	TOF	SL
KNUDSEN <i>et al.</i> (1998)	Metallothionein-Isoformen	CZE	IT	KF
ROHDE <i>et al.</i> (1998)	Proteinmischungen	CZE		KF
ZHOU <i>et al.</i> (1998)	Rekombinantes humanes Erythropoietin	CZE		KF
NAYLOR <i>et al.</i> (1998)	MHC I-Peptide	CZE		KF
NAYLOR & TOMLINSON (1998)	Sequenzierung von Peptiden	MPC-TITP	BEQ1Q2	IC
FIGEYS <i>et al.</i> (1998a)	Proteinstandards	MPC-CZE	EBQ1Q2	KF
FIGEYS <i>et al.</i> (1998b)	Proteine und Proteome	SPE-CZE	IT	IC
LI <i>et al.</i> (1999)	Proteolytischer Proteinverdau	SPE-CZE		IC
JAVERFALK-HOYES <i>et al.</i> (1999)	Neurotransmitter und -peptide	CZE	3Q, 2QTOF	KF
GUO <i>et al.</i> (1999)	Metallothioneine	CZE	3Q	KF
SERWE & ROSS (1999)	Proteinstandards	CZE	3Q	IC
JIN <i>et al.</i> (1999)	Proteine aus SDS-PAGE	CZE	Q	KF
ENING <i>et al.</i> (1999)	Neuropeptid Y, Fragmente und Abbauprodukte	CZE	IT-rTOF	IC
TONG <i>et al.</i> (1999)	Proteine in Komplexen, proteolytischer Verdau	CZE		KF
CAO & MOINI (1999)	Phosphopeptide	CZE/micro-SPE	IT	FB
HE <i>et al.</i> (1999)	Reduzierte und oxydierte Formen von Cytochrom c	IMAC-CZE	IT	IC
LAI & HER (2000)	Glycosylierungsmuster von Bienenvenomen	CD-CZE	IT	KF, SL
LI <i>et al.</i> (2000)	Gelisierte Membranproteine	CZE	3Q, 2QTOF	SL
SAMSKOG <i>et al.</i> (2000)	Peptidstandards	CZE	TOF	SL

Tabelle E3 (Fortsetzung)

Tabelle E3 (Fortsetzung)

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
MARTIN-GIRARDEAU & RENOUE-GONNARD (2000)	20 natürliche Aminosäuren in Blut	CZE	2Q	KF
WANG <i>et al.</i> (2000)	Erprobung immobilisierter Trypsins für <i>online</i> -Verdau	CZE	Q	SL
CHONG <i>et al.</i> (2000)	Proteinprofile von Bakterien aus Permafrost	CZE	IT-rTOF	
CAO & STULTS (2000)	Phosphorylierungsstellen von Proteinen	IMAC-CZE	IT	
LARSSON & LUTZ (2000)	Proteinstandards	TITP	Q	KF
LARSSON <i>et al.</i> (2001)	Cytochrom c-Verdau und Thrombininhibitoren	TITP	Q	KF
SMITH & MOINI (2001a)	Bakterielle Proteome	CIEF	FT	KF
AGUILAR <i>et al.</i> (2001)	Histone	CZE		KF
PAWLAK <i>et al.</i> (2002)	Metallbindung eines Metallothioneins (Maus)	CZE	3Q	KF
SHEN & BUKO (2002)	Proteinstandards in PEG-haltigen Proben	CZE	3Q	KF
VARESI <i>et al.</i> (2002)	Amyloid- $\beta$ -Peptide	CZE	Q	KF
NEUSS <i>et al.</i> (2002)	Proteinstandards	CZE	IT	KF
SIMO <i>et al.</i> (2002)	Peptidstandards	CZE	IT	KF
MOINI <i>et al.</i> (2002)	Anhydrase aus Blut	CZE	IT	SF
WETTERHALL <i>et al.</i> (2002b)	Cerebrospinalflüssigkeit	CZE	FT	
XIN <i>et al.</i> (2003)	Peptidstandards	CZE	FT	KF

Tabelle E4. Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der Bioanalytik (Saccharide und Kohlenhydrate). Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
KELLY <i>et al.</i> (1996)	Lipooligosaccharide und Glycane aus <i>Moraxella catarrhalis</i>	CZE	3Q	KF
LI <i>et al.</i> (1998)	Pathogene Lipooligosaccharide	SPE-CZE	3Q	FB
TANAKA <i>et al.</i> (1998)	Geladene Cyclodextrine	CZE	3Q	KF
AURIOLA <i>et al.</i> (1998)	Lipopolysaccharide aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TITP	3Q	KF
DUTEIL <i>et al.</i> (1999)	Heparinlignosaccharide	CZE	Q	KF
CHE <i>et al.</i> (1999)	Dextran	CZE	IT	KF
LI <i>et al.</i> (2000)	Chromophormarkierte Disaccharide	CZE	Q	KF
CHARLWOOD <i>et al.</i> (2000)	N-Verknüpfte Oligosaccharide	CZE	IT	KF

Tabelle E4 (Fortsetzung)

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
LARSSON <i>et al.</i> (2001)	Dextrin-15	CZE	Q	KF
KLAMPFL & BUCHBERGER (2001)	Kohlenhydratstandards	CZE	Q	KF
ZAMFIR & PETER-KATALINIC (2001)	Glykokonjugate und Oligosaccharide	CZE	QTOF	SL
RUIZ-CALERO <i>et al.</i> (2001)	Heparindopolymerisierte Disaccharide	CZE	IT	KF
SCHWEDA <i>et al.</i> (2002)	Oligosaccharidpitope aus Lipopolysacchariden	CZE	3Q	KF
GENNARO <i>et al.</i> (2002)	Negativ geladene, derivatisierte und underivatisierte Glycane	CZE	IT	KF

Tabelle E5. Literatürübersicht CE/MS: Anwendung in der Bioanalytik (DNA, RNA und Nucleotide). Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
WANG <i>et al.</i> (1996)	Reaktionsprodukte mit Uridin	CZE	Q	KF
BARRY <i>et al.</i> (1996)	Modifizierte Oligonucleotide	CZE in PVP	3Q	KF
HARSCH & VOUROIS (1998)	Modifizierte Oligonucleotide	Polymer-CZE	IT	KF
SOGA <i>et al.</i> (2002)	ADP, GDP, CTP, CMP, Succinyl-CoA	CZE	Q	KF

Tabelle E6. Literatürübersicht CE/MS: Anwendung in der Analytik von Naturstoffen und in der Lebensmittelchemie. Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
BUZY <i>et al.</i> (1994)	Enzymatischer Abbau paralytischer Muscheltoxine (PSP)		3Q	KF
ARAMENDIA <i>et al.</i> (1995)	Isoflavonoide	CZE	Q	KF
ARAMENDIA <i>et al.</i> (1995)	Isoflavone	CZE	Q	KF
ZHAO <i>et al.</i> (1997)	Tetramin in Meeresschnecken	CZE	3Q	KF
UNGER <i>et al.</i> (1997)	Verschiedene Alkaloidklassen	CZE	FSF	KF
STOCKIGT <i>et al.</i> (1997)	Alkaloide aus <i>Rauwolfia</i>			
BENSON <i>et al.</i> (1998)	Produkte der Maillard-Reaktion	CZE	BEQIQ2	KF

Tabelle E6 (Fortsetzung)

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
STURM & STUPPNER (1998)	Isochinolalkaloide	CZE		KF
LI <i>et al.</i> (2001)	Protein- und Peptidstandards	CZE	QTOF	SL
CHEKRAOUI <i>et al.</i> (2001)	Solasodin, Tomatidin, Solanidin, Demissidin	NACE	Q	KF
BIANCO <i>et al.</i> (2002)	Glycolalkaloide und Aglycone	NACE	IT	KF
BIANCO <i>et al.</i> (2003)	Glycolalkaloide und Aglycone aus rekombinanten Kartoffeln	NACE	IT	KF

Tabelle E7. Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der Analytik von Pharmazeutika (nichtenantioselektiv). Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
JOHANSSON <i>et al.</i> (1991)	Diazepine	CZE	3Q	KF
TOMLINSON <i>et al.</i> (1993)	Haloperidol und Metaboliten	CZE	EB	KF
KOSTAINEN <i>et al.</i> (1993)	Naproxen-Protein-Konjugate	CZE		KF
TOMLINSON <i>et al.</i> (1994)	Mifentidin	NACE		KF
HSIEH <i>et al.</i> (1995)	Nichtkovalente FKBP-FK506 und FKBP-Rapamcyinkomplexe	CZE	3Q	KF
ZHAO <i>et al.</i> (1996)	Metastabile Intermediate der enzymatischen NAD <sup>+</sup> -Peroxidation	CZE	3Q	KF
BELDER & STOCKIGT (1996)	Ephedrin, Tocainid und Strukturanaloga	CZE	FSF	KF
LU <i>et al.</i> (1996)	Taximofen und Metaboliten	NACE-MEKC		KF
SHEPARD & HENION (1997)	EDTA in Plasma und Urin	CZE	3Q	FB
ASHCROFT <i>et al.</i> (1997)	Paracetamol, Phenacetin und Metaboliten	CZE	2Q	KF
LAUSECKER <i>et al.</i> (1998)	Midazolam und Metaboliten	CZE	3Q	KF
LIU <i>et al.</i> (1998)	Tricyclische Antidepressiva	CZE	Q	KF
BACH & HENION (1998)	Methylphenidat und Metaboliten	CZE	IT	KF
WIEDMER <i>et al.</i> (1998)	Corticosteroide	PF-MEKC	IT	KF
HE <i>et al.</i> (1999)	Glutathion, Aminosäurederivate	CZE	IT	KF
HEITMEIER & BLASCHKE (1999)	Paracetamol und Metaboliten	CZE	IT	KF
HEITMEIER & BLASCHKE (1999)	Nichtopioid Schmerzmittel	CZE	IT	KF
MCCLEAN <i>et al.</i> (1999)	Benzodiazepine und Metaboliten	CZE	IT	KF

Tabelle E7 (Fortsetzung)

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
HEINIG & HENION (1999)	Carnitin und Acylcarnitin	CZE, NACE	3Q	KF
KESKI-HYNNILA <i>et al.</i> (2000)	Nitrocatecholglucuronide	CZE	3Q	KF
HUIKKO & KOSTAINEN (2000)	Bisphosphonate	CZE	3Q	KF
CAHOURS <i>et al.</i> (2000)	Anti-HIV-Nucleoside	CZE	3Q	KF
CHEN <i>et al.</i> (2000)	Coptisin, Berberin, Palmatin	CZE	Q	KF
MEIER & BLASCHKE (2000)	Praziquantelmetaboliten	CZE	IT	KF
TSAI <i>et al.</i> (2000)	Morphin im Urin	CZE	IT	KF
SENTELLAS & THORMANN (2002)	Ebrotidin und Metaboliten	CZE	IT	KF
MCCLEAN <i>et al.</i> (2000)	Furosemid	CZE	IT	KF
TANG <i>et al.</i> (2001)	1,4-Benzodiazepine	CZE	IT	KF
WARNKE <i>et al.</i> (2001)	Quaternäre Ammoniumverbindungen in Pferdeurin	CZE	3Q, IT	KF
DENG <i>et al.</i> (2001)	Platinaddukte an DNA-Nucleotide	CZE	3Q, IT	SL
ELGSTOEN <i>et al.</i> (2001)	Carnitine, Desipramin, Imipramin	CZE	3Q	KF
AGROFOLIO <i>et al.</i> (2001)	Diagnose von metabolischen Störungen	CZE	3Q	KF
DENG <i>et al.</i> (2001)	Anti-HIV-Nucleosidinhibitoren	CZE	3Q	KF
WATERVAL <i>et al.</i> (2001)	Carnitine	CZE	3Q	KF
CHENG <i>et al.</i> (2001)	Pharmazeutisch aktive Peptide	CZE	3Q	SL
CHERKAOUI <i>et al.</i> (2001)	Synthetische Pharmazeutika in Traditioneller Chinesischer Medizin	CZE	IT	KF
CARTER <i>et al.</i> (2001)	Venlafaxin und Phase I-Metaboliten	NACE	Q	KF
VUORENSOLA <i>et al.</i> (2002)	Taximofen und Metaboliten	NACE	Q	KF
PETERSON <i>et al.</i> (2002)	Catecholamine	CZE	3Q	SL
HUCK <i>et al.</i> (2002)	Catecholamine und Metanephrine	CZE	TOF	KF
STRICKMANN <i>et al.</i> (2002)	Flavonoide, Naringenin	CZE	Q	KF
KUNG <i>et al.</i> (2002)	Bindungsverhalten von Oxaliplatin an 5'GMP	CZE	IT	KF
WEY & THORMANN (2002)	Reaktion von <i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] mit 5'GMP	CZE	IT	KF
CHERKAOUI & VEUTHEY (2002)	Oxycodon und Metaboliten	CZE	IT	KF
GEISER <i>et al.</i> (2002)	Fluoxetin und verwandte Verbindungen	NACE	Q	KF
CHERKAOUI & VEUTHEY (2002)	$\beta$ -Blocker	NACE	Q	KF
	Saure und basische Pharmazeutika	NACE		KF



Tabelle E7 (Fortsetzung)

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
STUBBERUD <i>et al.</i> (2002)	Ibuprofen, Codein und Abbauprodukte	PF-MEKC	Q	KF
SOGA <i>et al.</i> (2002)	Intermediate aus dem Metabolismus von <i>Bacillus subtilis</i>	CZE	Q	KF
VUORENSOLA <i>et al.</i> (2003)	Dopamin und Metoxykatecholamine	CZE	IT	KF
PERI-OKONNY <i>et al.</i> (2003)	Basische Pharmazeutika	NACE	Q	KF

Tabelle E8. Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der Analytik von Pharmazeutika (enantioselektiv). Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
BATEMAN <i>et al.</i> (1997)	Sulfonamidantibiotika	CZE	3Q	SL
LU & COLE (1998)	Terbutalin, Ketamin, Proprianolol	CD-CZE		KF
JAVERFALK <i>et al.</i> (1998)	Ropivacain, Bupivacain	PF-CD-CZE	Q	KF
RUDAZ <i>et al.</i> (2000)	Tramadol und Phase I-Metaboliten	CD-CZE	Q	KF
TANAKA <i>et al.</i> (2000)	Aminopyrrolidon, Aminocaproactam, Cycloserin	KE-CZE	3Q	KF
GRARD <i>et al.</i> (2001)	Imidazolderivate	PF-CD-CZE	3Q	KF
TOUSSAINT <i>et al.</i> (2001)	Clenbuterolenantiomere	PF-CD-CZE	3Q	KF
CHERKAOUTI <i>et al.</i> (2001)	Amphetamine, Methadon, Venlafaxin, Tropanalkaloide und Metaboliten	PF-CD-CZE	Q	KF
RUDAZ <i>et al.</i> (2001)	Mtd und verwandte synthetische Opiate	PF-CD-CZE	Q	KF
CHERKAOUTI & VEUTHEY (2002)	Lokalanästhetika	CD-CZE	Q	KF

Tabelle E9. Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der Noxen- und Umweltanalytik. Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
OTSUKA <i>et al.</i> (1998)	Phenoxysäuren	CD-CZE	IT	KF
KOSTIAINEN <i>et al.</i> (1993)	Chemische Kampfstoffe	CZE		KF
MOYANO <i>et al.</i> (1996)	Quaternäre Ammoniumherbizide	CZE	3Q	KF
WYCHERLEY <i>et al.</i> (1996)	Quaternäre Ammoniumherbizide	CZE	Q	KF

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
BENSON <i>et al.</i> (1996)	3-Phenylamino-1,2-propanediolmetaboliten	MPC-CE	EBQ1Q2	KF
SHEPPARD & HENION (1997)	EDTA als Nickelchelat in Wasser	CZE	3Q	FB
MERCIER <i>et al.</i> (1998)	Alkylphosphonsäuren	CZE	3Q	KF
SHRAMEL <i>et al.</i> (1998)	Metallspeziation	CZE	3Q	KF
ZHAO <i>et al.</i> (1998)	Heterozyklische Amine	CZE	Q	KF
TSAI <i>et al.</i> (1998)	Triazine	CZE	Q	KF
MICHALKE <i>et al.</i> (1999)	Selenspeziation	CZE	3Q	KF
SHRAMEL <i>et al.</i> (1999)	Arsenspeziation	CZE	3Q	KF
MERCIER <i>et al.</i> (1999)	Phosphonsäuren	CZE	3Q	KF
LAZAR & LEE (1999a)	Paraquat- und Diquat herbizide	CZE	QTOF	KF
LAFONT <i>et al.</i> (1999)	Phenole in Abwasser aus Olivenmühlen	CZE	Q	KF
SHRAMEL <i>et al.</i> (1999)	Spurenelementspeziation	CZE	Q	KF
AHREK & BUCHBERGER (1999)	Haloessigsäuren	NACE	Q	KF
POIGER <i>et al.</i> (2000)	Reaktive Farbstoffe in Abwasser	CZE	Q	KF
LOOS <i>et al.</i> (2000)	Polare hydrophile aromatische Sulfonate in Klärwerken	CZE	Q	KF
POIGER <i>et al.</i> (2000)	Azo- und Formazanfarbstoffe	CZE	Q	KF
JAUREGUI <i>et al.</i> (2000)	Chlorphenole	CZE	IT	KF
RIU <i>et al.</i> (2000)	Lineare Alkylbenzolsulfonate	CZE	Q	KF
AHREK & BUCHBERGER (2001)	Arzneimittelrückstände in Wasser	CZE	Q	KF
TAKEDA <i>et al.</i> (2001)	Dichlorphenole	CZE	Q	KF
AHREK & BUCHBERGER (2001)	Arzneimittelrückstände in Wasser	CZE, NACE	Q	KF
RODRIGUEZ <i>et al.</i> (2002)	Thiabenzazol, Procymidon	CZE	Q	KF
WILLEMS <i>et al.</i> (2002)	Benzo[a]pyrenediolepid-DNA-Addukte	CZE	QTOF	KF
NUNEZ <i>et al.</i> (2002)	Quaternäre Ammoniumherbizide	CZE	IT	KF
BEDNAR <i>et al.</i> (2002)	Abkömmlinge des 3-Chinuclidinol	CZE	IT	KF
RODRIGUEZ <i>et al.</i> (2003)	Saure Pestizide	CZE	Q	KF

Tabelle E9 (Fortsetzung)

**Tabelle E10.** Literaturübersicht CE/MS: Anwendung in der forensischen Analytik. Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
GAUS <i>et al.</i> (1996)	Designerdrogen	CZE	3Q	
CAI & HENTON (1996)	LSD-Metabolismus	CZE	3Q	
THORMANN <i>et al.</i> (1998)	Methadon	CZE	3Q	KF
LAZAR <i>et al.</i> (1998)	Illegale Drogen	CZE	TOF	KF
VARESIO <i>et al.</i> (1998)	Ecstasy und Metaboliten	CZE	Q	KF
LAZAR & LEE (1999a)	Opium	CZE	TOF	KF
TSAI <i>et al.</i> (2000)	Amphetamine und Morphin	CZE	IT	KF
RAMSEIER <i>et al.</i> (2000)	Amphetamine und Designerdrogen	CZE	IT	KF
WEY <i>et al.</i> (2000)	Codein, Dihydrocodein und Metaboliten	CZE	IT	KF
GEISER <i>et al.</i> (2000)	Amphetaminderivate	NACE	Q	KF
WEY & THORMANN (2001)	Morphin und Morphinverwandte	CZE	IT	KF
WEY & THORMANN (2001)	Opiode	CZE-FASS	IT	KF

**Tabelle E11.** Literaturübersicht CE/MS: Nichtkategorisierbare Anwendungen. Fußnoten vgl. Tabelle E3.

Referenz	Analyten/Mechanismen	CE <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	ESI <sup>3</sup>
TANAKA <i>et al.</i> (1998)	Chirale Analyse enantiomerer Säuren	PF-CD-CZE	3Q	KF
STOCKIGT <i>et al.</i> (1996)	Basische Dendrimere	CZE	FSF	KF
WHEAT <i>et al.</i> (1997)	Niedermolekulare Verbindungen	CZE	Q	KF
JOHNSON <i>et al.</i> (1999)	Kleine Carboxylsäuren	CZE	Q	KF
CAO & MOINI (1999)	$\alpha$ - und $\beta$ -Seitenketten des Hämoglobins (Einzelzellanalytik)	CZE	TOF	IC
HSIEH <i>et al.</i> (1994)	Verunreinigungen von Peptiden und Alkaloiden	CZE	3Q	KF
SOGA & HEIGER (2000)	Aminosäuren	CZE	Q	KF