

Fehérjék analitikája

10. előadás: CE-MS módszerek

Előadó: Kecskeméti Ádám

Irodalom:

Gerhardus de Jong

Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry: Principles and Applications (2017)

CE-MS alapok

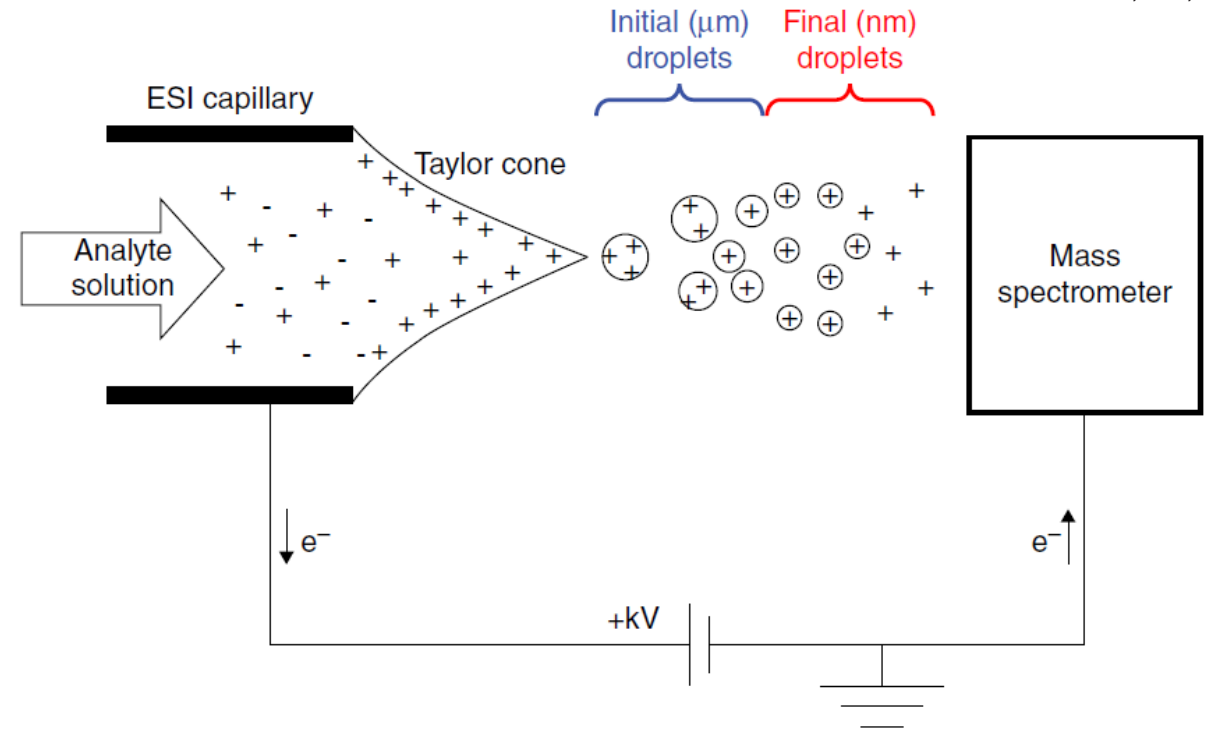
CE detektálás - érzékenység

- UV
- Fluoreszcencia (CE-LIF)
 - Egysejt analízis
 - Származékképzés: online vs offline
 - Xe-lámpák, lézerek, LED-ek
- Vezetőképesség
 - Érintkezésmentes (CCD)
- (ESI-)MS

CE kapcsolása MS-hez

- CE – atmoszférikus nyomás;
MS – vákuum
- CE és MS feszültségek kombinálása
- Alacsony áramlási sebesség CE-nél (nL/min)
- MS kompatibilis pufferek
 - Ionnyomás nem illékony, tömény puffernél
 - + mód: alacsony pH
- mód: magas pH
 - 20-30% szerves módosító

Konermann, L., et al. (2013) Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.*, **85**, 2–9.



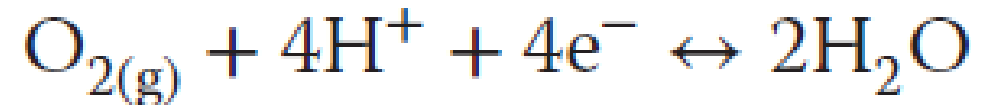
1. Töltött csepp képződés (0,1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$; $\pm 2\text{-}5\text{ kV}$)
2. Csepp párolgás (Rayleigh-határ, Coulomb erők)
3. Gázfázisú ionok keletkezése
 - 1 analit/csepp, örökli a csepp töltését)
 - vagy ha Coulomb-erő > felületi fesz., gázfázisú ionok „robbannak” ki a cseppből

CE kapcsolása MS-hez

- 3 elektród, két külön áramkörként viselkedik
 - CE inlet
 - CE outlet/ESI porlasztó
 - MS inlet

- Elektródfolyamatok

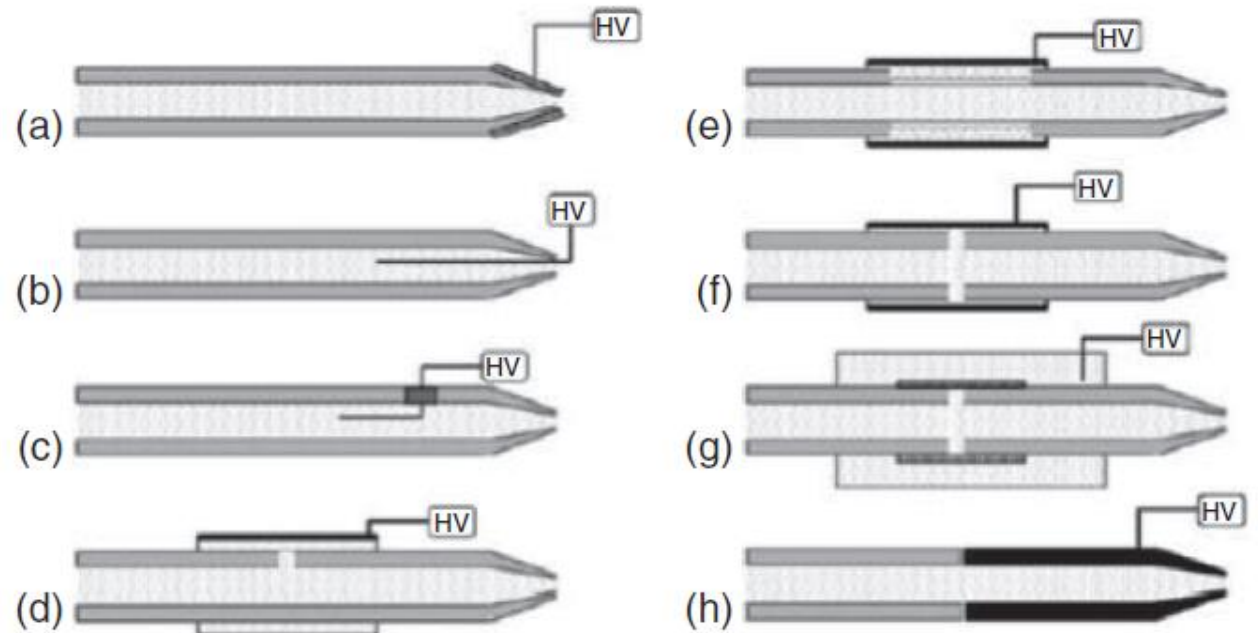
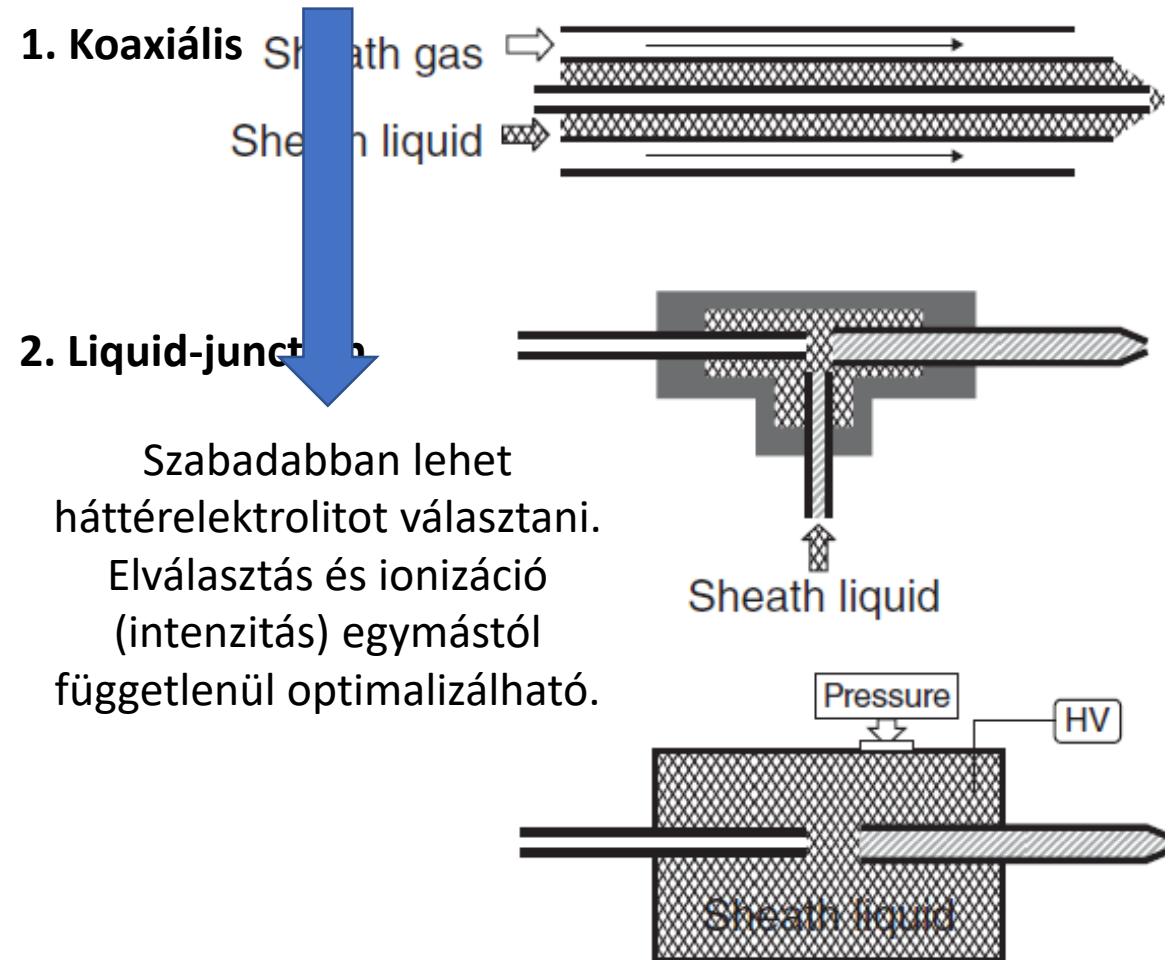
- Anód: oxidáció
- Katód: redukció
- Fordított polaritás: Fe/Ni elektród oxidáció, korrózió



CE kapcsolása MS-hez

Segéd folyadékárammal (sheath liquid)

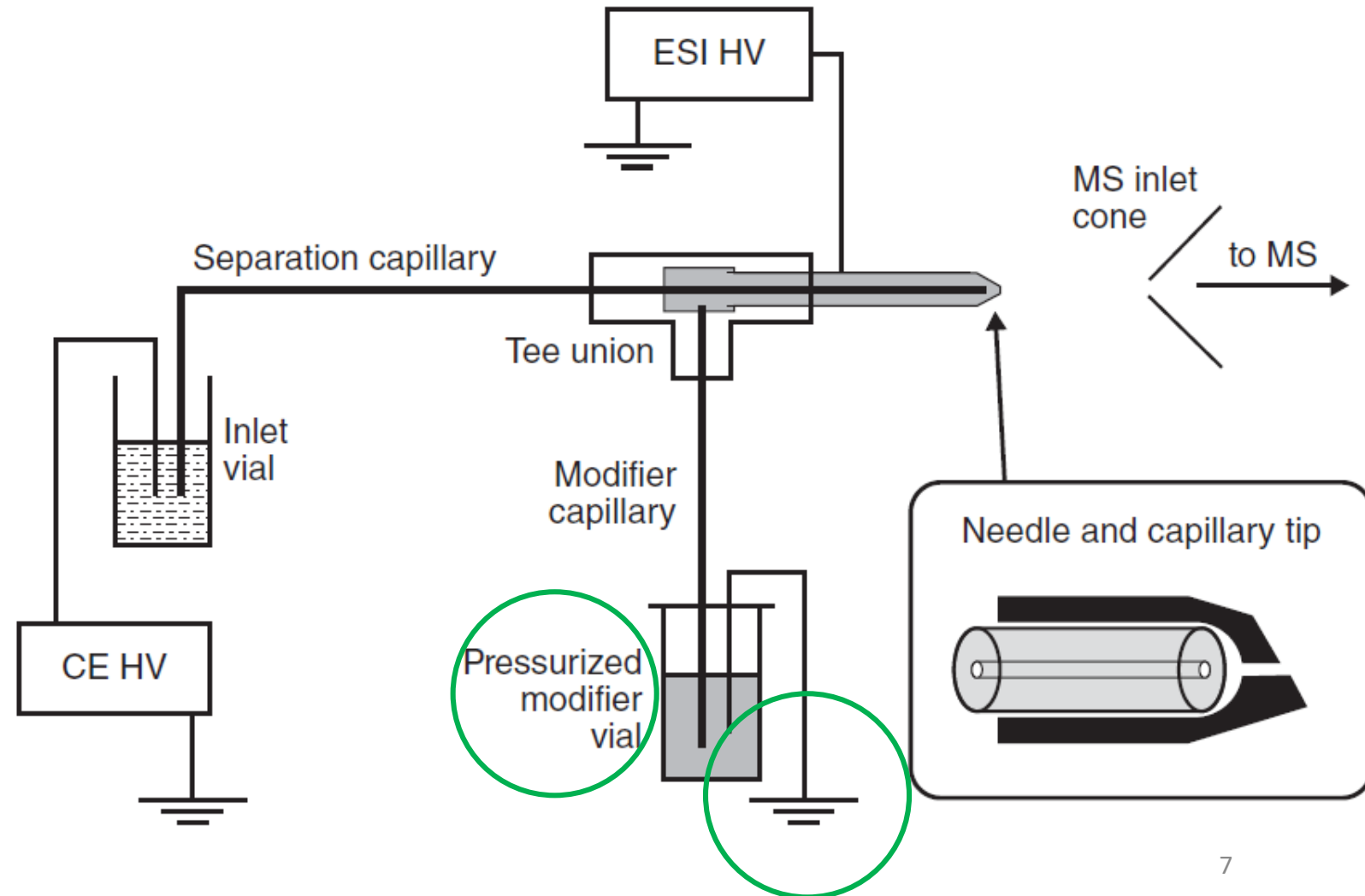
Segéd folyadékáram nélkül (sheathless)



Maxwell, E.J., Chen, D.D.Y. (2008) Twenty years of interface development for ⁶ capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **627**, 25–33.

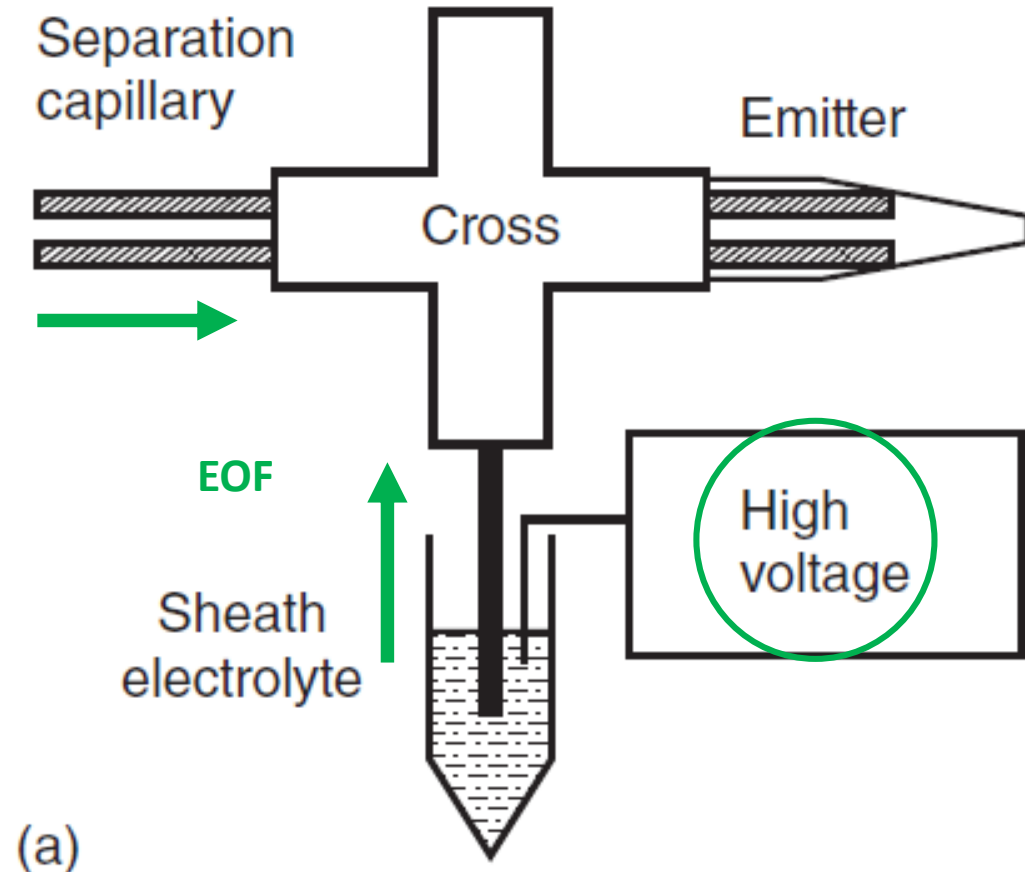
Sheath liquid interface I. – Flow-through microvial – Chen group

Feszültség a SL-en biztosítja a zárt áramkört, nyomás alkalmazásával juttatják a SL-et a porlasztóba



Sheath liquid interface II. – elektrokinetikus pumpa – Dovichi group

Feszültség a SL-en, polaritás azonos az inlettel. Közös föld a porlasztónál, így nem szükséges külön nyomással pumpálni a SL-et.

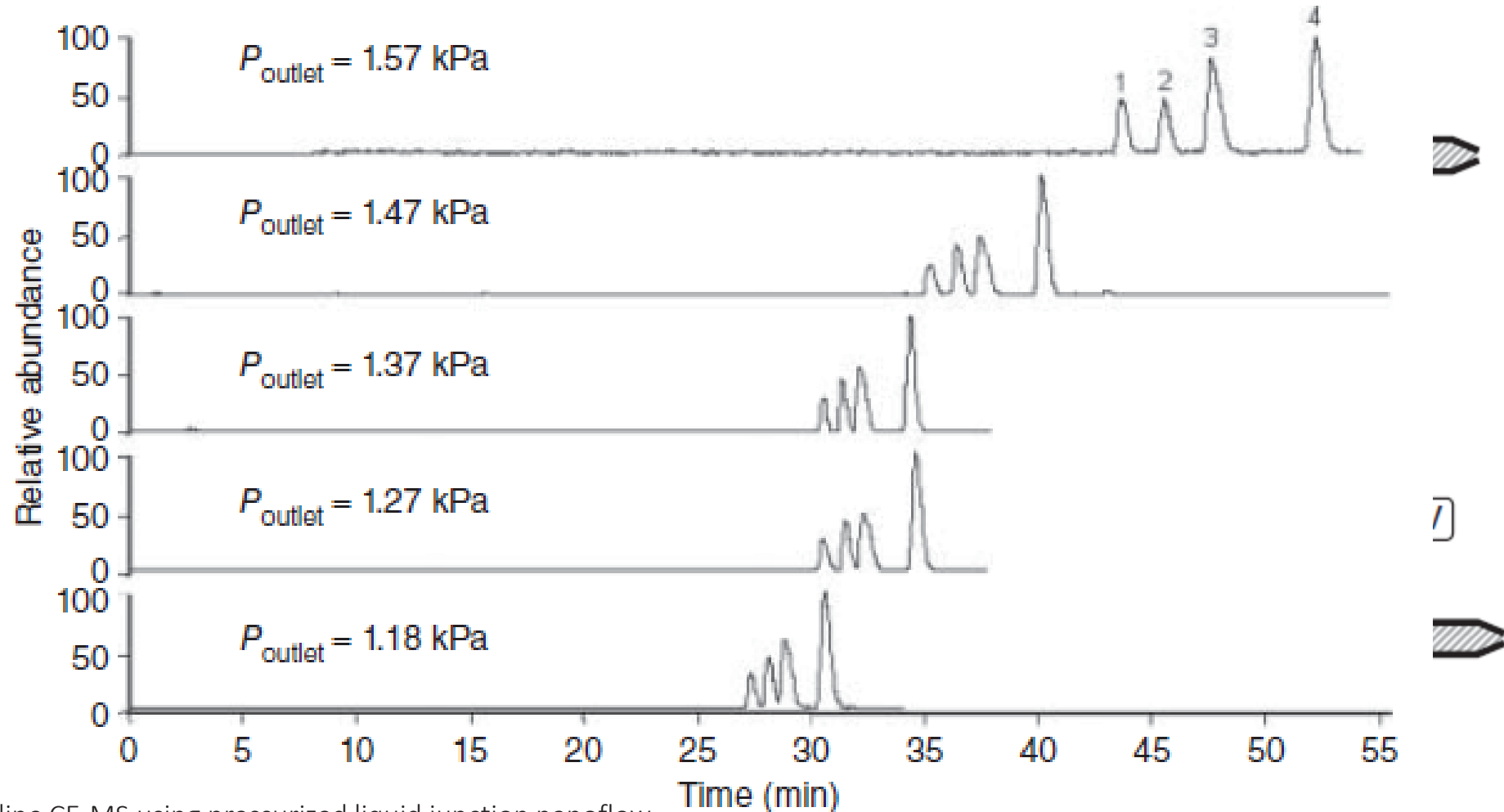


Sun, L., et al. (2015) Third generation electrokinetically pumped sheath-flow nanospray interface with improved stability and sensitivity for automated capillary zone electrophoresis–mass spectrometry analysis of complex proteome digests. *J. Proteome Res.*, **14**, 2312–2321.

Sheath liquid interface II. – Liquid-junction interfész

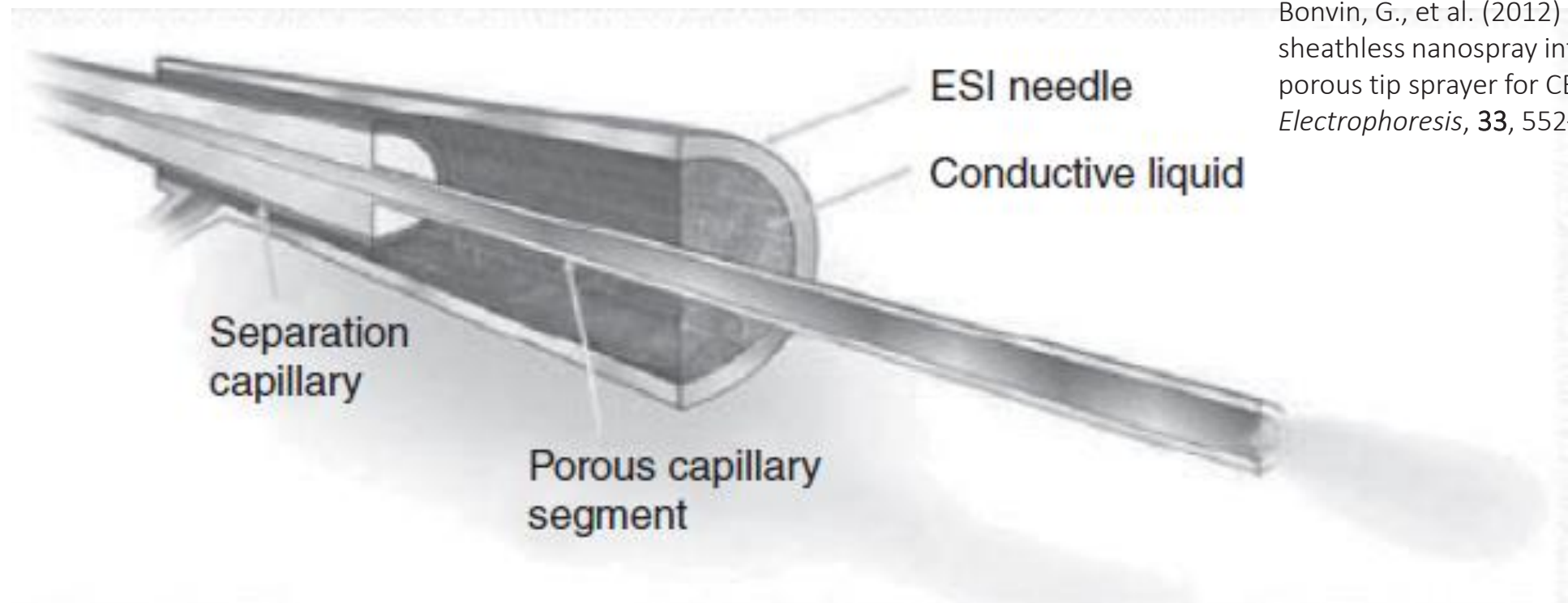
Maxwell, E.J., Chen, D.D.Y. (2008) Twenty years of interface development for spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **627**, 25–33.

- SL ny elválás
- Extra (visszameg
- SL ny nagy
- DE: k alkalr



Sheathless interface I. – porózus hegy nanospray (CESI 8000)

- Kapilláris hegye porózus (HF maratás), amin keresztül biztosítják a zárt áramkört
- Vezető folyadék csere 3-4 óránként



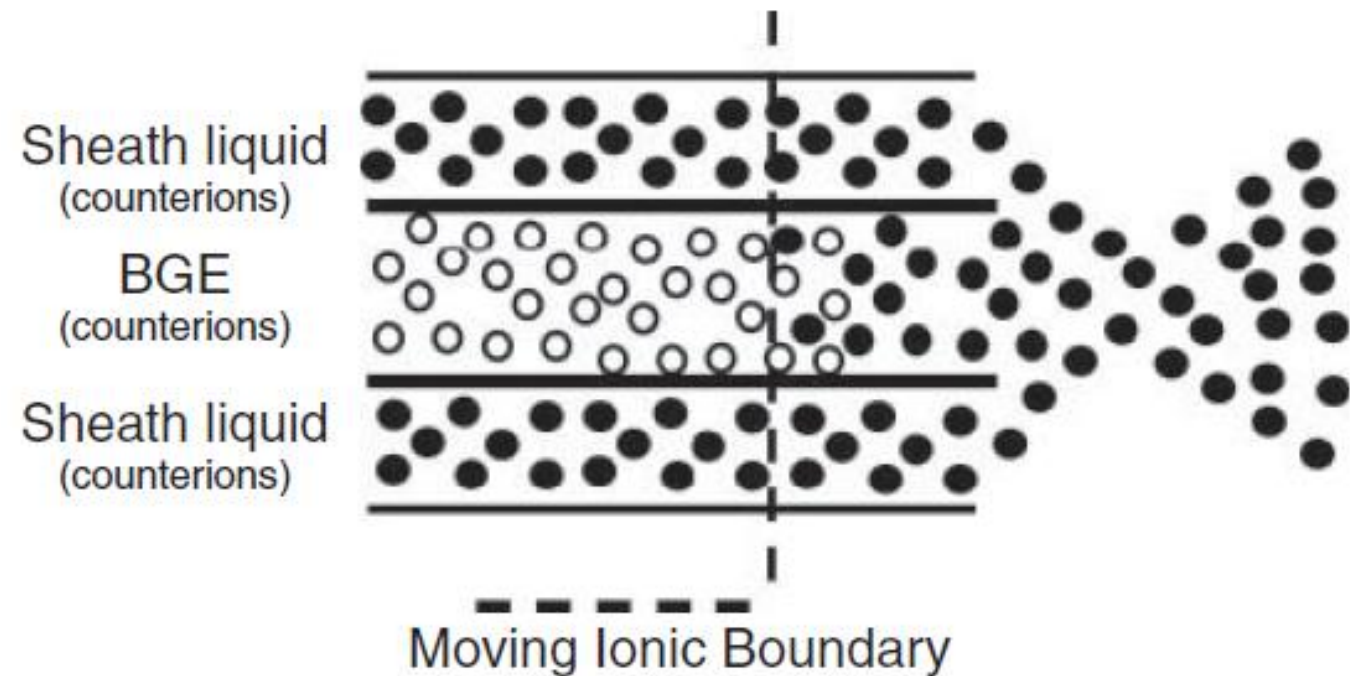
Bonvin, G., et al. (2012) Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling. *Electrophoresis*, **33**, 552–562.

Segéd folyadékok

- Minta hígítás: nem feltétlenül jelent kisebb intenzitást
 - Nem illékony pufferek használata lehetséges
- Ált. kevés elektrolitot (illékony só) tartalmaznak – nem muszáj
 - Elektromos vezetés megteremtés
- Ionizáció elősegítése
 - Kis sótartalom – ideális lenne a kicsi alifás alkoholok (tiszta MeOH)
- Leggyakrabban: szerves oldószer (pl. iPr-OH, MeOH) + 20-80% víz
- Adalékok
 - hangyasav/ecetsav, alkil-amin/ammónia
 - Ammónium-formiát/acetát/karbonát

Ionok visszaáramlása

- Kis/ellentétes EOF esetén
- Áramerősség ingadozás



Foret, F., et al. (1994) Liquid sheath effects on the separation of proteins in capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 4450–4458.

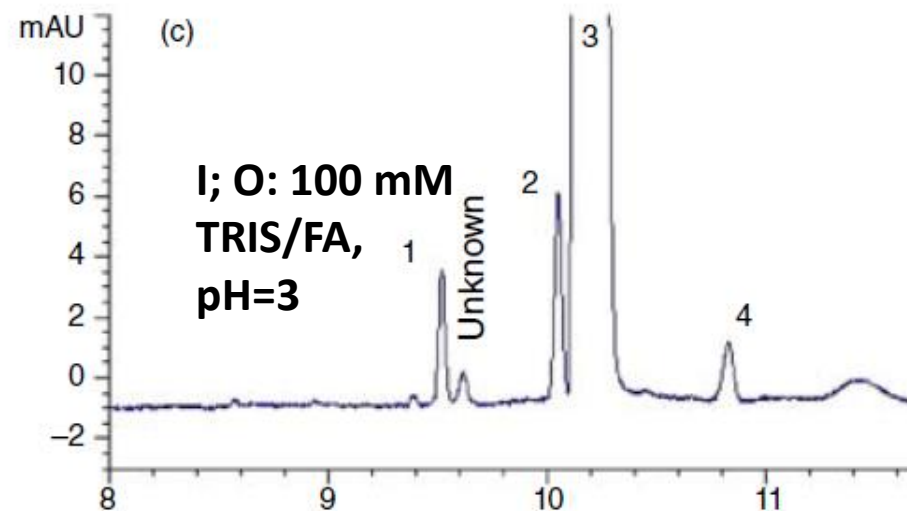
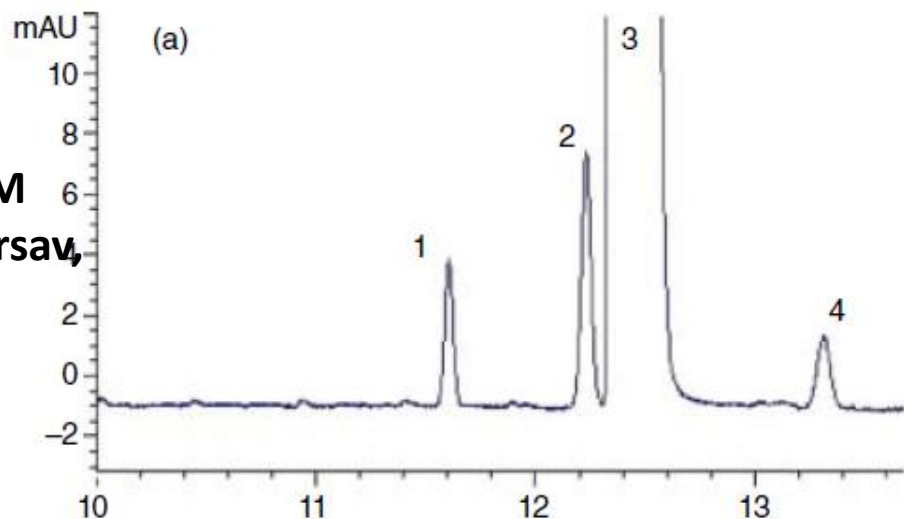
Eltérő ellenion hatása a SL-ben

A, C,: *Eltérő ion miatt változik a szelektivitás*

A, B,: *formiátion beáramlik, ami befolyásolja a szelektivitást*

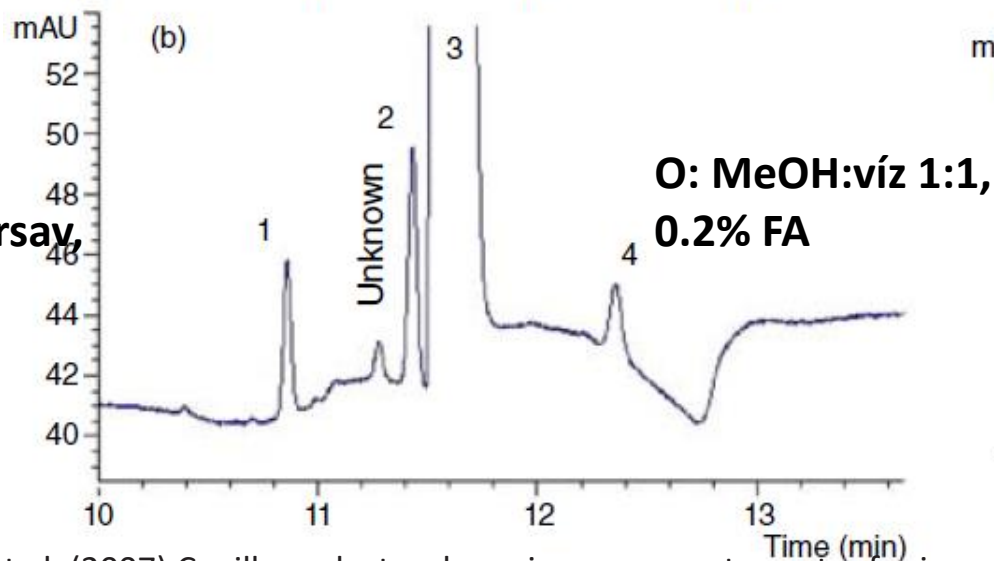
C,: *beáramló formiát UV-elnyelése nagyobb: alapvolan „nő”*

I; O: 100 mM
TRIS/foszforsav,
pH=2.5

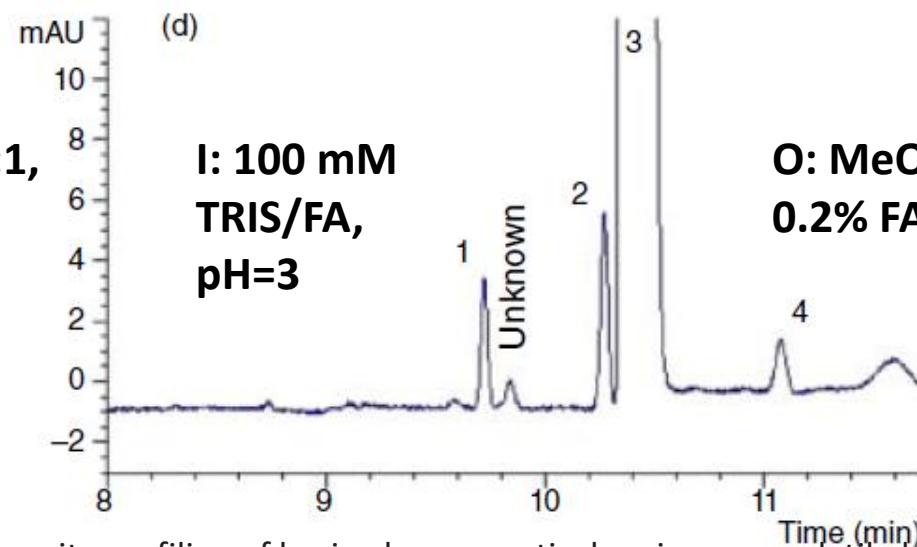


I; O: 100 mM
TRIS/FA,
pH=3

I: 100 mM
TRIS/foszforsav,
pH=2.5



O: MeOH:víz 1:1,
0.2% FA

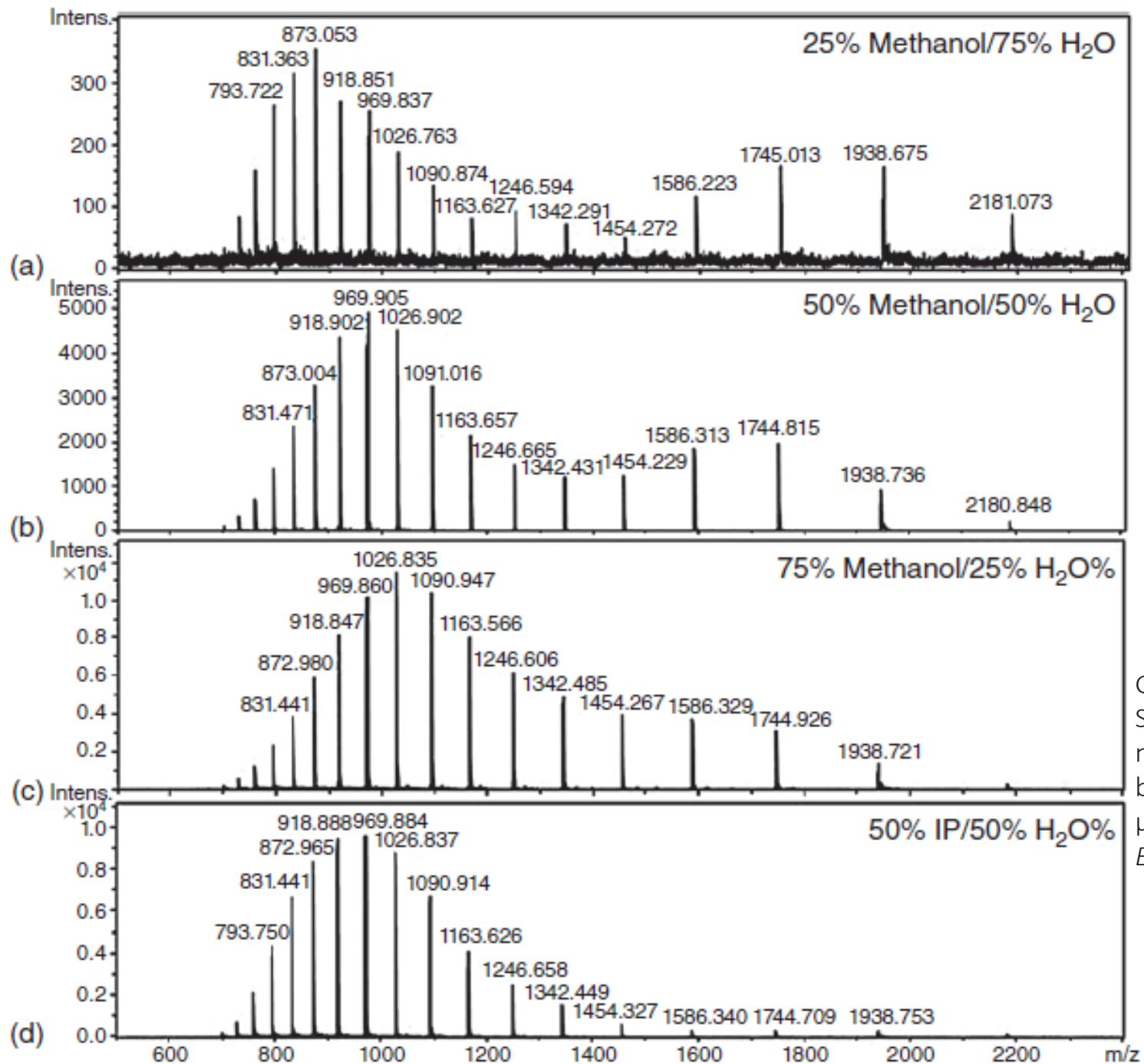


I: 100 mM
TRIS/FA,
pH=3

O: MeOH:víz 1:1,
0.2% FA

SL hatása fehérjék szerkezetére

- A fehérje közege befolyásolja annak terciér szerkezetét
- A közeg az elemzés során = SL
- Pl. eltérés MeOH vs. iPrOH a töltéseloszlásban
- 0.1% FA – protonálódást elősegíti
- Nagyobb mennyiségben (>0.1%): ionizáció elnyomás (szupresszió)



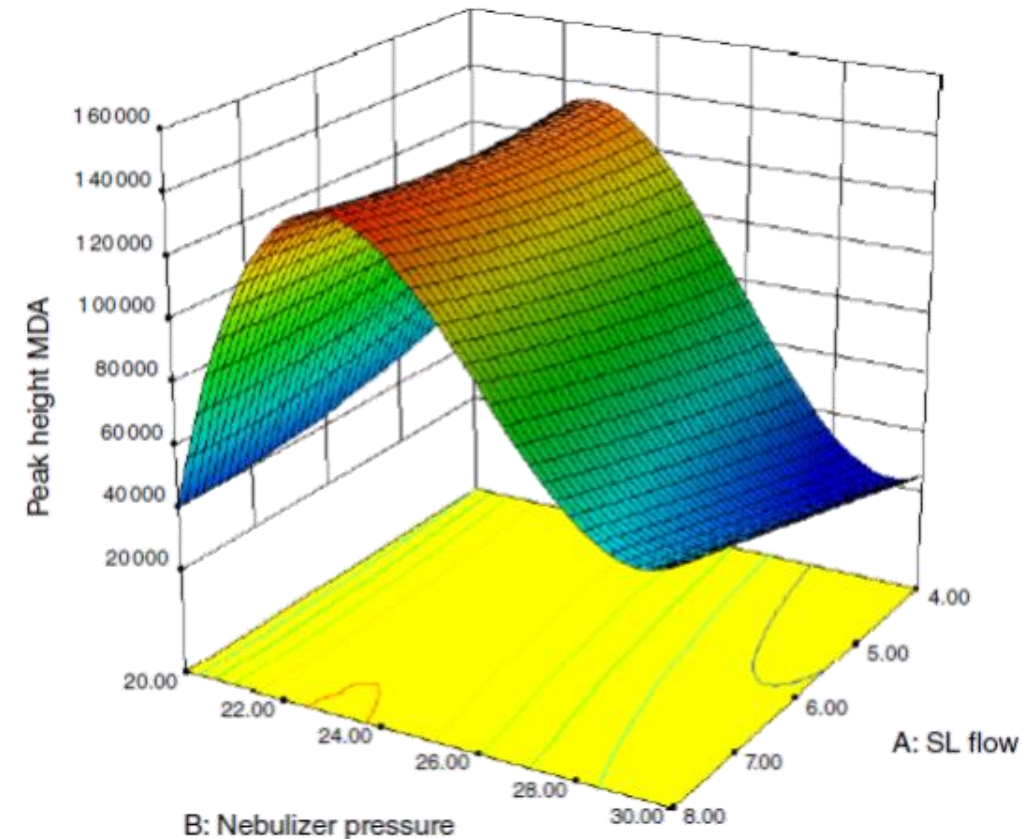
Gusenkov, S., et al. (2013)
 Separation and characterization of
 nitrated variants of the major
 birch pollen allergen by CZE-ESI-
 μ TOF MS.
Electrophoresis, **34**, 2695–2704.

És iPrOH esetén nem
 függ a töltéeloszlás az
 iPrOH mennyiségétől

SL áramlási sebesség

- Interfész típus meghatározó
- Növeléséhez általában a porlasztógáz növelése is kell (stabil spray képződés)
- Több paraméter együttes hatásának kemometriai vizsgálata*:
 - Design-Expert optimalizáló szoftver
 - Szárítógáz T és sebesség: nincs hatása a csúcsalak/magasságra
 - SL áramlási sebesség: kis hatása van, főleg ha alacsony a porlasztó nyomás
 - Porlasztó nyomás: legfontosabb paraméter a négy közül

- *Schmid, et al. (2015) Investigation of photochemical reactions of saccharides during direct ultraviolet absorbance detection in capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, 1388, 259–266.

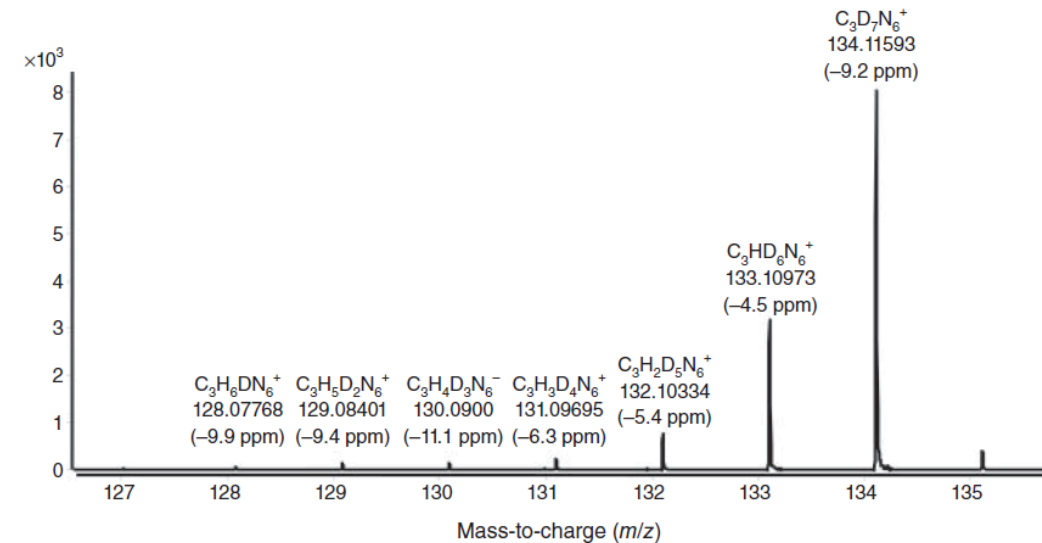


Más (nem ESI) ionforrások

- **APPI**: atmospheric pressure photoionization
- 2 mód: Dopant-tal vagy nélküle
- Dopant: az ionizációs folyamatban az ionok keletkezését elősegítő anyag (pl. aceton, toluol) – SL-hez történhet a hozzáasása
- FA adalékként nem segít a dopant helyett
- Nagyobb (15-50 $\mu\text{L}/\text{min}$) áramlási sebességek
 - MEKC (50 mM SDS) lehetséges a nagyobb hígítás miatt

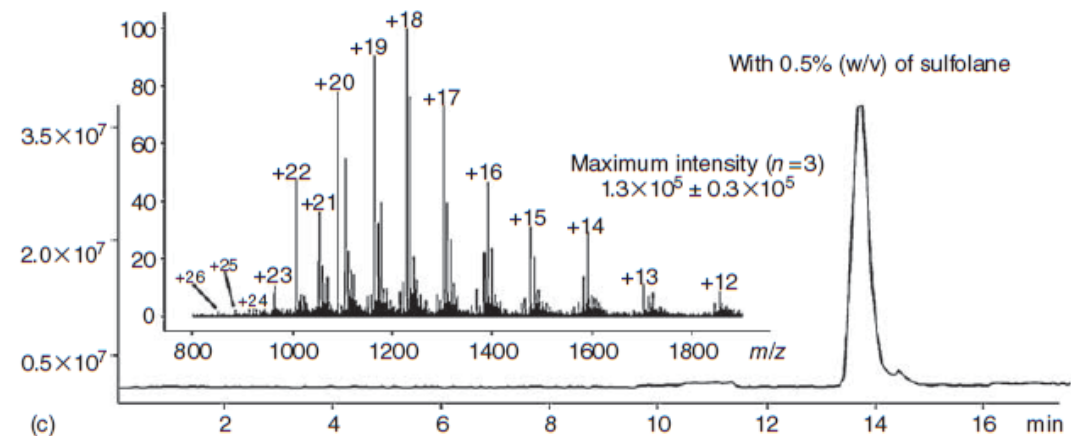
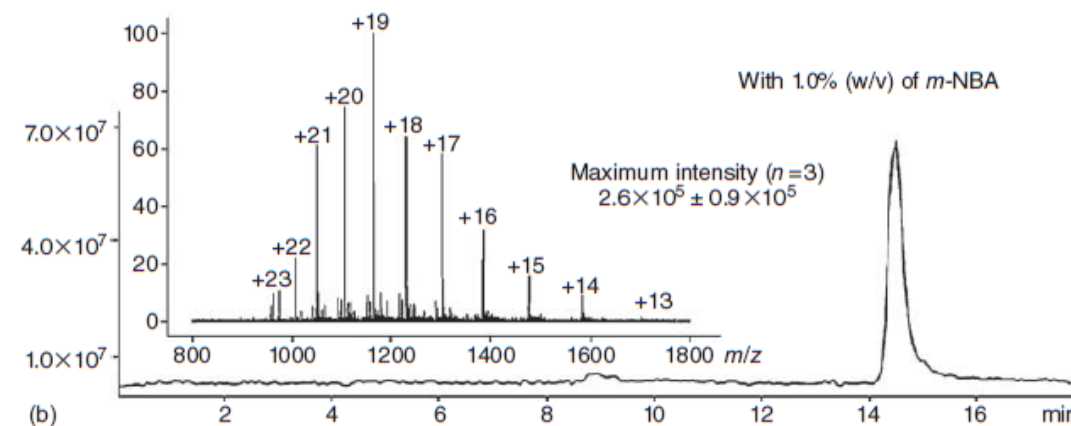
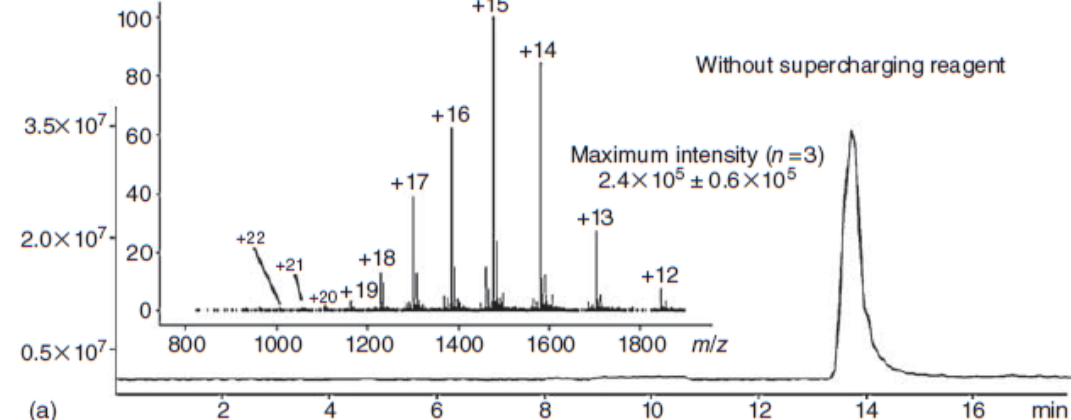
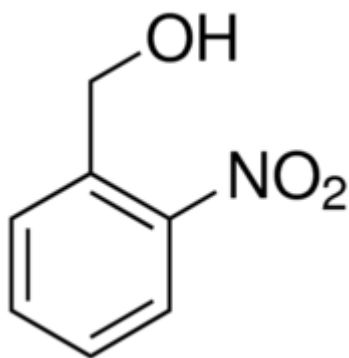
SL kémia

- SL-hez reagensek hozzáadása
- Pl. coordination ionspray: SL-ben Ag^+ -ionok, telítetlen zsírsav észterekkel, D-vitaminokkal, ösztrogénnel komplexet képeztek (+)
- BF_3 , H_3BO_3 – negatív mód
- H/D csere a SL-ben (deuterált oldószerek)
 - Melamin analízis anyatejben ($\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$)
 - Nagyon gyors csere reakció szükséges



SL kémia – fehérjék töltése

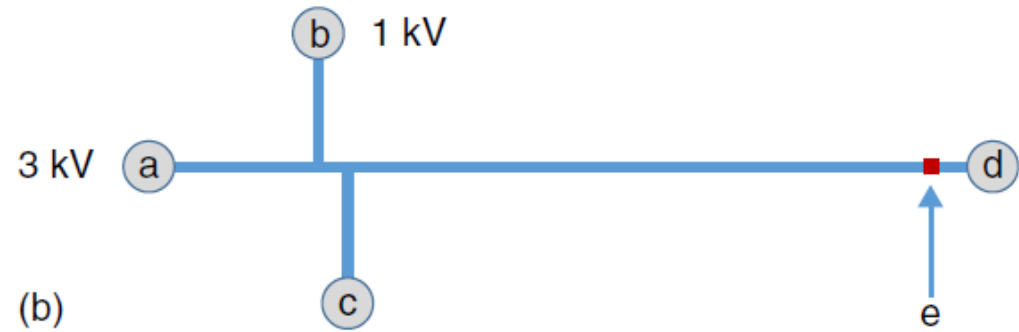
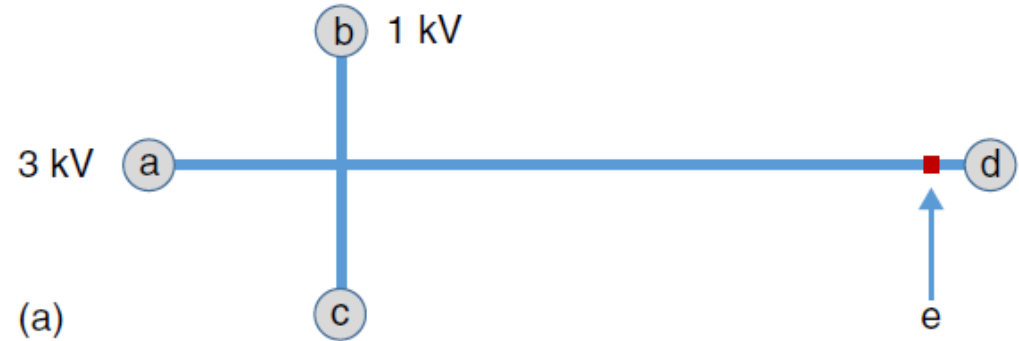
- 0.25-1% o-, m-, p-nitrobenzil alkohol vagy szulfolán
- iPrOH/víz/FA
- Fehérje: emberi növekedési hormon



Mikrochip CE-MS

Mikrochip CE(-MS) – MCE

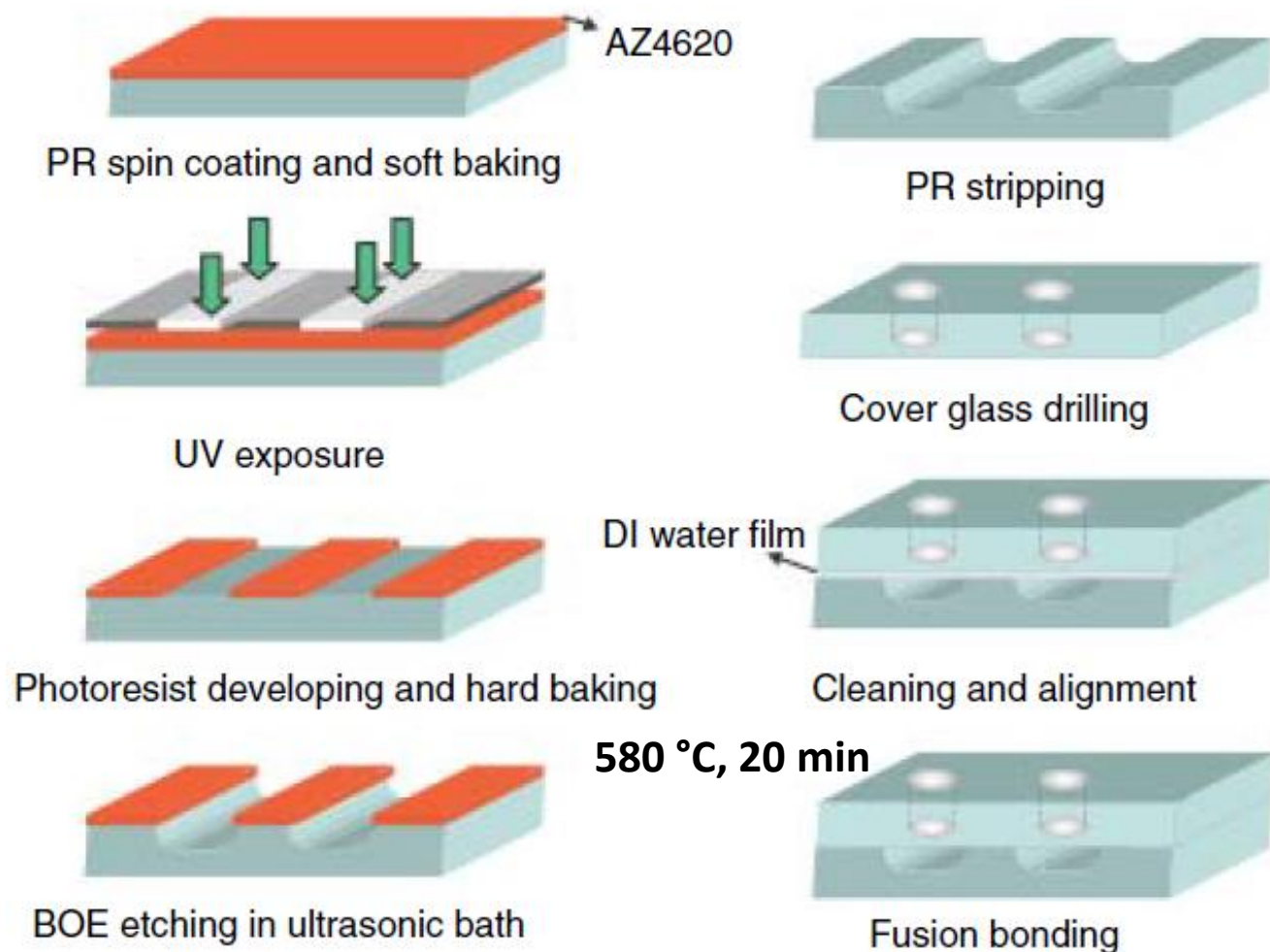
- H: 10-50 μm
- W: 50-100 μm
- Csatorna forma: négyszögletű, négyzet, háromszög, fél-ellipszoid
- Injektálás: 1 kV
- Elválasztás: 3 kV
- Optikai detektálás: fluoreszcencia



Chipek előállítása

- Alapanyag:

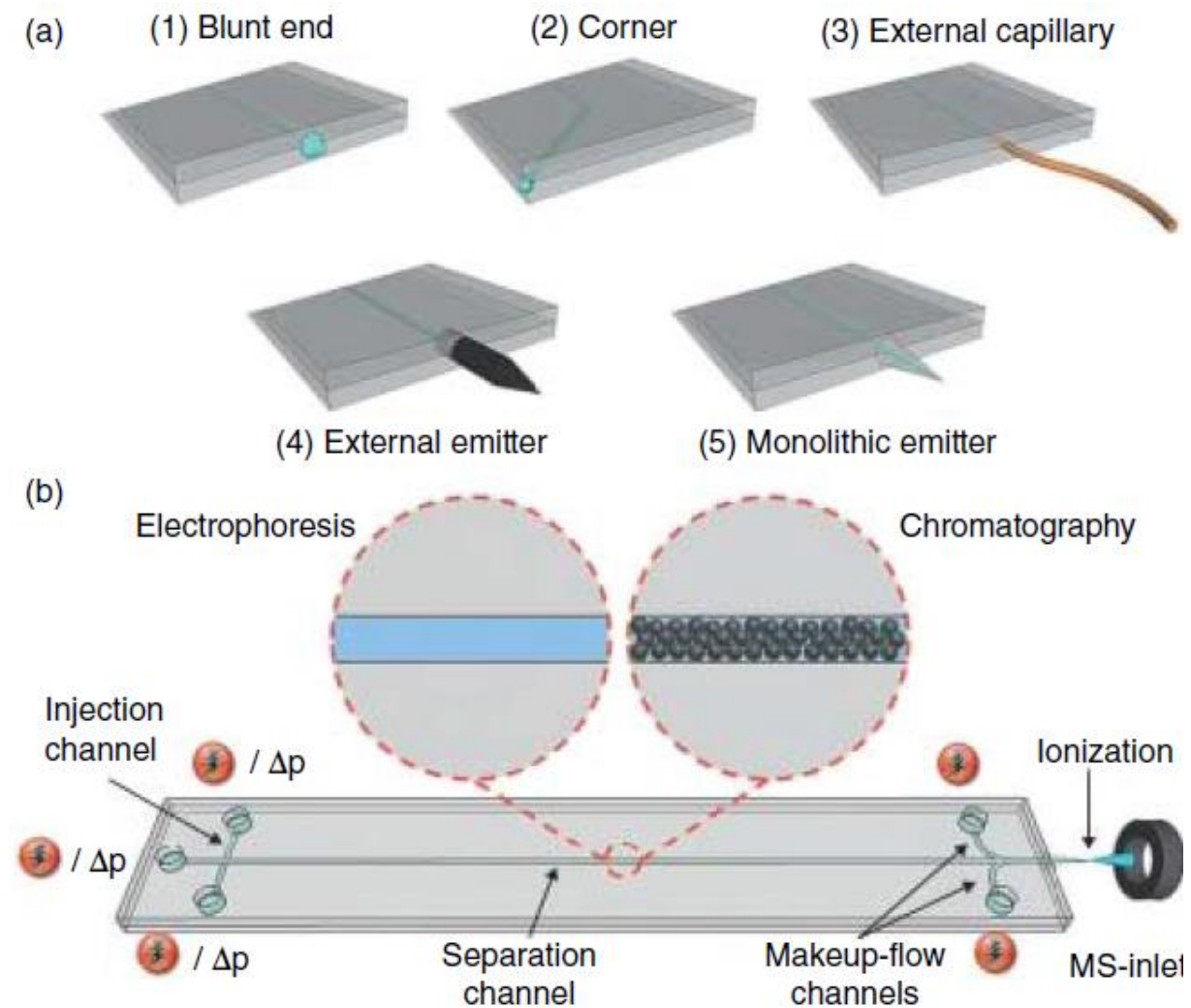
- Üveg
- Kvarc
- PDMS (polidimetilsziloxán)
- PMMA (polimetilmetakrilát)
- PI (poliimid)
- PC (polikarbonát)
- Ciklikus olefin polimer (COP)



BOE: buffered oxide etch (pl. $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$)

MCE-MS

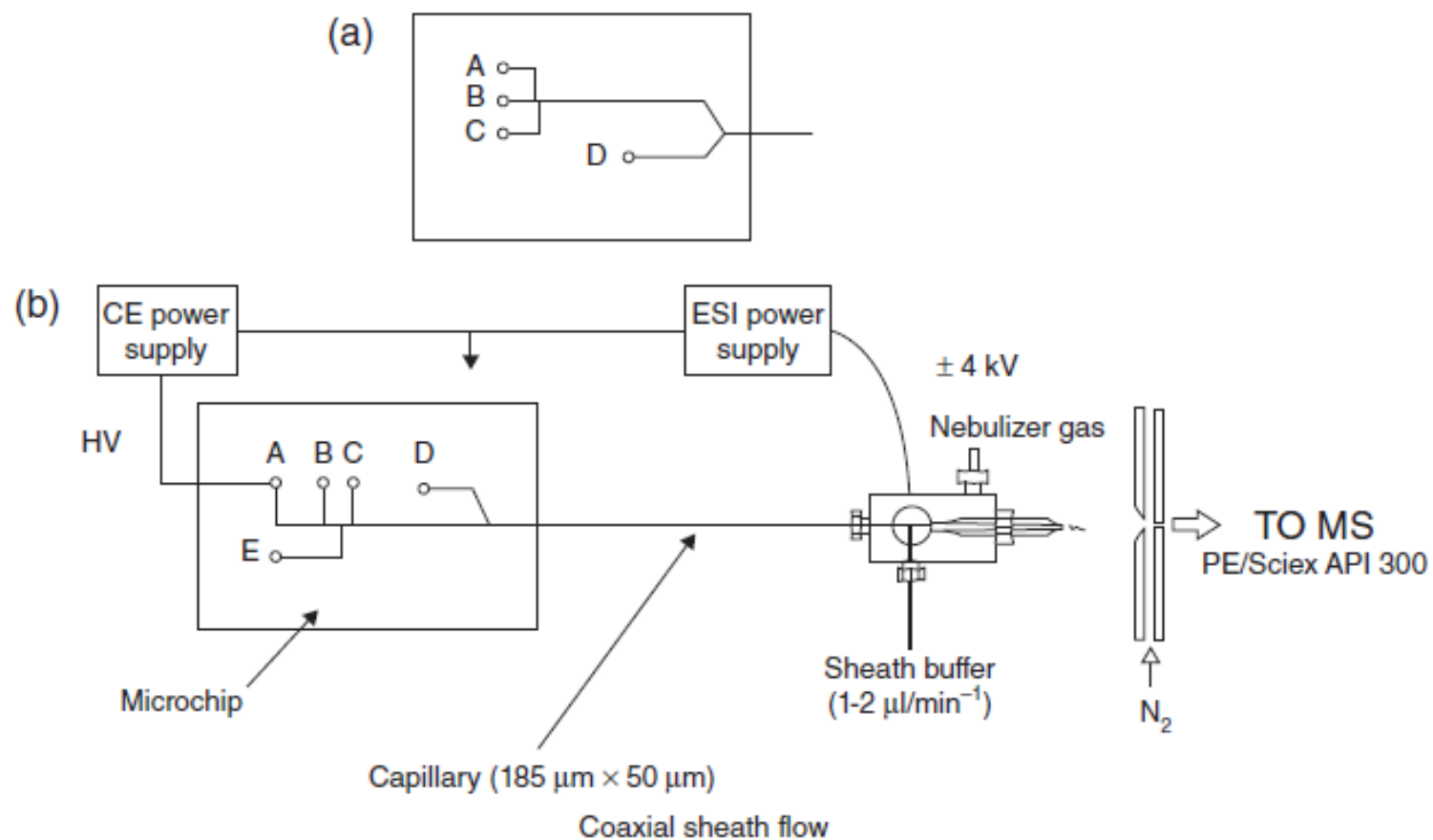
- Folyadék kiáramlás: szűk „kijáraton” keresztül (pl. tű)
- Make-up flow: segéd folyadék adagolás, elektromos csatlakozások



Ohla, S. and Belder, D. (2012) Chip-based separation devices coupled to mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 453–459.

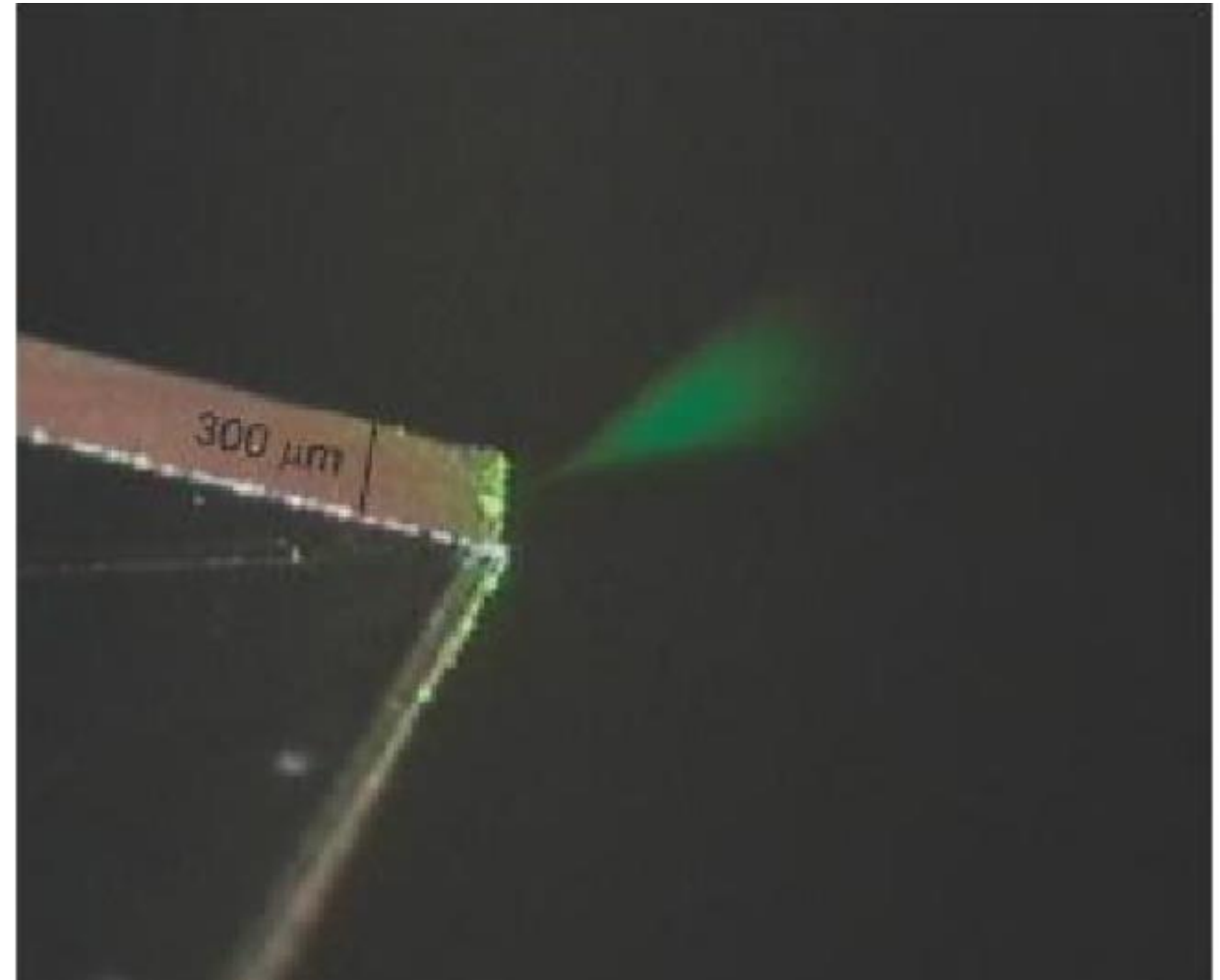
CE-MS átalakítása MCE-MS-sé

- CE tápegység használata chip tápegységként



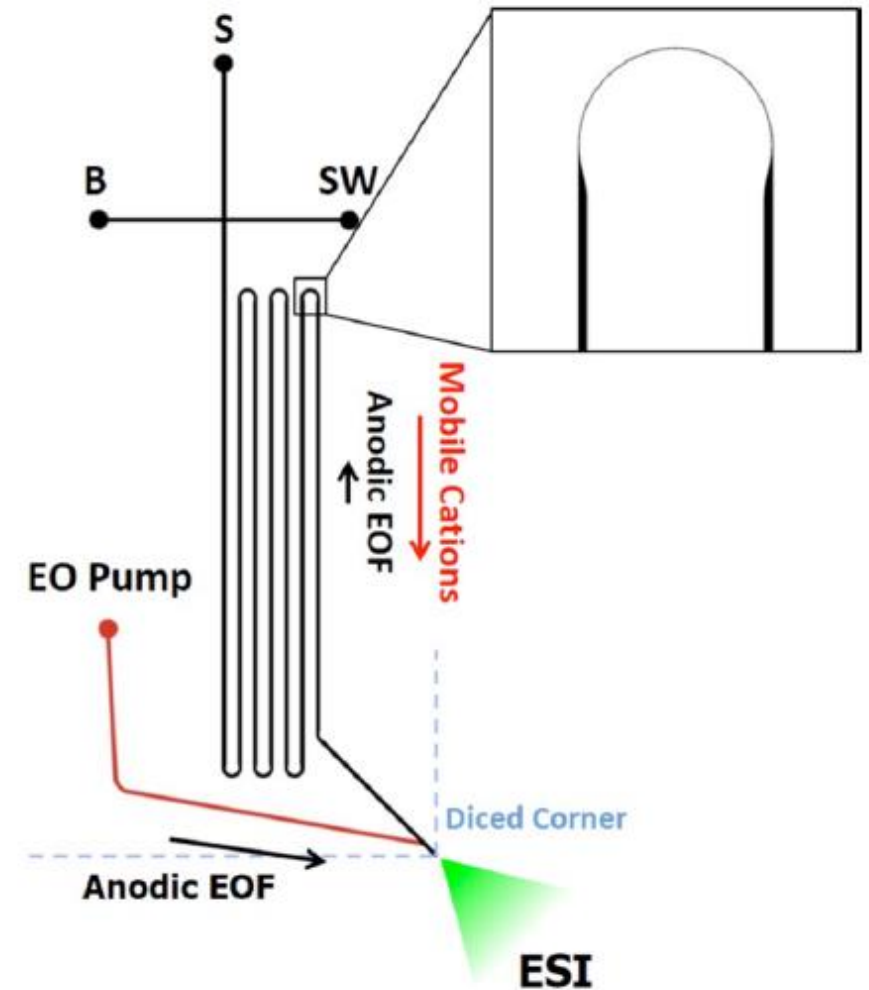
Sprayer kialakítása chip sarkán

- Oldalt a folyadék szétterül az üvegen (felületi feszültség)
- Nyilak: folyadék áramlását jelölik
- S: minta
- B: puffer
- SW: minta ki
- SC: oldalcsatorna (elektród)
- Spray: ~40 nL/min
- Monoklonális antitestek (mAbs) vizsgálata



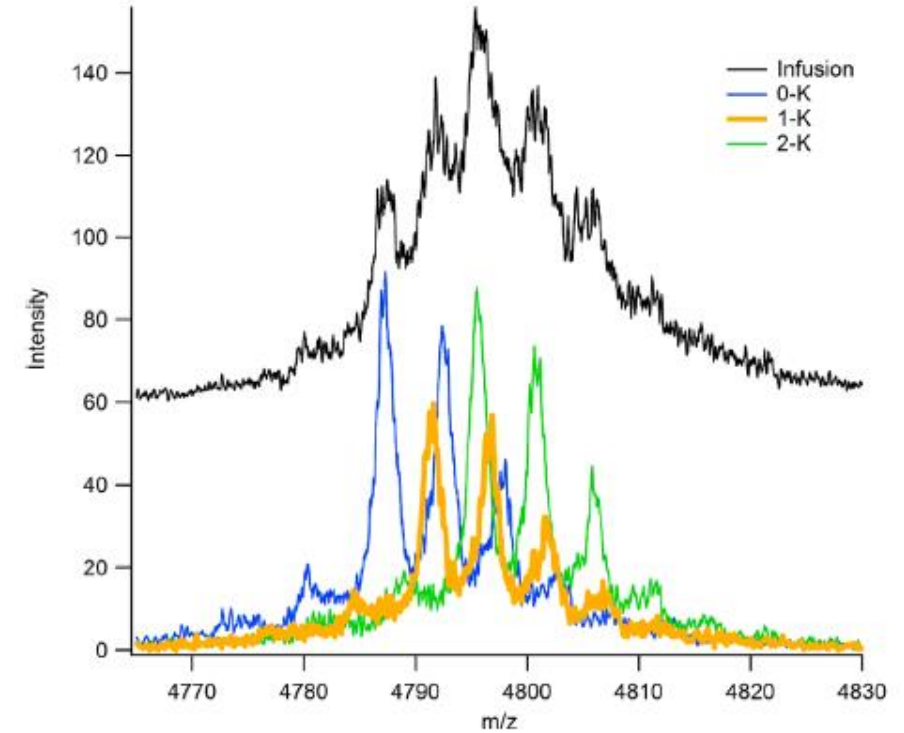
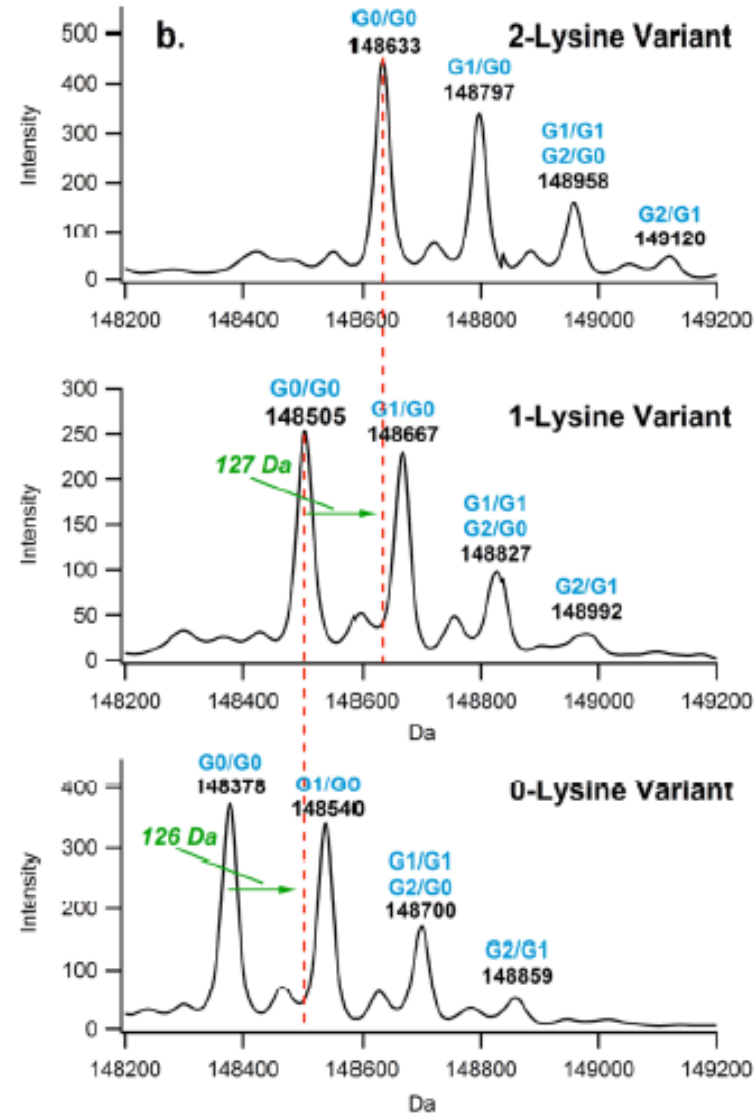
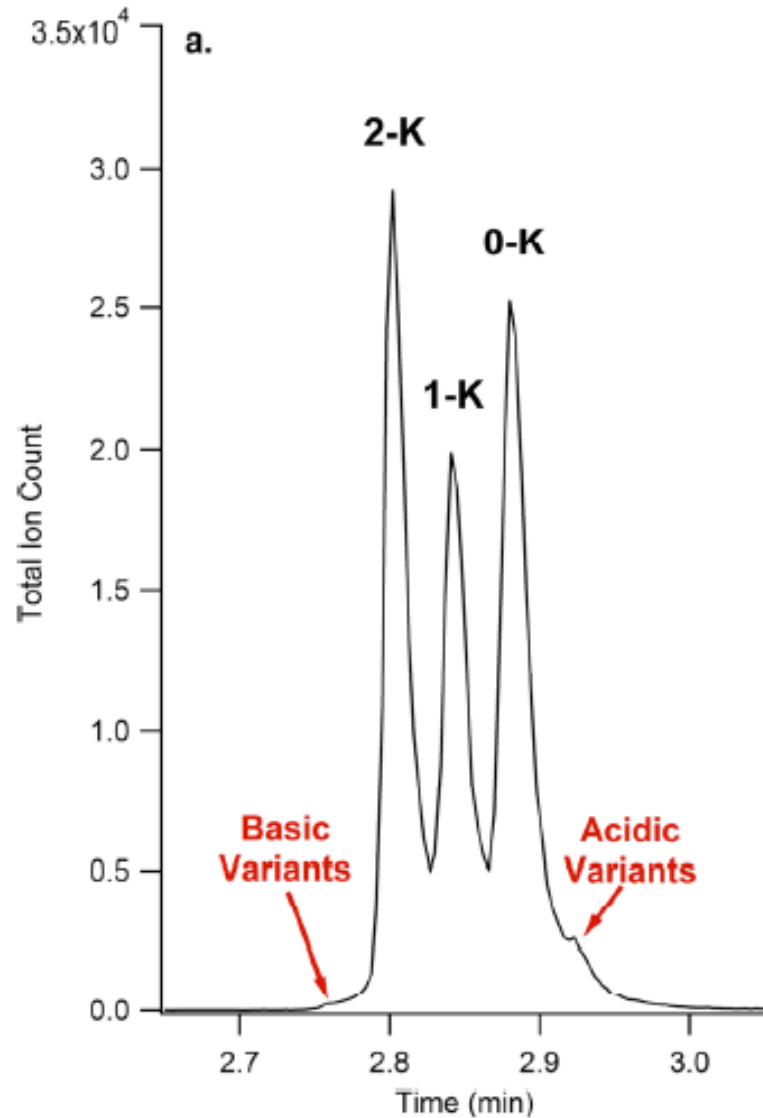
Infliximab (mAb) vizsgálata chipen

- Elválasztó csatorna: 23 cm
- Piros csat.: aminopropilszilán (APS) bevonat
- Fekete csat.: APS-PEG₄₅₀ bevonat



Redman, E.A., et al. (2015) Integrated microfluidic capillary electrophoresis–electrospray ionization devices with online MS detection for the separation and characterization of intact monoclonal antibody variants. *Anal. Chem.*, **87**, 2264–2272.

Infliximab (mAb) vizsgálata chipen



vs. elválasztás nélkül

CIEF chipen – MS detektálással

Chip anyaga: SU-8 – speciális EOF, magas pH-n katód (-) irányú, alacsony pH-n anód (+) irányú

Nettó EOF ~ 0 (fókuszálás alatt)

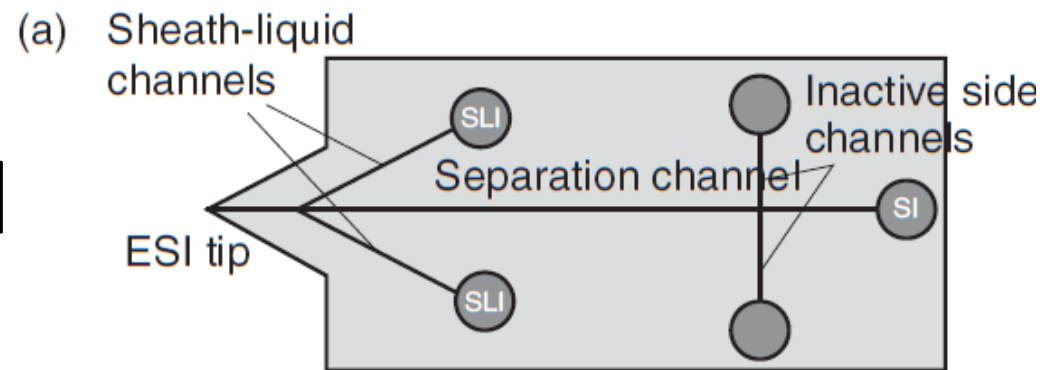
(a): minta: peptidek

2% amfolit (pH=3-10)

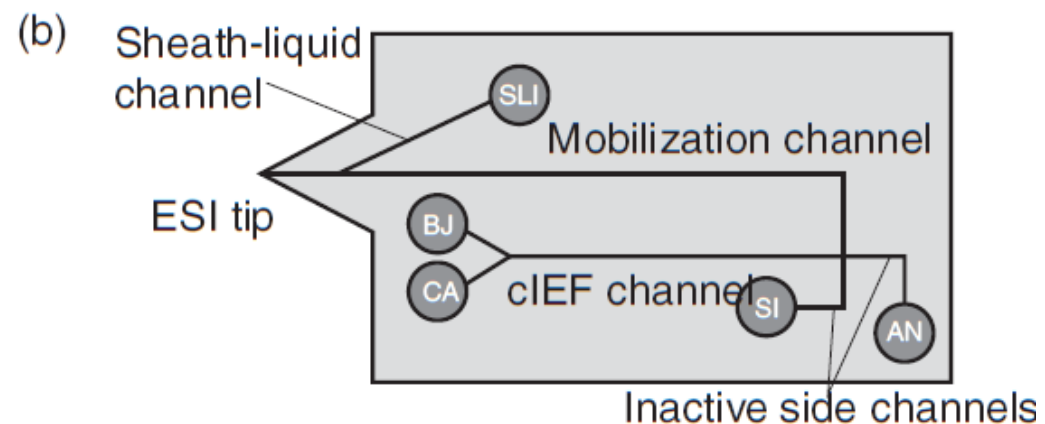
Oldalcsat.: MeOH/víz/1% AcOH (anolit)

Injektálás után inlet megtöltése 1% NH_4OH -val (katolit)

Fókuszálás után inleten oldatcsere BGE-ra - mobilizálás



Steps	SI	SLI	SLI
Focusing (60 s)	Ground	6.0 kV	6.0 kV
Mobilization	4.0 kV	2.0 kV	2.0 kV

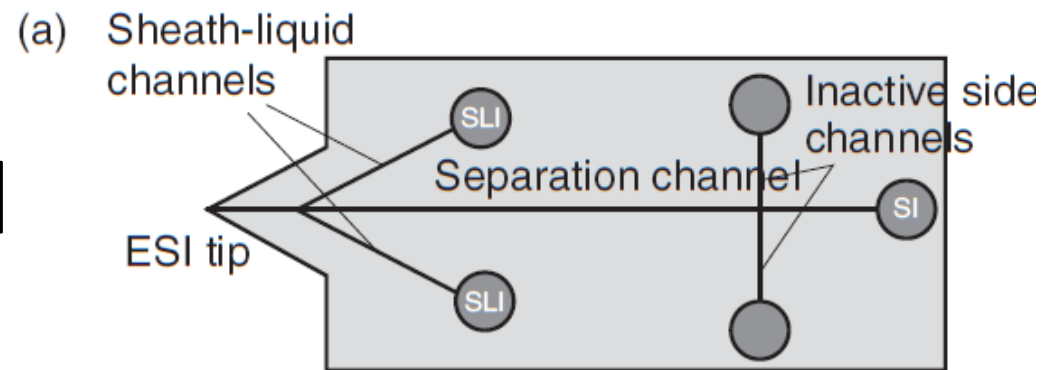


Steps	BI	CA	SI	AN	SLI
Loading (100–120 s)	Ground	Float	1.5–3 kV	Float	Float
eIEF (200–270 S)	Float	Ground	Float	1.5–6 kV	Float
Mobilization	6 kV	Float	Float	Float	3.5 kV

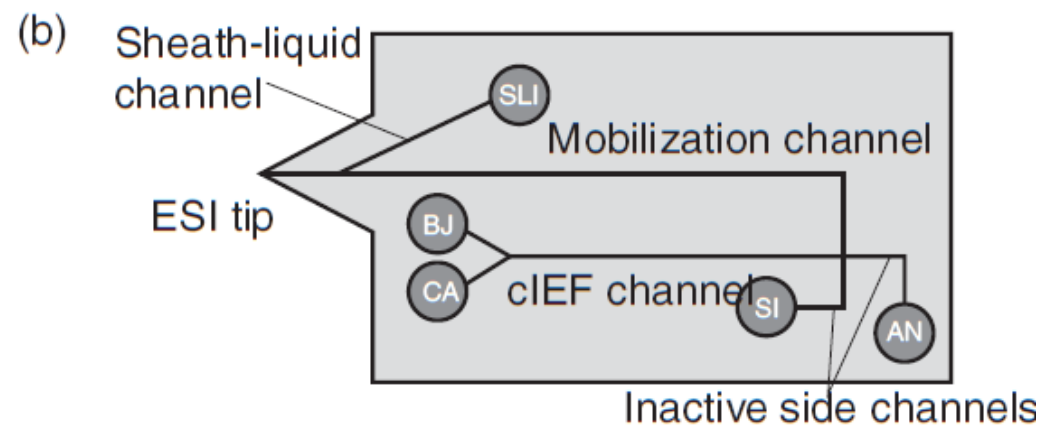
Nordman, N., et al. (2015) Interfacing microchip isoelectric focusing with on-chip electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **1398**, 121–126.

CIEF chipen – MS detektálással

(b) Külön csatornában van az IEF és a mobilizálás, így nem kell cserélni az inlet tartóban a puffert



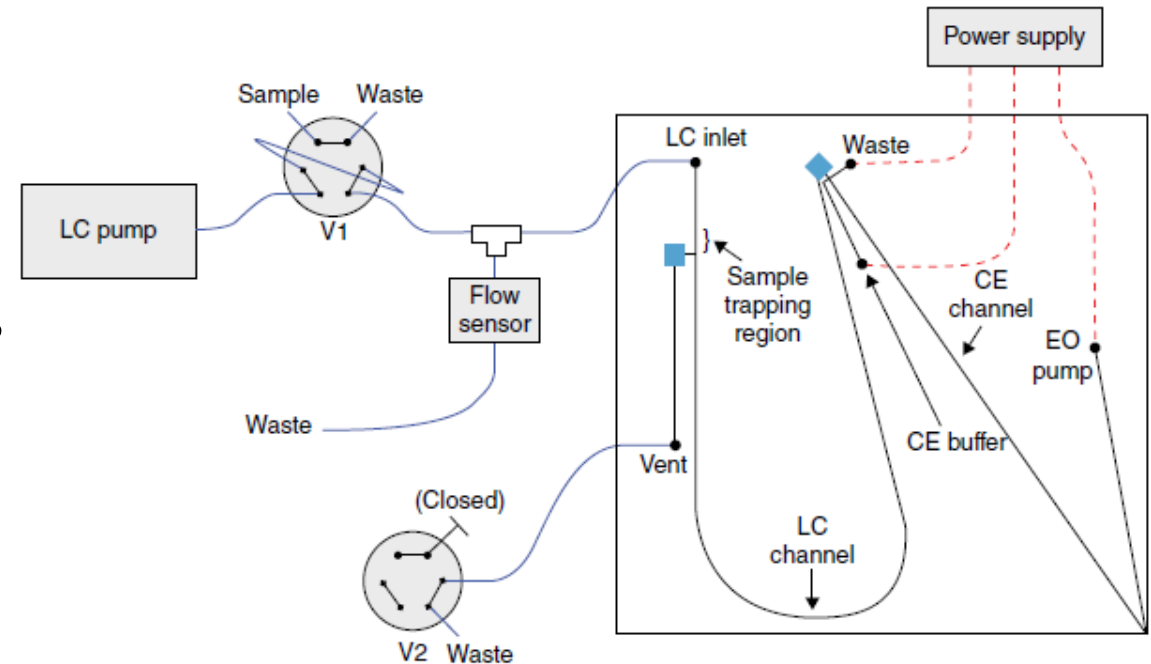
Steps	SI	SLI	SLI
Focusing (60 s)	Ground	6.0 kV	6.0 kV
Mobilization	4.0 kV	2.0 kV	2.0 kV



Steps	BI	CA	SI	AN	SLI
Loading (100–120 s)	Ground	Float	1.5–3 kV	Float	Float
eIEF (200–270 S)	Float	Ground	Float	1.5–6 kV	Float
Mobilization	6 kV	Float	Float	Float	3.5 kV

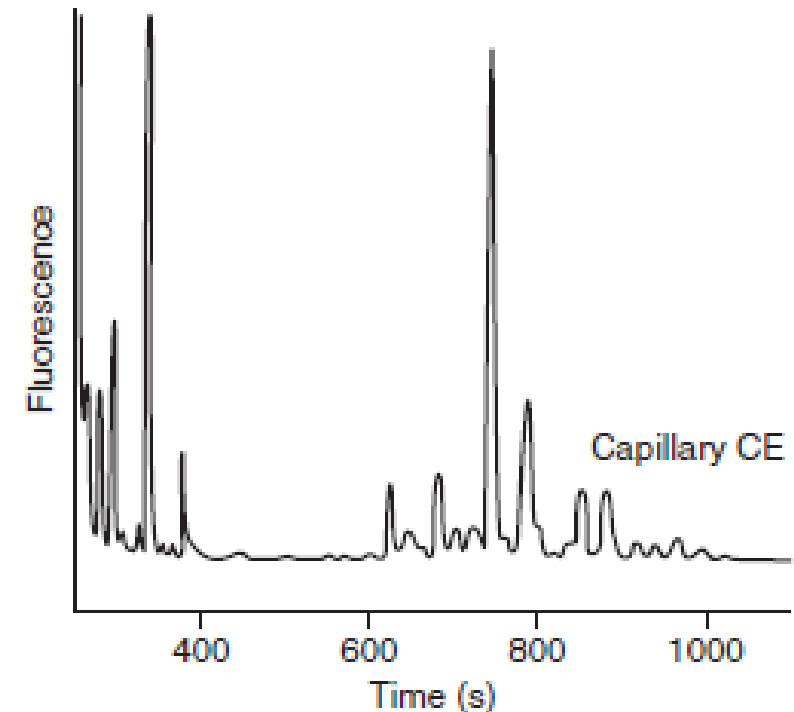
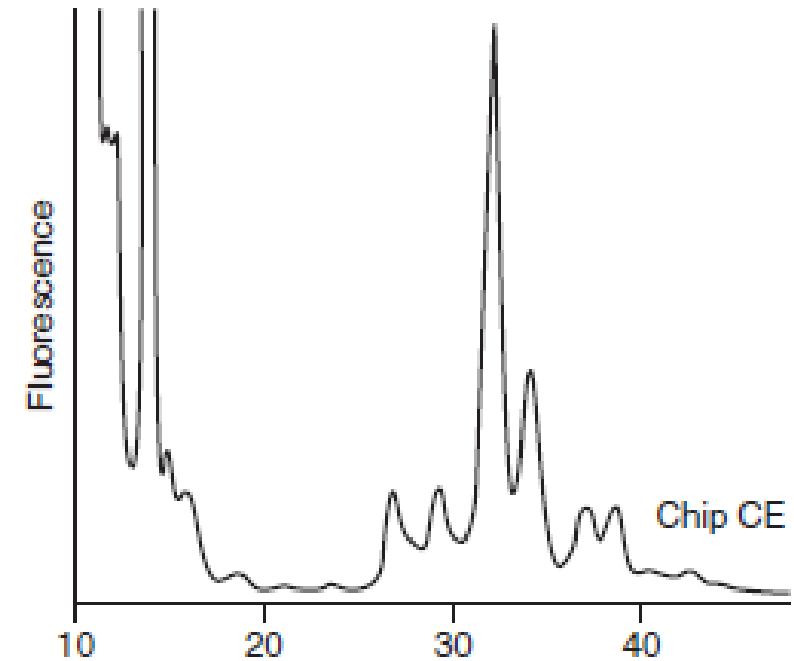
2D chip (LC-CE-MS)

- LC-n elválasztott komponensek CE elválasztó csatornába jutnak
- Problémák
 - Nehéz és időigényes töltetkialakítás
 - Limitált nyomástűrés (üveg chip, 200 bar)
 - LC csatorna emiatt a „chipen kívül”
 - Flow splitter: folyadék 1/3-a kerül a CE csatornába



Konklúzió – MCE(-MS)

- Kevésbé elterjedt
- Rövidebb csatorna hosszak (CE-hez képest), emiatt rosszabb elválasztás
- (lásd APTS-jelölt glikánok elválasztása CE készüléken – L=35 cm és az Agilent Bioanalyzer készüléken – L=1,4 cm)
- MCE: nehéz automatizálni
- Detektálási problémák (kivételet az MS – ez hozhat áttörést)
- Kereskedelmi készülékek 1-1 speciális analitikai feladatot látnak el



Mintadúsítási technikák

Online mintadúsítás

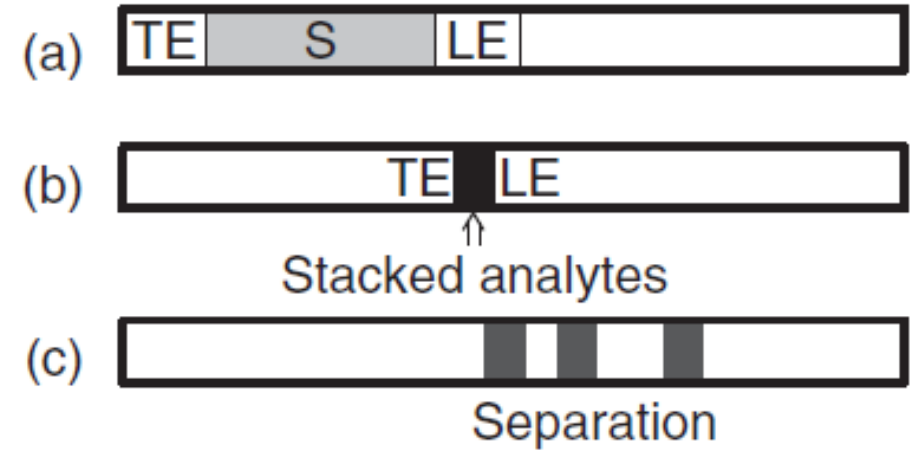
- Injektált minta nL-es nagyságrendű – relatíve rossz érzékenység
- Offline mintadúsítás: pl. folyadék-folyadék extrakció, SPME
- Online mintadúsítás
 - Injektált mennyiség min. 10-szerese a szokásosnak
 - Elektrokinetikus dúsítás: a mintazónák sebessége eltérő a mintamátrixban és az elválasztó pufferben, amiért pl. a két közeg ionerőssége/vezetőképessége (ill. azok különbözősége) felel
 - Kromatográfiás dúsítás: SPE oszlop online integrációja a CE kapillárisba

Technikák

- Tranziens ITP (tITP)
- Erősített elektromos terű dúsítás (field-enhanced/field amplified stacking)
- Erősített elektromos terű mintainjektálás (FESI)
- Dinamikus pH-csatlakozás (pH-junction)
- cIEF
- Elektrokromatográfiás dúsítások:
 - Sweeping
 - Micella megszüntetésen alapuló (micelle collapse)
 - Micelle-to-solvent-stacking
 - Online/Inline SPE

Elektroforetikus dúsítás – tranziens izotachoforézis (t-ITP)

- Akár 100x dúsítási faktor elérhető
- Ionos és ionizálható komponensek
- Leading és terminating elektrolitok (LE és TE)
- LE: nagy mobilitású ion
- TE: kis mobilitású ion
- Minta komponensei mobilitás szerinti csökkenő sorrendbe helyezkednek feszültség hatására
- Tranziens: az ITP effektus csak rövid ideig tart. Dúsítás után azonnal megindul a zónák elválasztása



CE-MS kompatibelis ionok

Table 5.1 Ionic species suitable for CE-MS and their pK_a values and ionic mobilities.

	$u^a)$	pK
H^+	362.5	–
NH_4^+	76.2	9.25
Imid ⁺	52.0	7.15
OH^-	–202.5	–
$Form^-$	–56.6	3.75
Ac^-	–42.4	4.76
HCO_3^-	–46.1	6.35
CO_3^{2-}	–71.8	10.33
$EACA^-$	–28.8	10.8
MES^-	–28	6.1
Asn^-	–31.6	9.03

a) $\ln 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

t-ITP példa 1. – peptidek detektálása

- Fehérjék koncentrációviszonyai 6 nagyságrendben váltakoznak emlős sejtekben
- 100 μm kapilláris
- Hidroxipropil-cellulóz bevonatú kapilláris
- BGE: 10 mM ecetsav, pH=3.0
- Leading el.: mintamátrix, 30 mM NH_4Ac
- Kis koncentrációjú peptidek szelektív dúsítása

An, Y., et al. (2006) Selective enrichment and ultrasensitive identification of trace peptides in proteome analysis using transient capillary isotachopheresis/zone electrophoresis coupled with nano-ESI-MS. *Electrophoresis*, 27 (18), 3599–3608.

t-ITP példa 1. – peptidek detektálása

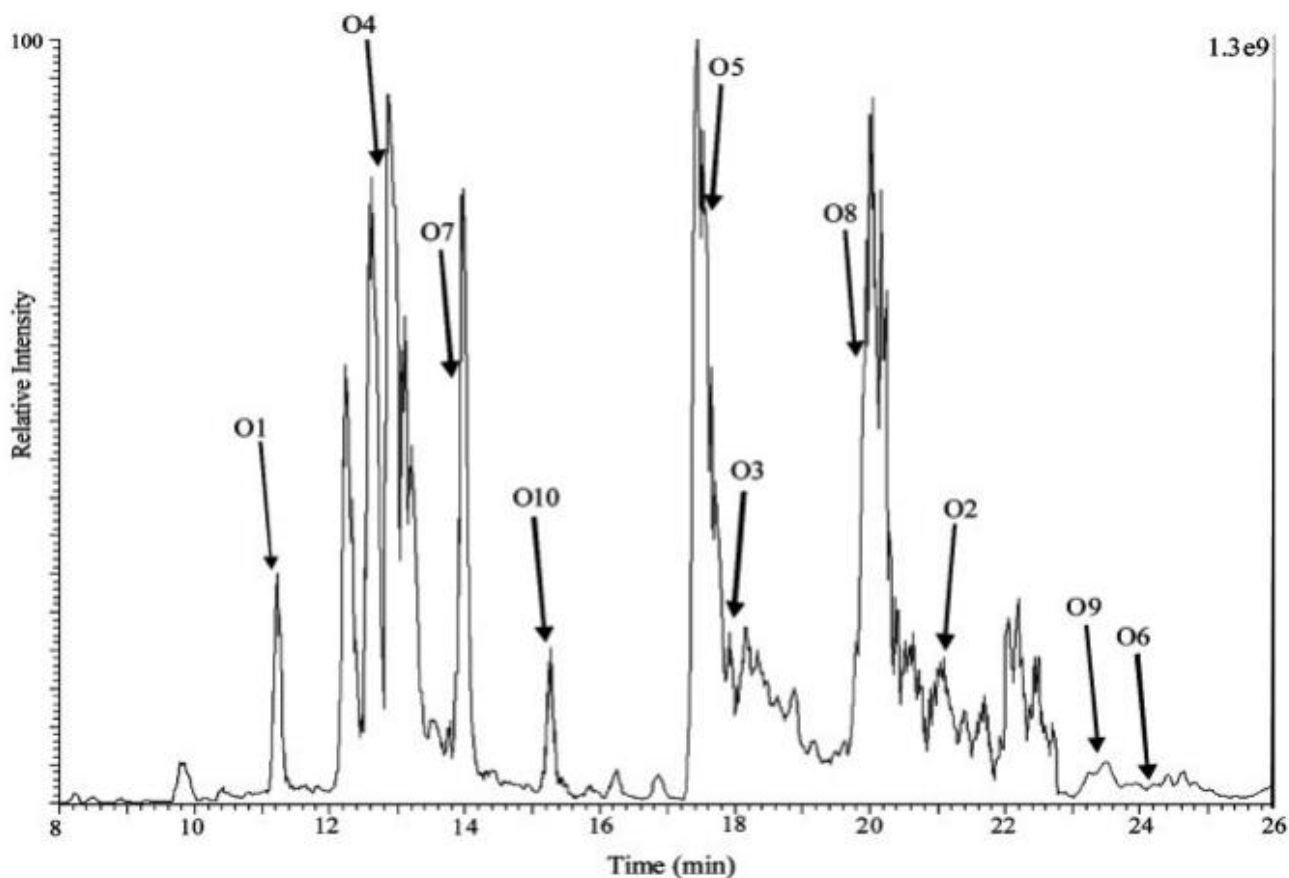


Figure 4. Base peak electropherogram for transient C1TP/CZE-nano-ESI-MS analysis of digest sample containing ovalbumin (0.1 nM) and cytochrome c (50 μ M) tryptic peptides at a concentration ratio of 1:500 000. Labeled ovalbumin peptides are summarized in Table 1.

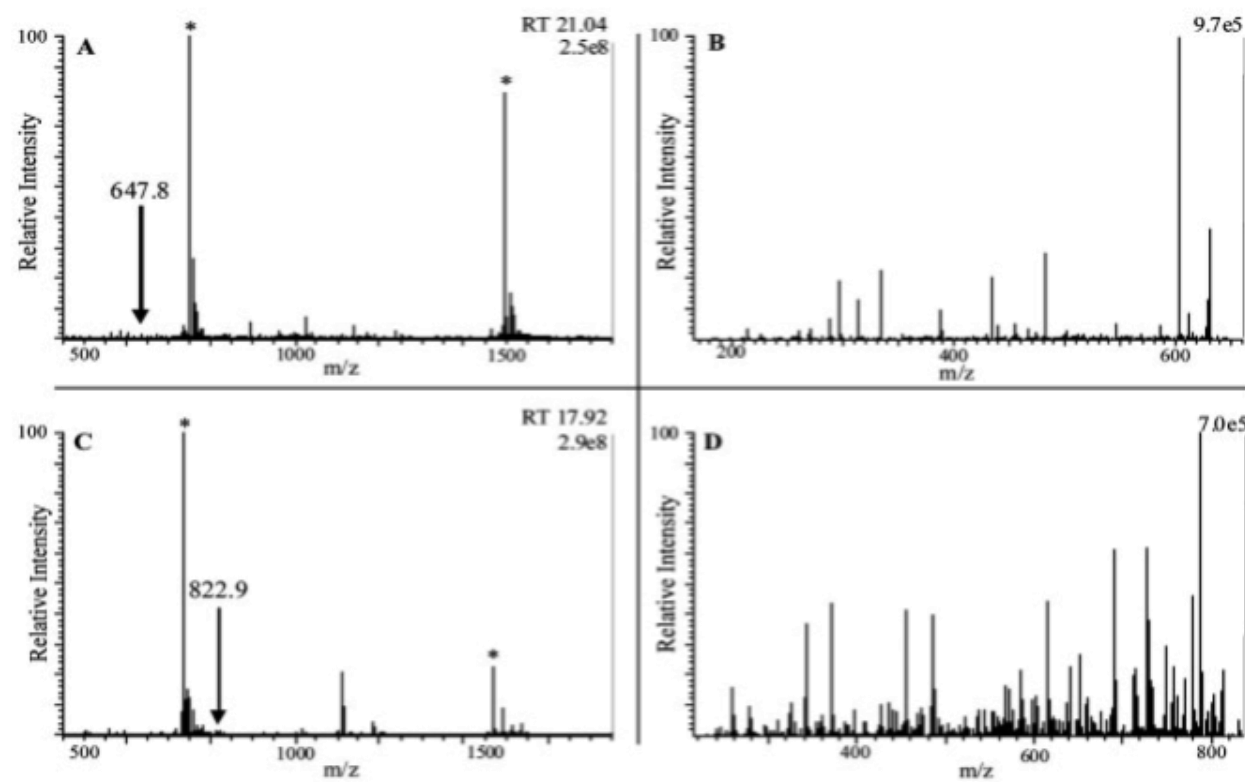


Figure 5. Positive ESI mass spectra taken from the average scans under the peaks with the migration times of (A) 21.04 min and (C) 17.92 min in transient C1TP/CZE-nano-ESI-MS (Fig. 4). The comigrating cytochrome c peptides, including the fragment 61–72 (m/z 748.6 and 1495.7) and fragments 40–53 (m/z 736.1 and 1470.6) are marked by *. (B) MS/MS on the ovalbumin fragment 281–285 with m/z 647.8. (D) MS/MS on the ovalbumin fragment 220–227 with m/z 822.9.

t-ITP példa 2. – peptidek detektálása

- Sima kvarckapilláris
- Leading electrolyte-ot 60 s 50 mbar-ral a minta elé injektálták
- LE: 50 mM NH₄Ac (pH=4.8)
- BGE: 50 mM HAc (pH=3.1)
- Mintamátrix: 25 mM Hac
- c: β-alanint használtak TE-ként

Xia, S., et al. (2008) On-line pre-concentration and quantitative analysis of peptide hormone of brain and intestine using on-column transient isotachopheresis coupled with capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22** (23), 3719–3726.

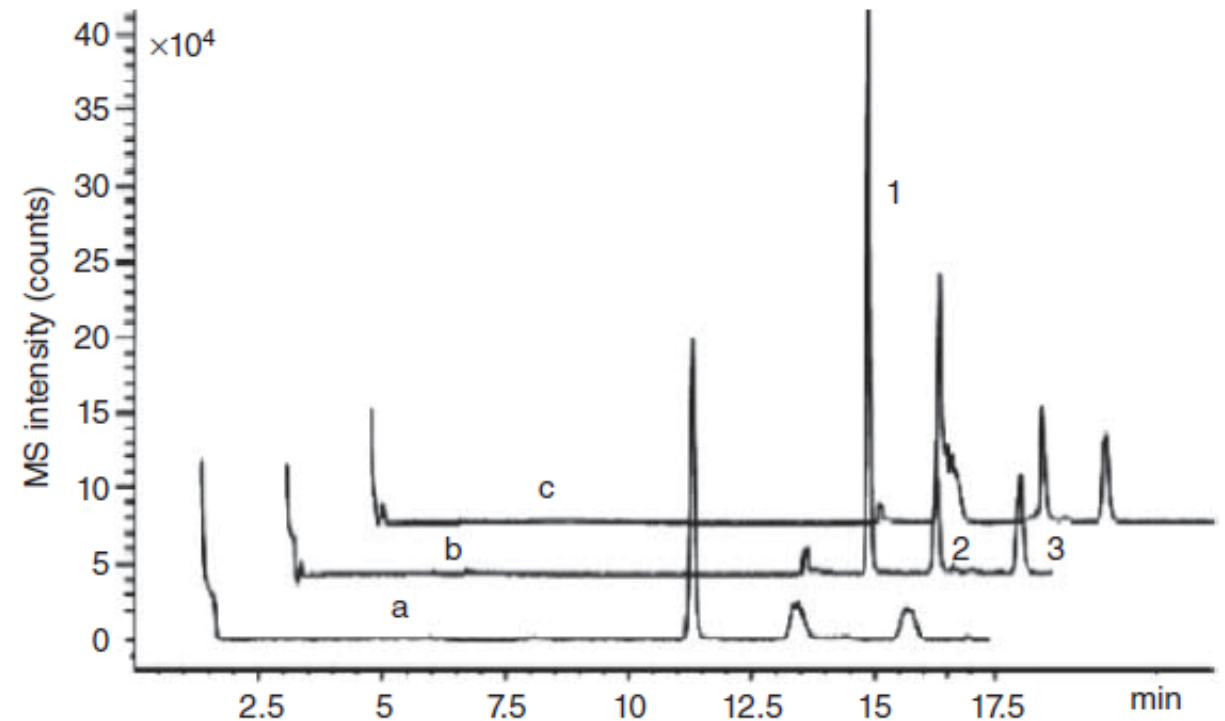
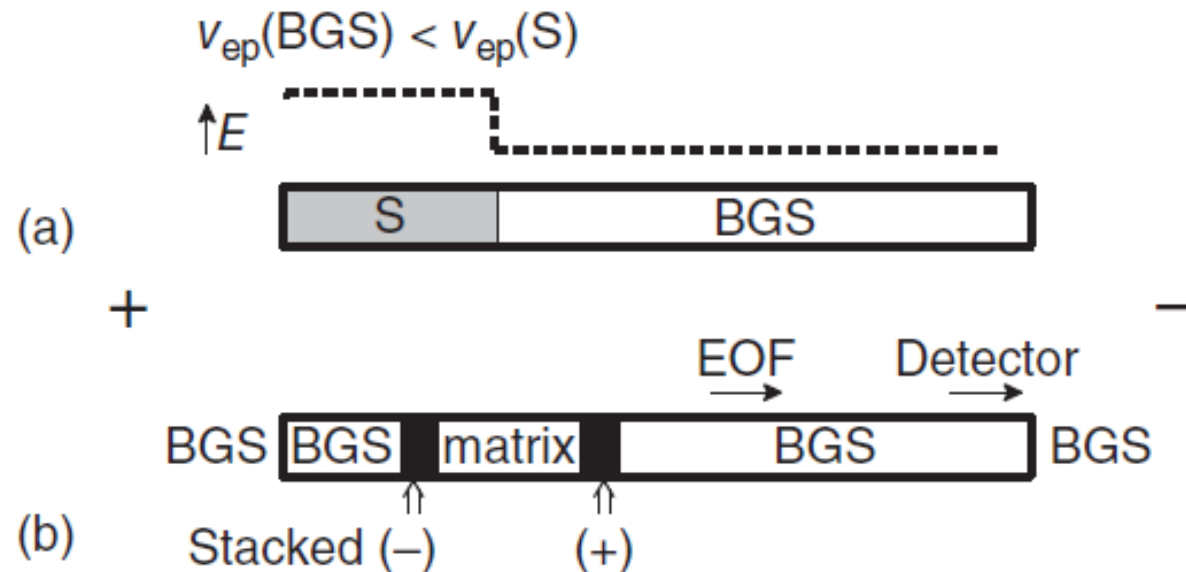


Figure 5.2 t-ITP CE-MS of cationic peptides. Conditions: Bare fused-silica capillary 104 cm × 50 mm; Separation voltage, 25.0 kV; LE, 50 mM ammonium acetate (pH 4.8); Separation electrolyte, 50 mM acetic acid (pH 3.1); Sample, the three peptides mixture in 25 mM acetic acid; Sample injection, 28 kV for 40 s; (a) Without t-ITP; (b) t-ITP with H⁺ as terminating ion where 50 mM ammonium acetate

(pH 4.8) was injected (50 mbar for 60 s) prior to sample injection; (c) t-ITP with β-alanine as terminating ion where 50 mM ammonium acetate (pH 4.8) was injected (60 s at 50 mbar) prior to sample injection, 40 mM β-alanine (pH 3.6 with acetic acid) was then injected (50 mbar for 20 s). Reproduced from Xia *et al.* [17] with permission of Wiley.

Field-enhanced („elektromos térrel segített”) dúsítás

- Mintamátrix vezetőképessége jóval kisebb, mint a BGE-é
- Vezetőképességi inhomogenitás (=elektromos tér inhomogenitás) a kapillárisban
- A mintazóna két végén dúsulnak a minták
- A dúsítási faktor kb. a vezetőképességek aránya (max. 10, az EOF inhomogenitása miatt, ami csúcshéledést okoz.)



Field-enhanced sample injection

- Elektrokinetikus injektálás
- Jóval kevesebb megy be az alacsony vezetőképességű mátrixból
- >100x dúsítás érhető el

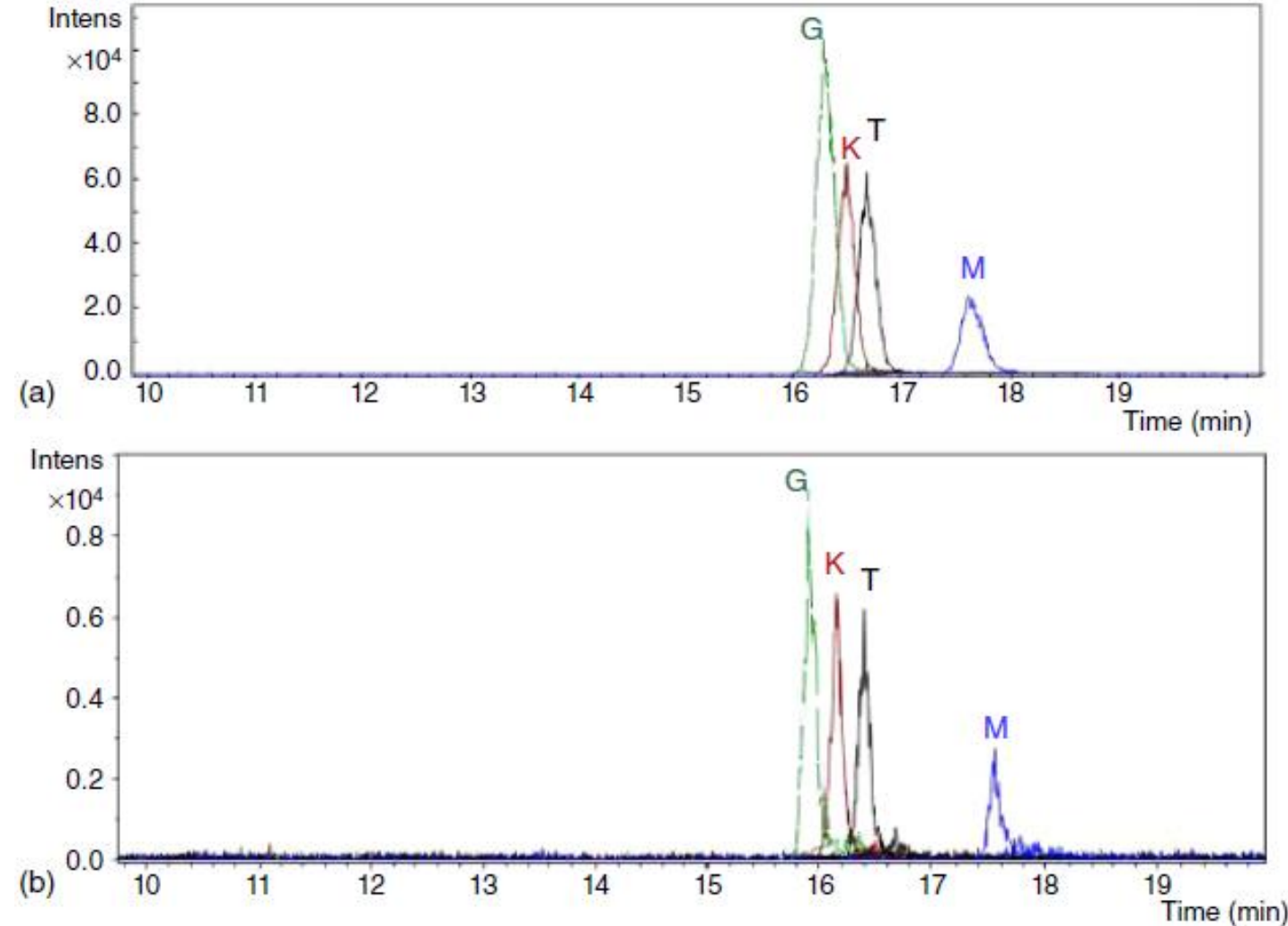


Figure 5.5 Overlaid extracted ion electropherograms of 50 mg kg^{-1} butyl 1-(pyridinyl-4yl) piperidine 4-carboxylate derivative test mixture of potentially genotoxic alkyl halides (G, K, T, and M) using FESI at 10 kV for 150 s

(a) of 500 mg kg^{-1} BPPC derivative test mix using typical hydrodynamic injection (b). Reproduced from van Wijk *et al.* [34] with permission of Elsevier.

Dinamikus pH-csatlakozás (pH-junction)

- Izoelektromos fókuszáláshoz hasonló elv
- Mintazóna és BGE határán nagy pH ugrás
- Pl. enyhén savas komponensek elválasztása (következő oldali példa ellentettje)
 - BGE lúgos; Mintamátrix: enyhén savas (analit semleges)
 - BGE „elkezdni titrálni” a mintamátrixot a katód felőli végén, ami miatt a határon nő a pH
 - Ionizálódik a komponens (-), ami „visszafelé” áramlik a savas mátrixba, ahol újra semleges lesz
 - Ez addig folytatódik, míg az OH^- teljesen semlegesíti a mátrixban lévő H^+ -t
 - A dúsult zónából elindul a CZE elválasztás

pH-junction példa 1.

- Gyengén bázikus komponensek t-ITP dúsítása
- BGE: 25 mM NH_4Ac /30% MeOH (pH=9)
- Minta: triciklusos antidepresszánsok, 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Sav: 3,6% w/v (pH=2)
- Injektálás (minta, sav): 50 mbar x 60 s
- Dúsítás/elválaszthatóság függ az injektált sav c-től, V_{inj} -től

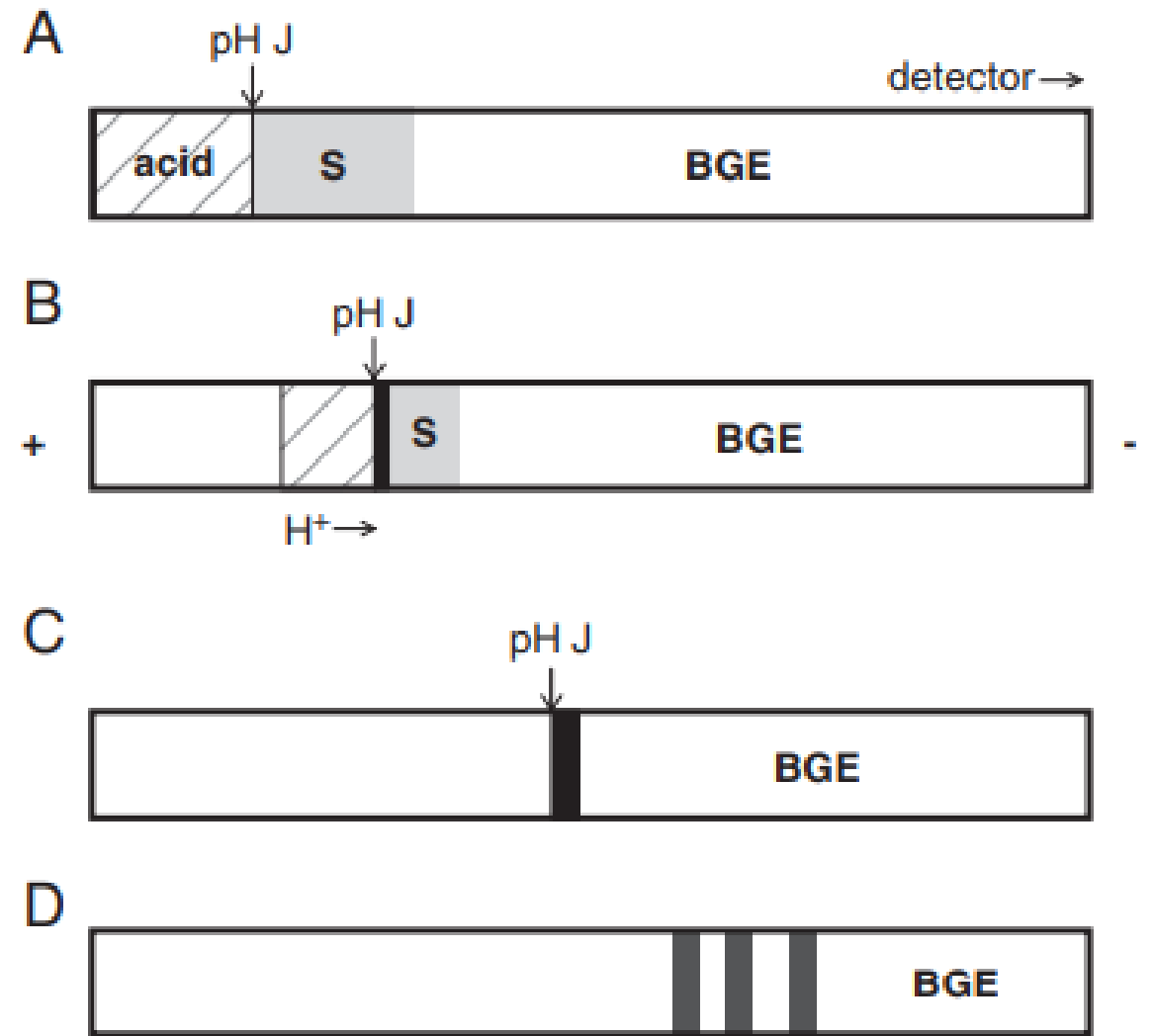
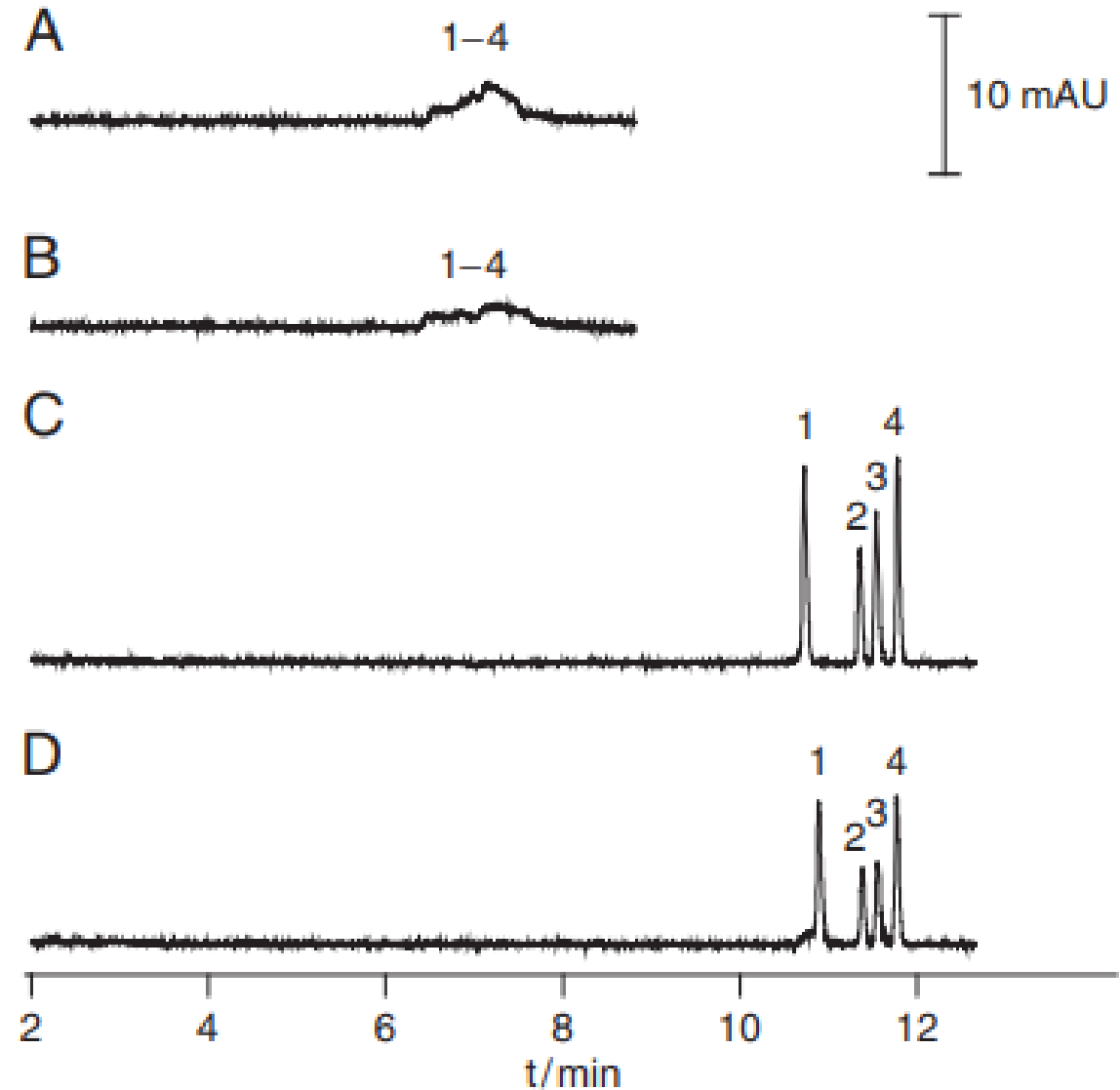


Figure 1. Acid induced or enforced [34–35] t-ITP stacking of weak bases in co-EOF CZE.

pH-junction példa 1.

- Gyengén bázikus komponensek t-ITP dúsítása
- BGE: 25 mM NH₄Ac/30% MeOH (pH=9)
- Minta: triciklusos antidepresszánsok, 1,2 µg/mL
- Sav: 3,6% w/v (pH=2)
- Injektálás (minta, sav): 50 mbar x 60 s
- Dúsítás/elválaszthatóság függ az injektált sav c-től, V_{inj}-től



Mintamátrix:

A, C: 25 mM NH₄Ac, pH=7

B, D: 25 mM NH₄Ac, pH=9

pH-junction példa 2.

- BGE: 0.5 M FA (pH=2.5)
 - Mintamátrix: 50 mM NH₄Ac (pH=7.5)
 - Inj.: 50 mbar x 300 s
 - Minta: 5 peptid, hasonló pI értékkel
 - LOD: 0,2-2 nM
-
- Minél nagyobb a pH különbség a BGE és mintamátrix között, ill. minél nagyobb a mátrix koncentrációja, annál jobb dúsulás!

pH-junction példa 2.

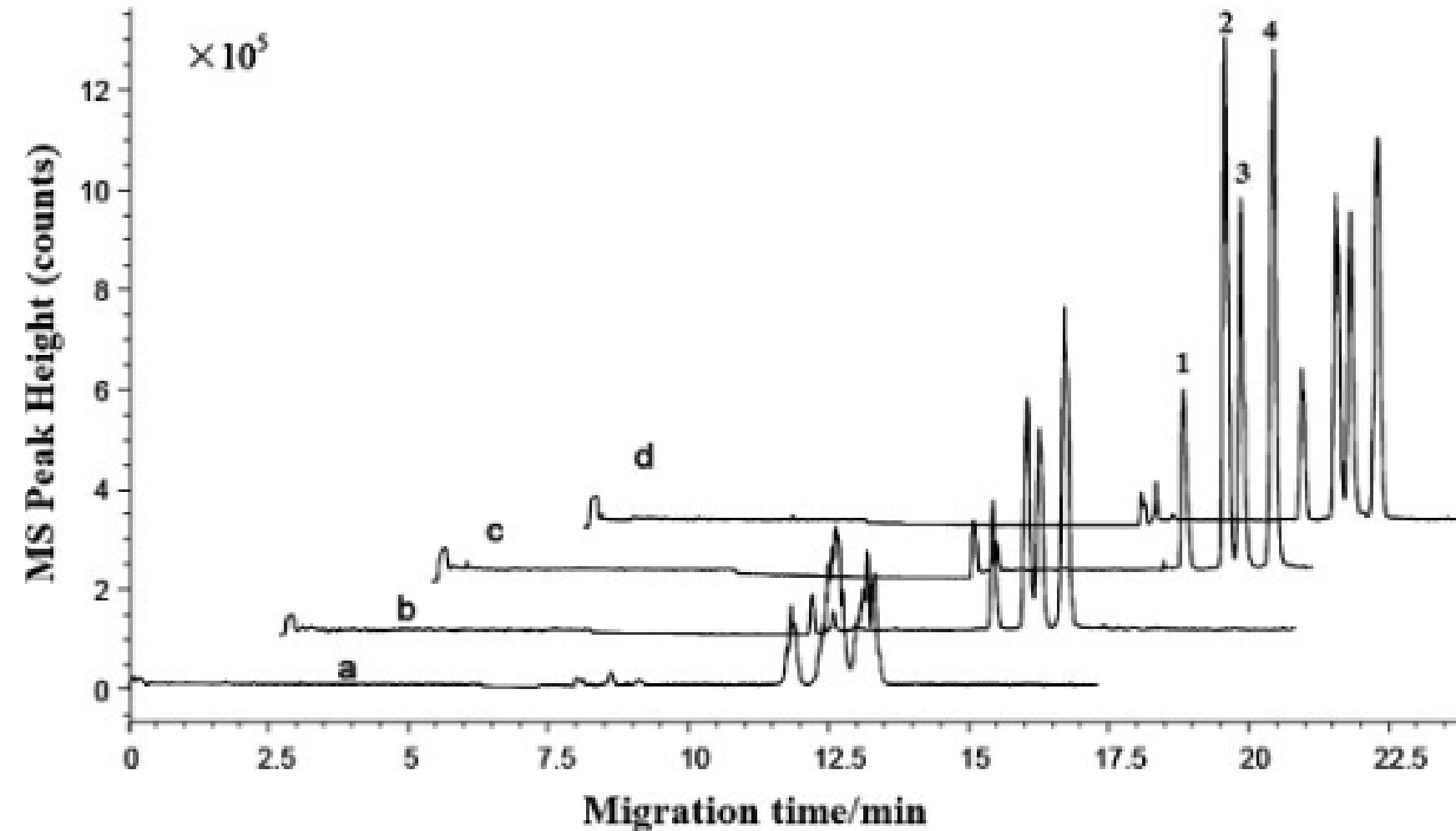


Figure 1. Effect of sample matrix pH on focusing conditions: Bare fused silica capillary 90 cm–50 μ m; BGE, 0.5 M formic acid (pH 2.15); sample matrix: ammonium acetate with pH varied as shown; injection, 30 s of a mixture containing 1 μ mol/L of each peptide, sheath liquid: 7.5 mM acetic acid in 50% methanol–water v/v, 4 μ L/min. Nebulizing gas pressure: 41.4 kPa; drying gas flow rate: 6 L/min, drying gas temperature: 300°C; (a) pH 4.0; (b) pH 6.0; (c) pH 7.5; (d) pH 9.0; (1) L-Ala-L-Ala; (2) L-Leu-D-Leu; (3) Gly-D-Phe; (4) Gly-Gly-L-Leu.

pH-junction példa 2.

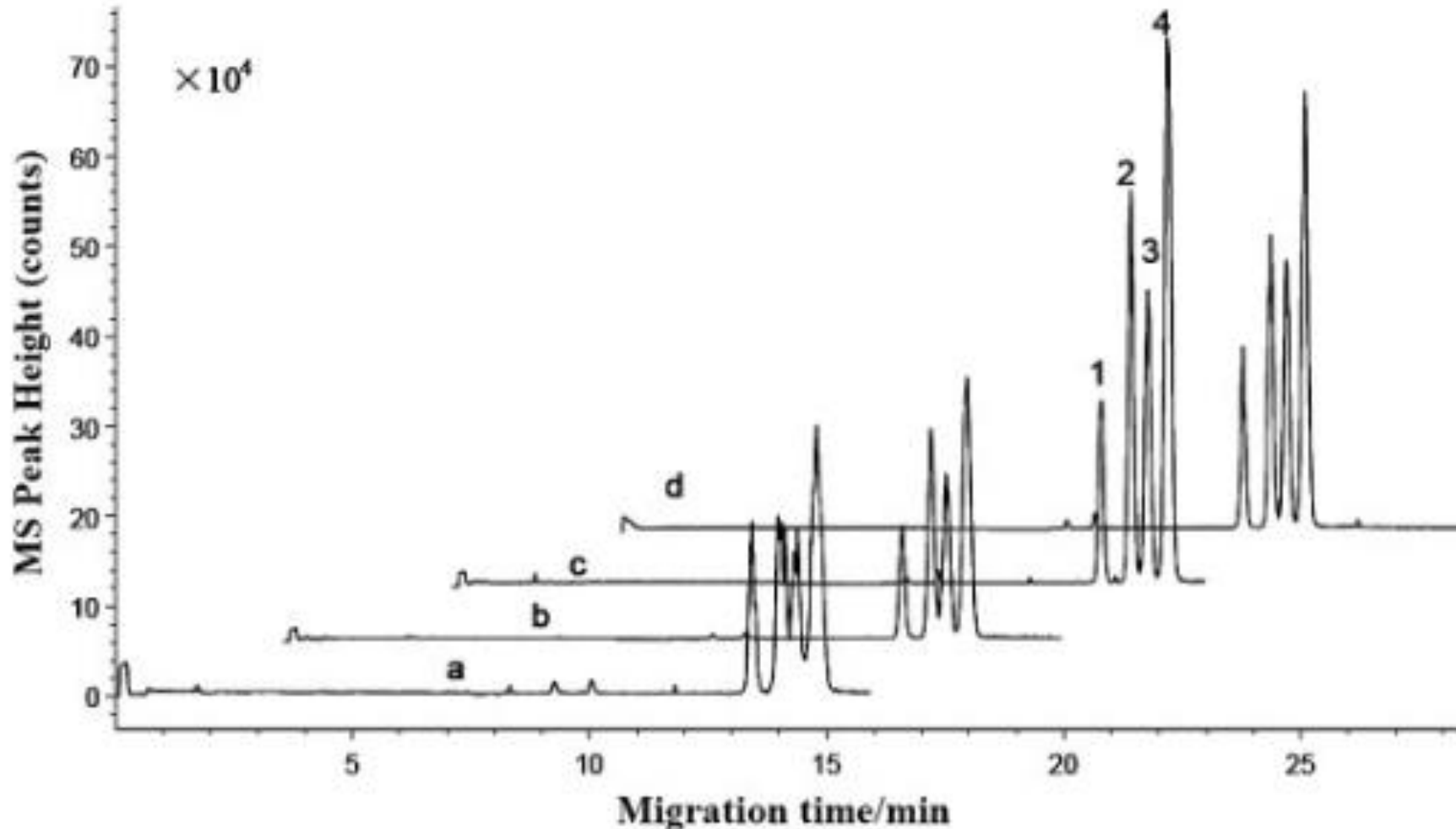
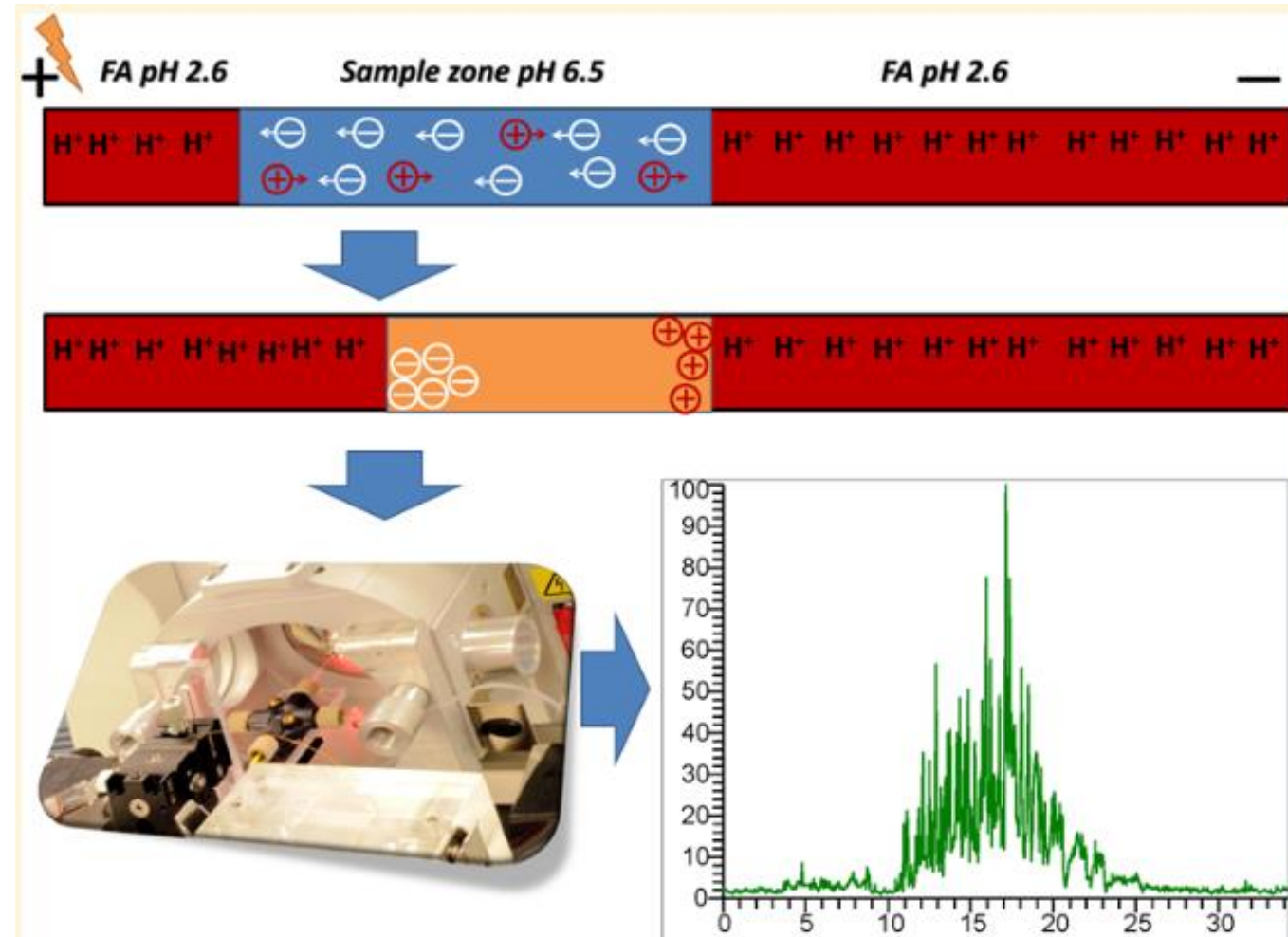


Figure 2. Effect of sample matrix concentration on focusing. Conditions were as in Fig. 1; sample matrix: ammonium acetate (pH 7.5) with concentration varied as shown; (a) 10 mM; (b) 25 mM; (c) 50 mM; (d) 75 mM; (1) L-Ala-L-Ala; (2) L-Leu-D-Leu; (3) Gly-D-Phe; (4) Gly-Gly-L-Leu.

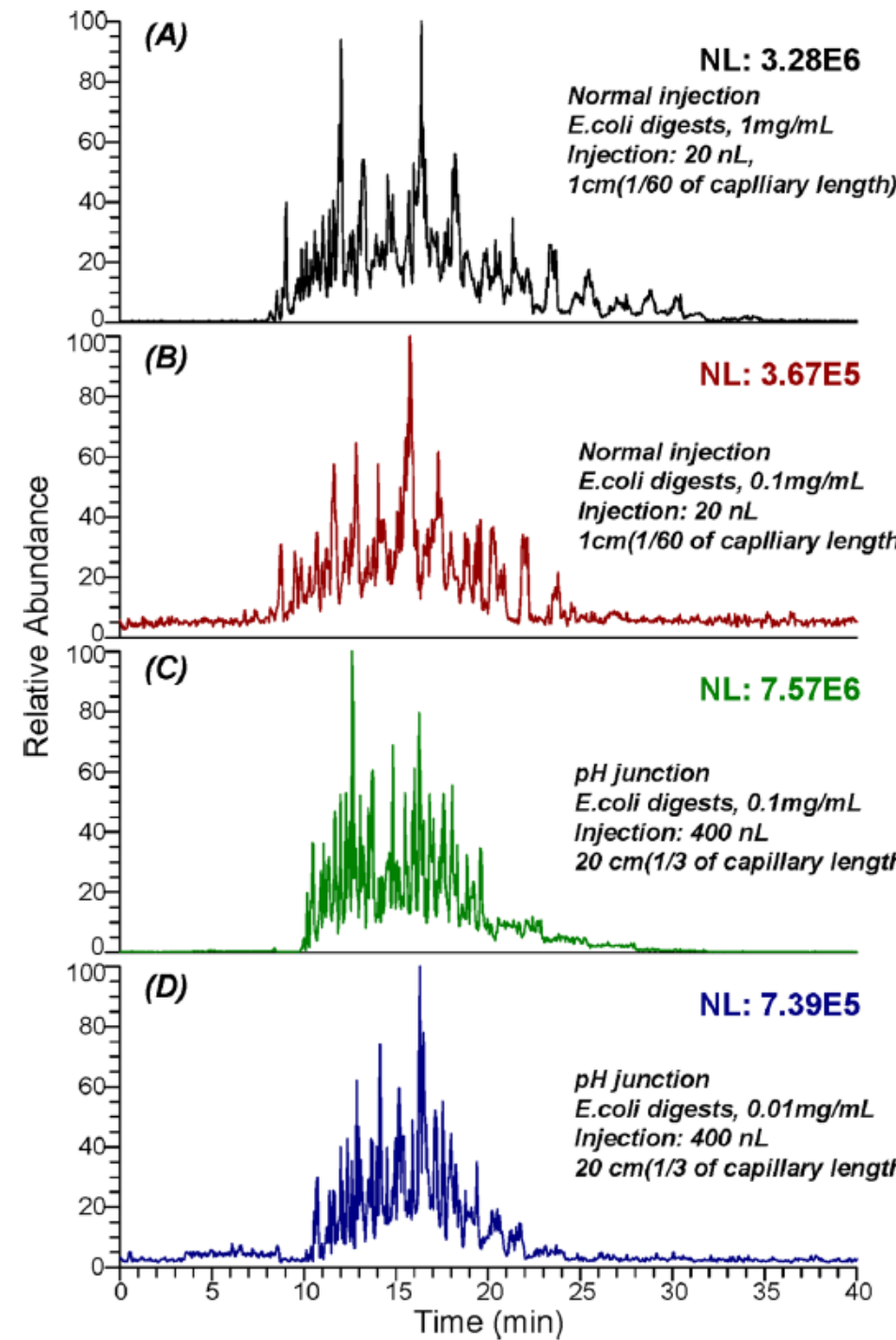
pH-junction példa 3.

- E. coli emésztmény
 - Átlag inj. (20 nL, 1 mg/mL):
508 peptid, 199 fehérje
 - pH junct. (400 nL, 0,1 mg/mL):
527 peptid, 179 fehérje
- Natív fehérjékre is
használható



pH-junction példa 3.

- Lineáris poliakrilamid bevonatú kapilláris
- BGE: 0.1% FA
- Mintamátrix:
 - A (hagyományos): 0.1% FA
 - B (pH junct): 10 mM NH₄Ac (pH=6.5)



pH-junction példa 3.

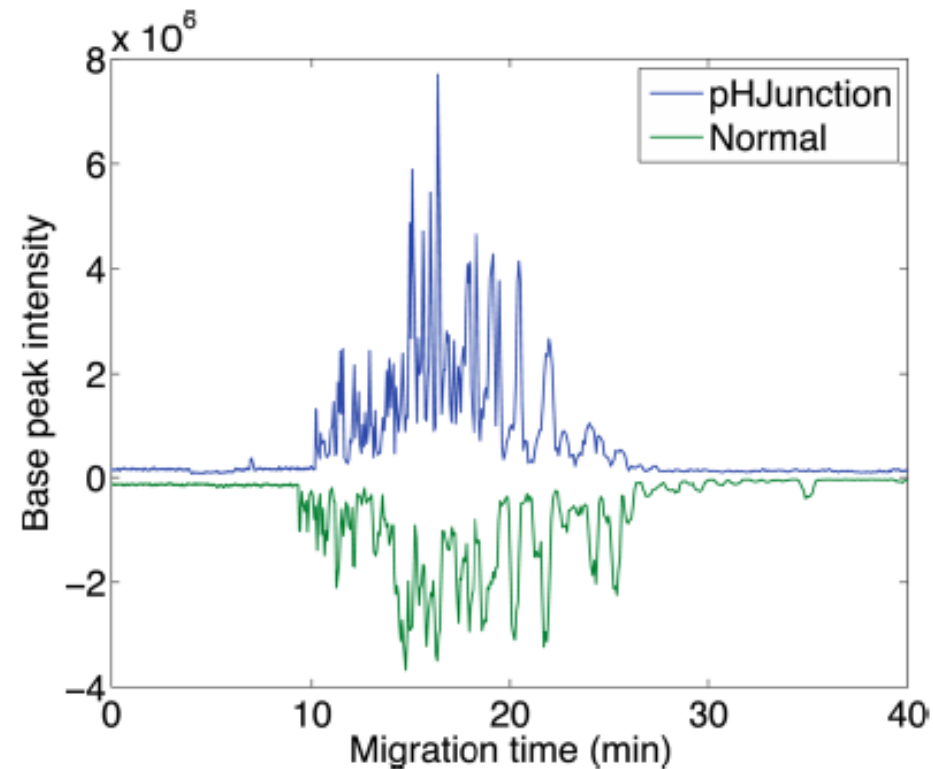
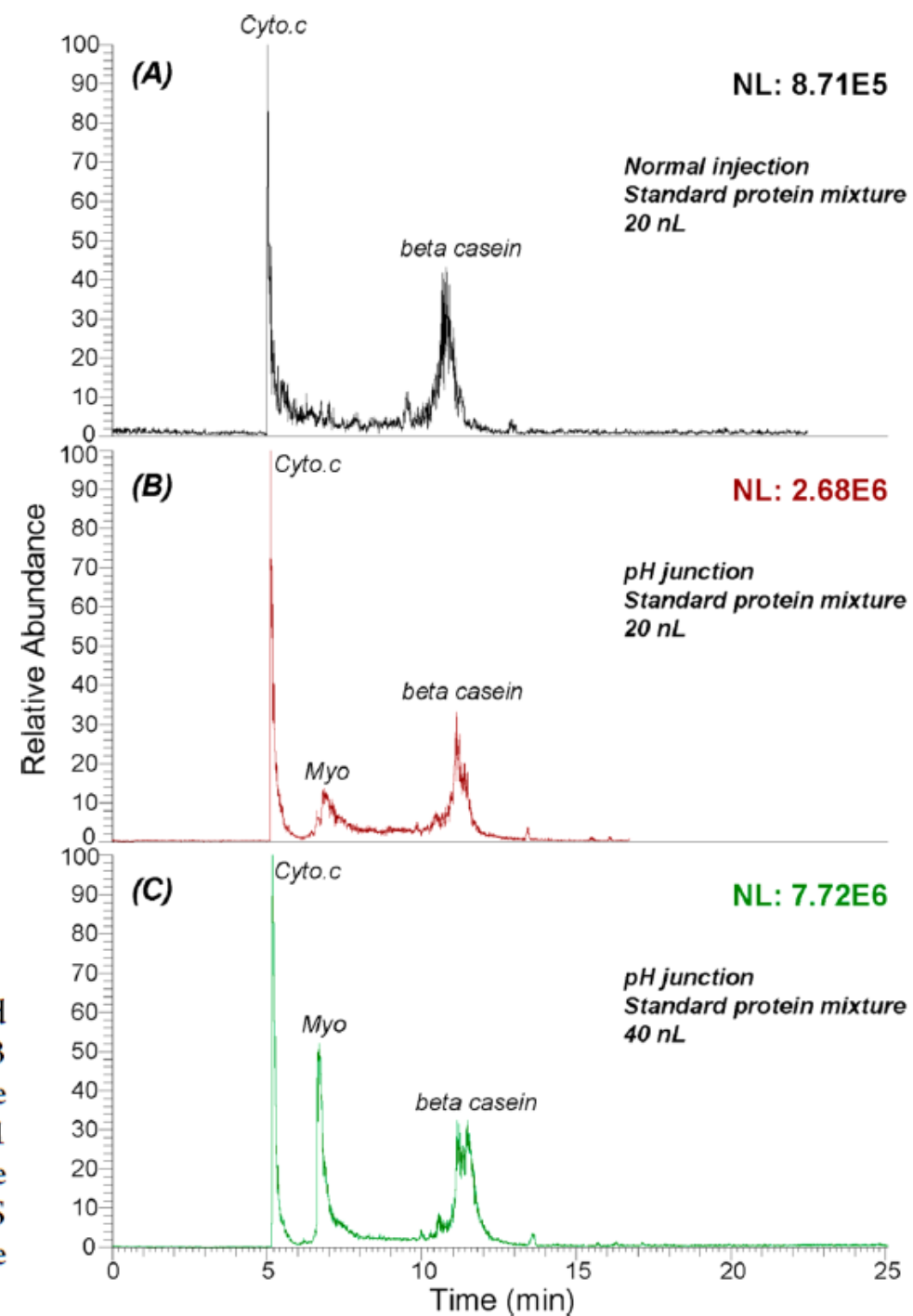


Figure 4. Base peak electropherograms for a 20 nL (1 cm) injection of a 0.1 mg/mL *E. coli* tryptic digest. The electropherogram generated with a pH junction injection is shown in blue (top), and the electropherogram generated using normal injection is inverted and shown in green (bottom).

pH-junction példa 3.

Alkalmazás natív fehérjékre

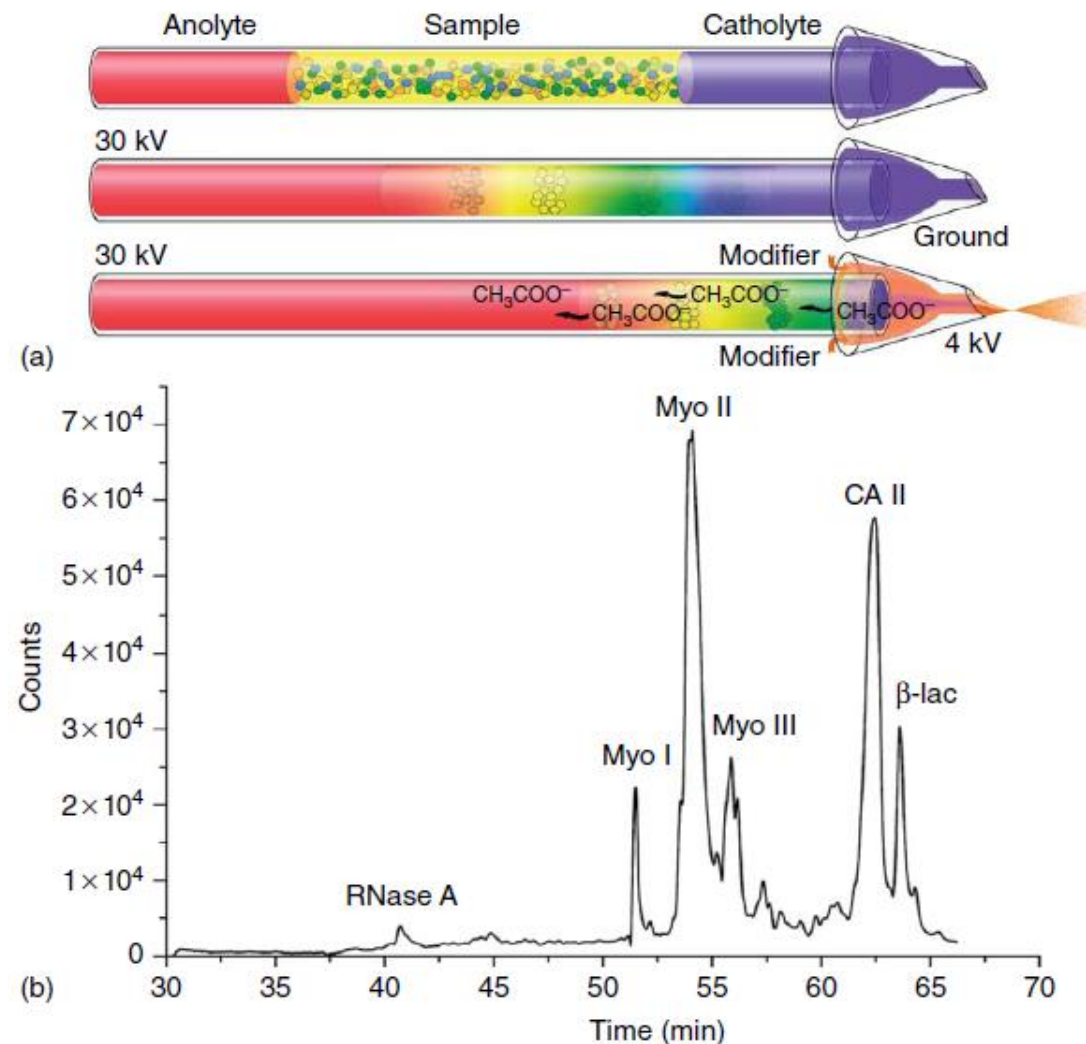
Figure 6. Base peak electropherograms of a mixture of three standard proteins analyzed by normal (A) and dynamic pH junction based (B and C) CZE-MS using an LTQ mass spectrometer. A protein mixture containing cytochrome C (Cyto.c, 0.1 mg/mL), myoglobin (Myo, 0.1 mg/mL), and beta casein (0.5 mg/mL) was used as the sample. The sample was dissolved in 0.1% (v/v) FA for the normal CZE-MS experiment and in 10 mM ammonium acetate (pH ~6.5) for the dynamic pH junction experiments. NL, normalized level.



cIEF alkalmazása fehérjék elválasztására

- pH gradiens kialakítása katolit beinjektálásával
- Minta injektálás
- Inlet edényben anolit
- Fehérjék elválasztása pI szerint
- Detektálás MS-rel

Zhong, X., et al. (2011) Flow-through microvial facilitating interface of capillary isoelectric focusing and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **83**, 8748–8755.



Elektrokromatográfiás dúsítás 1.

- Sweeping
 - Pl. SDS-zóna a mintával (neutrális endogén szteroid hormon) szomszédosan. Áthalad a mintán és kh-ba lép vele. Rövid zónába tömöríti a mintát

Elektrokromatográfiás dúsítás 2.

- Micellák megszüntetésével (összeomlásával – micelle collapse)
 - Pl. mintamátrix 10 mM SDS
 - 30% AcCN dugószerűen a minta után
 - (-) töltésű micellák az AcCN felé áramlanak
 - Azt elérve a CMC érték megnő (12 mM SDS-re), a micellák szétesnek, az egyes komponensek dúsulnak az ACN-es zónában

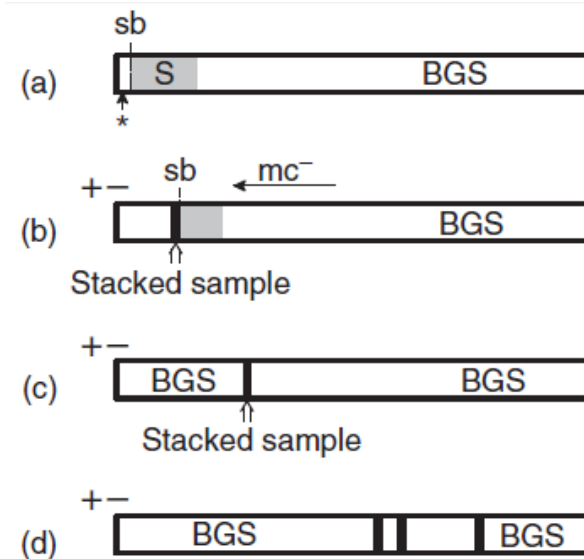


Figure 5.7 Simplified schematic of analyte focusing by micelle collapse or AFMC in PF-EKC with a cathodic EOF. (a) The S of neutral analytes prepared in a micellar solution is injected after conditioning the capillary with BGS (nonmicellar) and injection of micellar solution for separation. The symbol * represents a low-conductivity electrolyte or organic-solvent-rich solution for micelle

collapse. (b) Application of voltage caused the analytes to accumulate at the sb. (c) A final AFMC zone is formed when all the analytes are transported and released into the sb. (d) The micelles from the micellar solution penetrated the AFMC formed zone and caused them to separate by EKC principles. Note that the EOF is to the cathode where the detector is also located.

Elektrokromatográfiás dúsítás 3.

- Micelle to solvent stacking
 - Micella összeomlással analóg
 - Minta és felületaktív anyag töltése ellentétes legyen
 - Micelladús közegben a micella töltése szabja meg az áramlást, míg a szerves oldószeres közegben az ellentétes töltésű minta komponens töltése
 - co-EOF körülmény kell
 - A minta mátrixa micella vagy szerves oldószerdús közeg
 - FESI-vel kombinálható
- Micelle collapse-hez képest különbség: nem feltétlenül szűnik meg a micella, ellentétes töltésű mintakomponens, nem kell külön beinjektálni a szerves oldószerdús sávot

Elektrokromatográfiás dúsítás 3.

- BGE tartalmaz 20% AcCN-t
- Amint kilép a mintazónából az ellentétes töltésű komponenssel képzett micella, a + töltése miatt a határfelületen dúsul

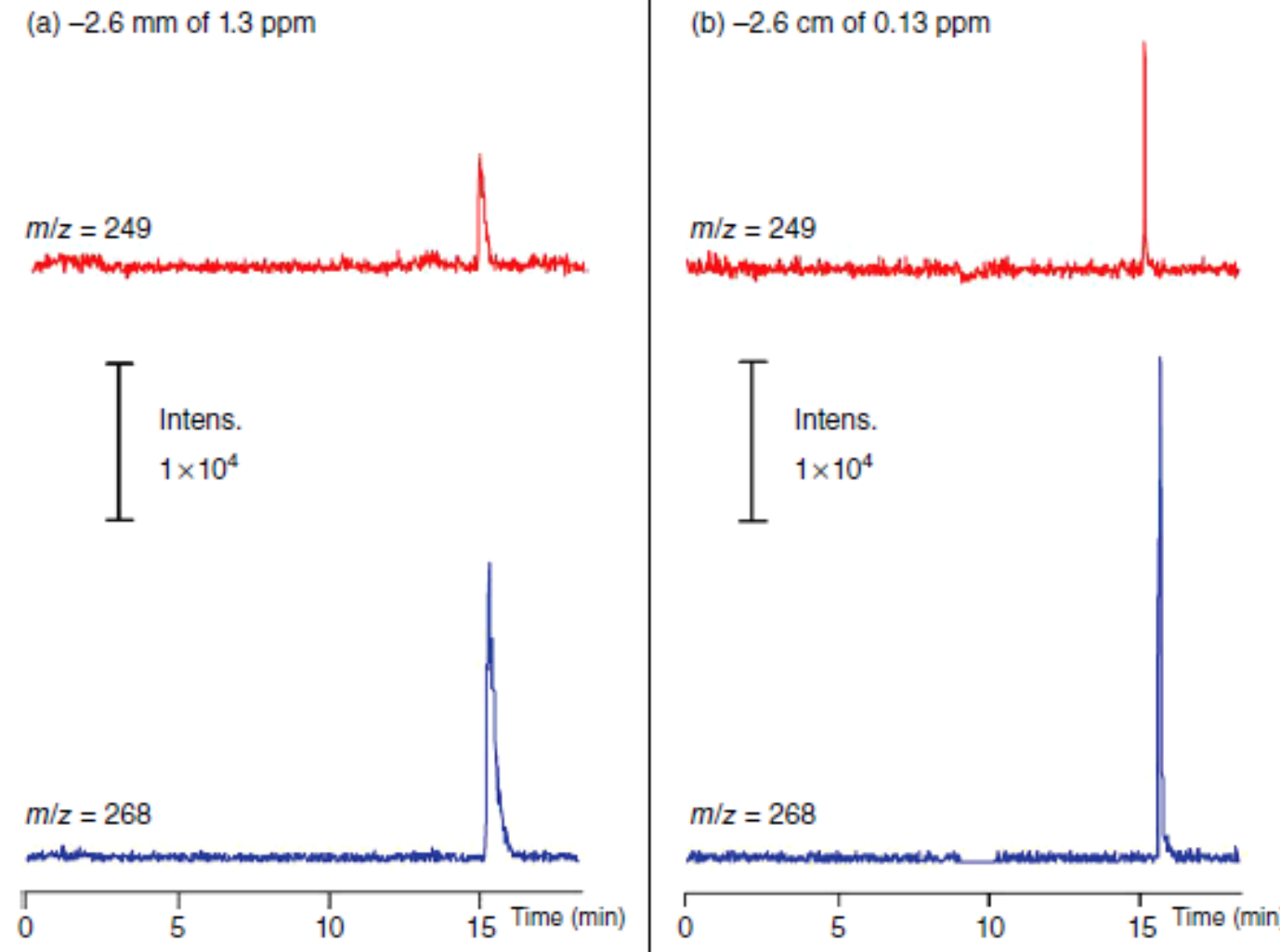


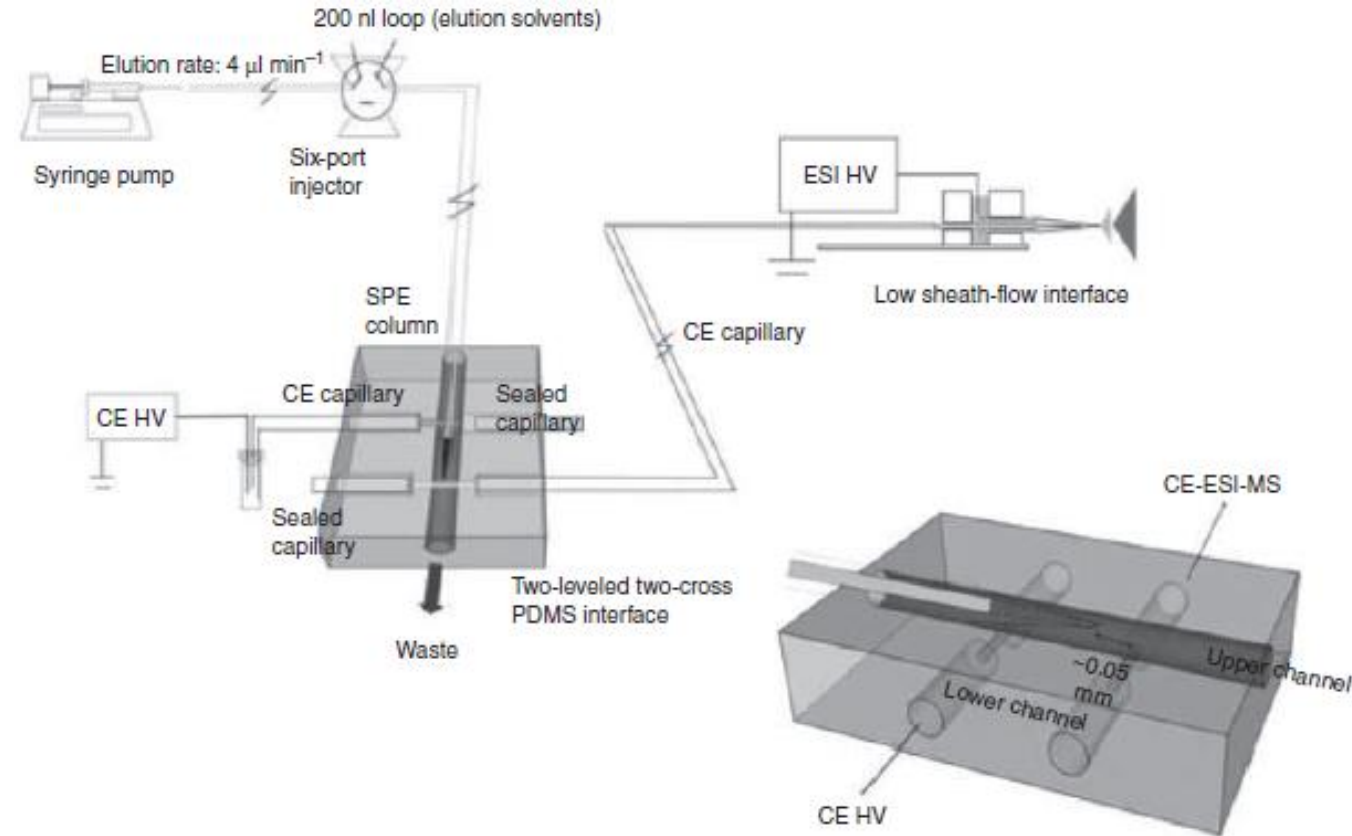
Figure 5.8 Extracted base peak electropherograms for pindolol ($m/z = 249$) and metoprolol ($m/z = 268$) analyzed by CZE-ESI-MS (a) and MSS-CZE-ESI-MS (b). BGS = 30 mM ammonium acetate, pH 5 with 20% acetonitrile; sample matrix = BGS (a) and 10 mM SDS with 13 mM ammonium acetate, pH 5 (b);

$S = 1.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ (a) and $0.13 \mu\text{g ml}^{-1}$ (b) of pindolol and metoprolol; injection scheme: 2.6 mm (6 s at 50 mbar) of sample solution (a) and 0.6 cm (15 s at 50 mbar) of sample matrix followed by 2.6 cm (60 s at 50 mbar) of sample solution (b). Reproduced from Quirino [54] with permission of Elsevier.

On-line SPE

- Az SPE töltet nem a CE(-MS) kapillárisban van, de hozzá van kapcsolva valamilyen módon
- Nagy térfogatú (50 μL) peptid minta átáramoltatása az SPE tölteten, amit utána kis (200 nL) térfogatba eluálnak

Lee, W.H., et al. (2011) Staggered multistep elution solid-phase extraction capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry: A high-throughput approach in protein analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25** (15), 2124–2130.

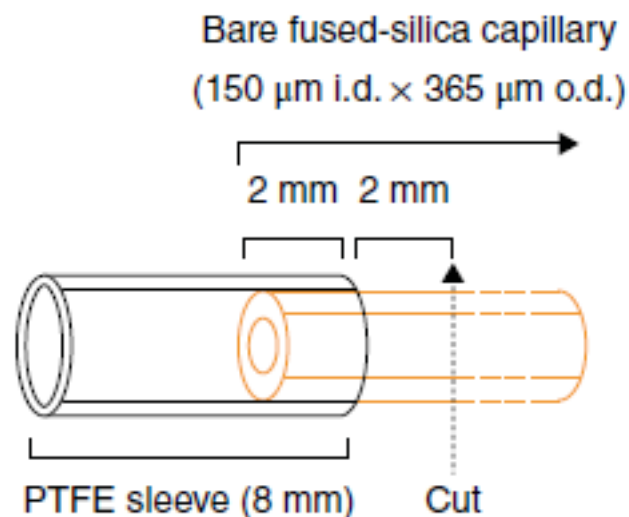


In-line SPE

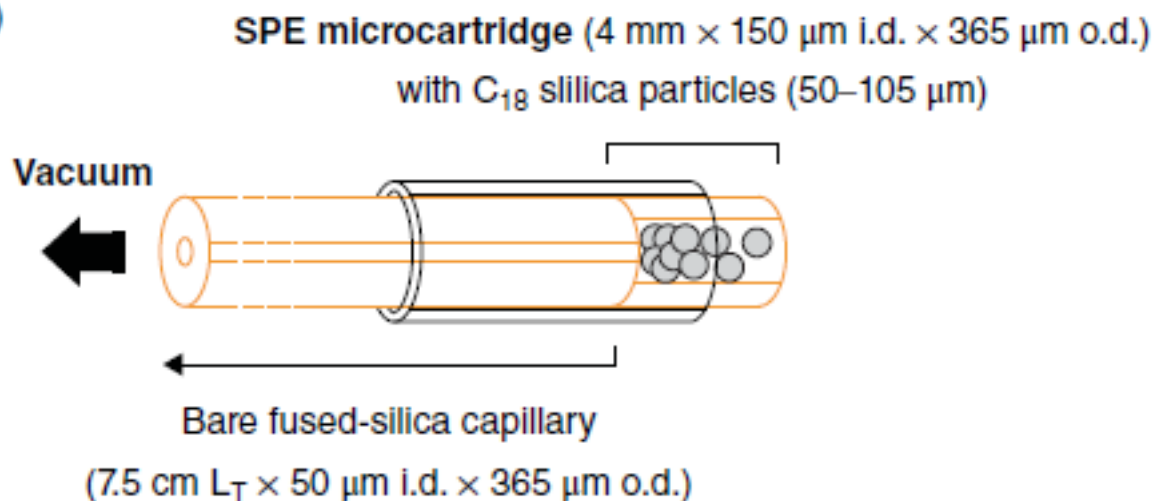
- Kapilláris része az SPE töltet
- A teljes oldattérfogat keresztülhalad a megkötés során a CE-MS rendszeren

In-line SPE - töltetkészítés

(a)



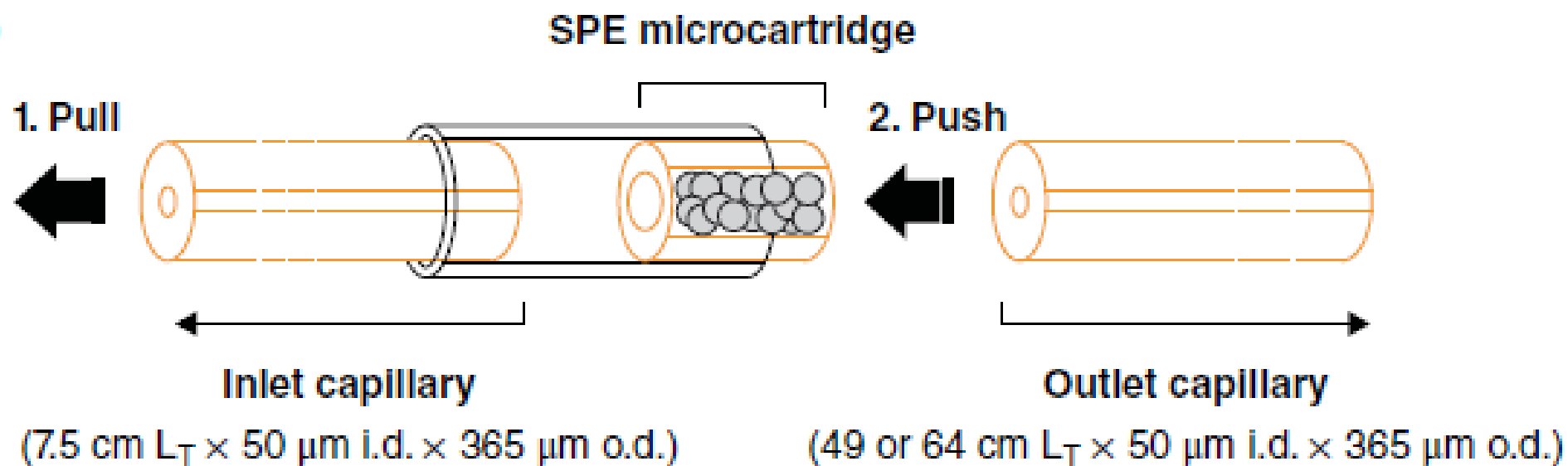
(b)



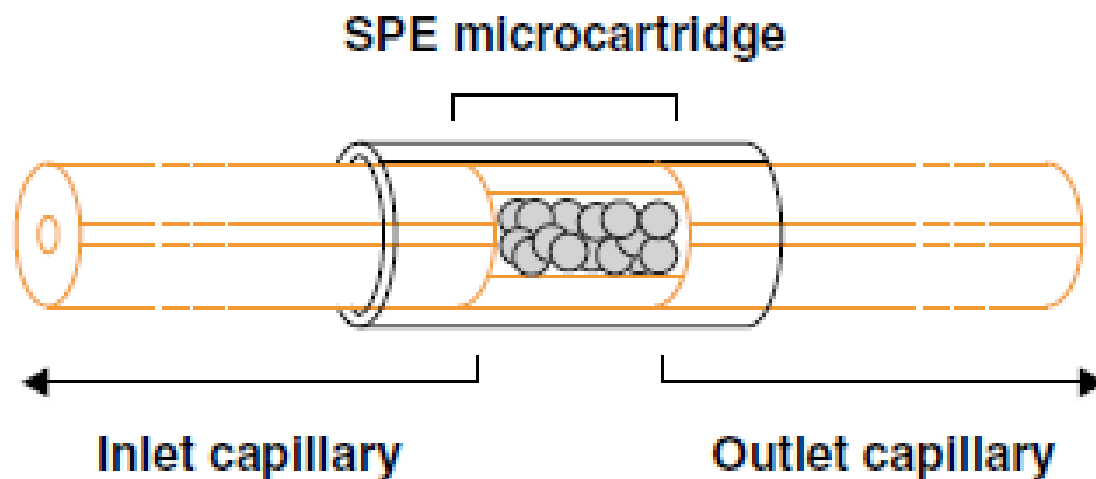
Medina-Casanellas, S., et al. (2014) Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid. *Electrophoresis*, **35** (20), 2996–3002.

In-line SPE - töltetkészítés

(c)



(d)



Intakt fehérjék vizsgálata CE-MS-sel

Fehérjeanalízis - bevezetés

- Bottom-up: emésztés utáni peptidek azonosítása
 - Ismeretlen összetételű mintában lehet megadni a fehérjét
- Intakt fehérje vizsgálata
 - Pl. ha a fehérje melletti szennyezőket
 - Vagy a fehérje stabilitását/bomlását vizsgáljuk
 - Információ a konformációjáról, komplexképzéséről
 - Kevesebb mintaelőkészítés, mely elszennyezi/befolyásolja a mintát
 - 2D fehérje gélelektroforézis
 - Hosszú analízis
 - „fehérjebontásra” alkalmasak a modern MS készülékek

Fehérjeadszorpció leküzdése

- Szélsőséges pH
 - Alacsony: fal semleges
 - Magas: fal és fehérje is negatív
- Ionerősség növelése
- Szerves oldószer adagolása a BGE-hoz
- Kapilláris bevonat használata

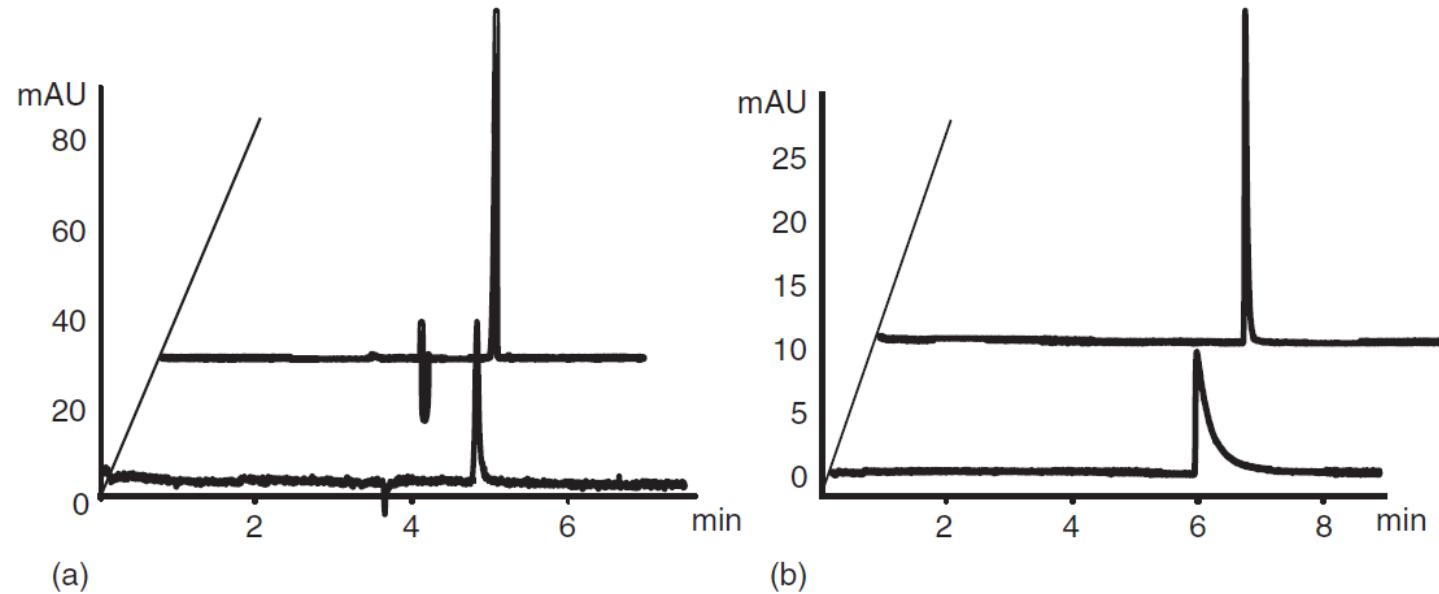


Figure 7.1 CE-UV electropherogram of insulin obtained with (a) alkaline BGE and (b) acidic BGE. Upper trace: BGE containing 10% ACN. Lower trace: BGE without the addition of ACN. (Reproduced from [24] with permission from Wiley.)

Staub, A., et al. (2010) *Electrophoresis*, **31**, 3326.

Kapilláris bevonat kialakítása

- Cél megakadályozni a töltött fallal való kh-át a fehérjének (elektrosztatikus adszorpció)
- Semleges, ill. töltött bevonatok
- BGE adalékként (dinamikus coating) – nem MS kompatibilis
- Kovalens bevonatok
 - Reaktív szilánként viszik fel
- Nemkovalens borítások
 - Fizikailag adszorbeált rétegek

Kapilláris bevonat kialakítása

- Cél megakadályozni a töltött fa (elektrosztatikus adszorpció)
- BGE adalékként (dinamikus co)
- Kovalens bevonatok
 - Reaktív szilánként viszik fel
- Nemkovalens borítások
 - Fizikailag adszorbeált rétegek

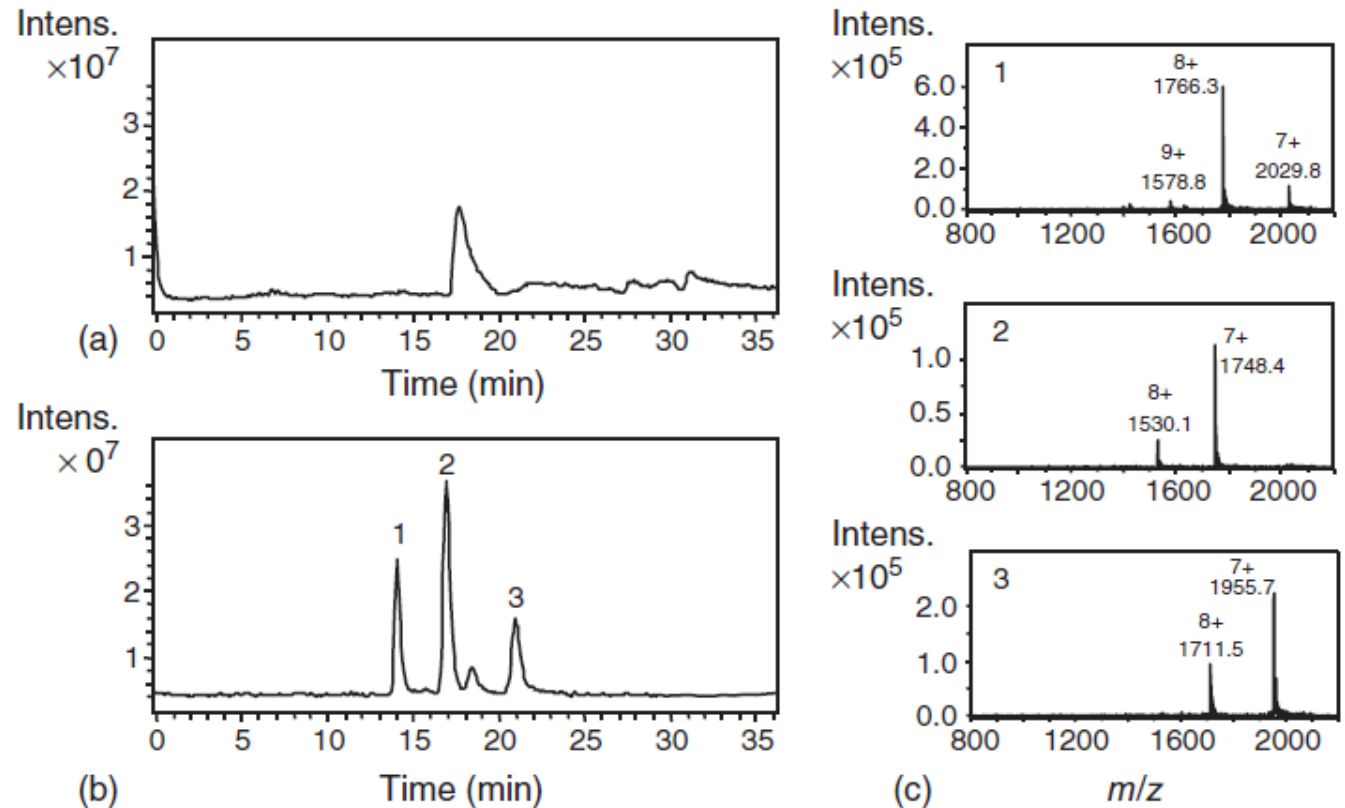


Figure 7.2 Total ion electropherograms obtained using CZE-ESI-MS of a mixture of the basic proteins lysozyme (1), cytochrome c (2), and ribonuclease A (3) using a BGE of ammonium acetate buffer at pH 5.5 and

(a) a bare fused-silica capillary or (b) an coated capillary. (c) Mass spectra of the main peaks obtained with the coated capillary. (Reproduced from [31] with permission from Wiley.)

(Nem ESI) ionforrások (MALDI, ICP) – intakt fehérjékhez

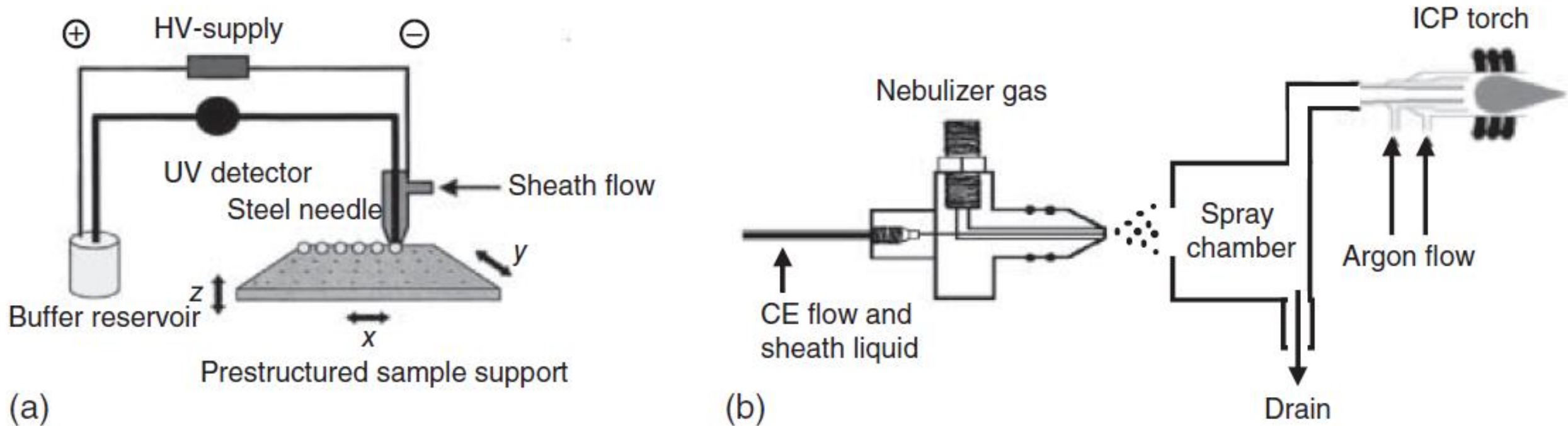
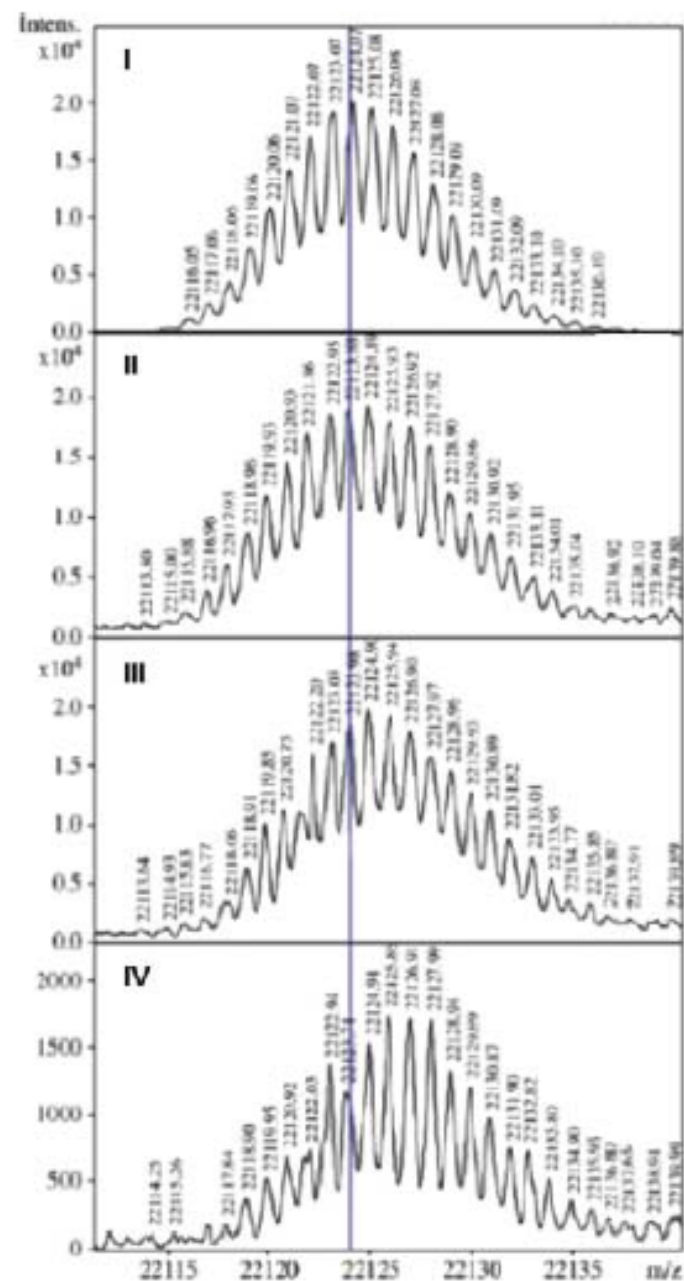


Figure 7.3 Schematic representation for the most commonly used interfaces for (a) CE-MALDI-MS and (b) CE-ICP-MS.

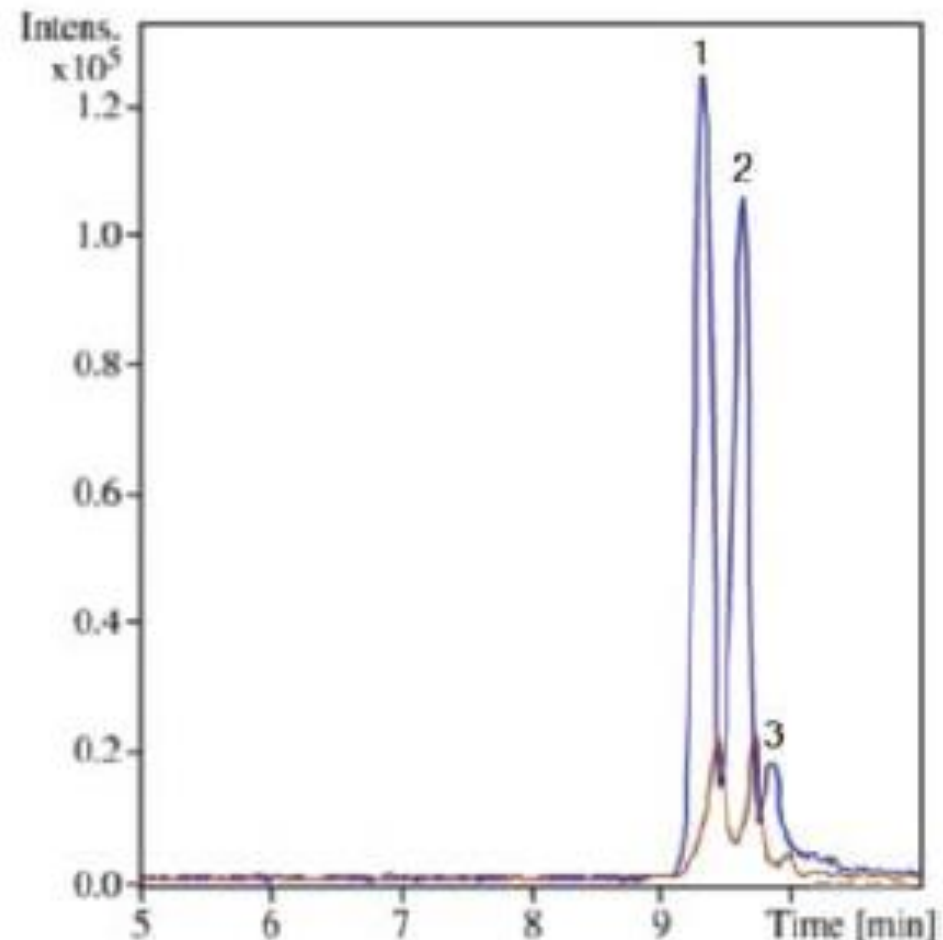
Rekombináns humán növekedési hormon (rhGH) egyszeresen és kétszeresen deamidált változatainak elválasztása és azonosítása

Taichrib, A., et al. (2011) *J. Proteomics*, **74**, 958.

Figure 7.4 (a) CZE-ESI-MS analysis of stressed hGH. The blue trace represents the EIE of hGH (1), deamidated hGH (2), and dideamidated hGH (3). The brown trace represents the EIE of peaks 1–3 after spontaneous elimination of PhePro. (B) Simulated isotope pattern of intact rhGH (I) and charge deconvoluted mass spectra of peaks 1 (II), 2 (III), and 3 (IV) of stressed rhGH, respectively. The blue line is to clarify the shift of the maximum of the isotopic distribution by 1 Da at a time. (Reproduced from [48] with permission from Elsevier.)



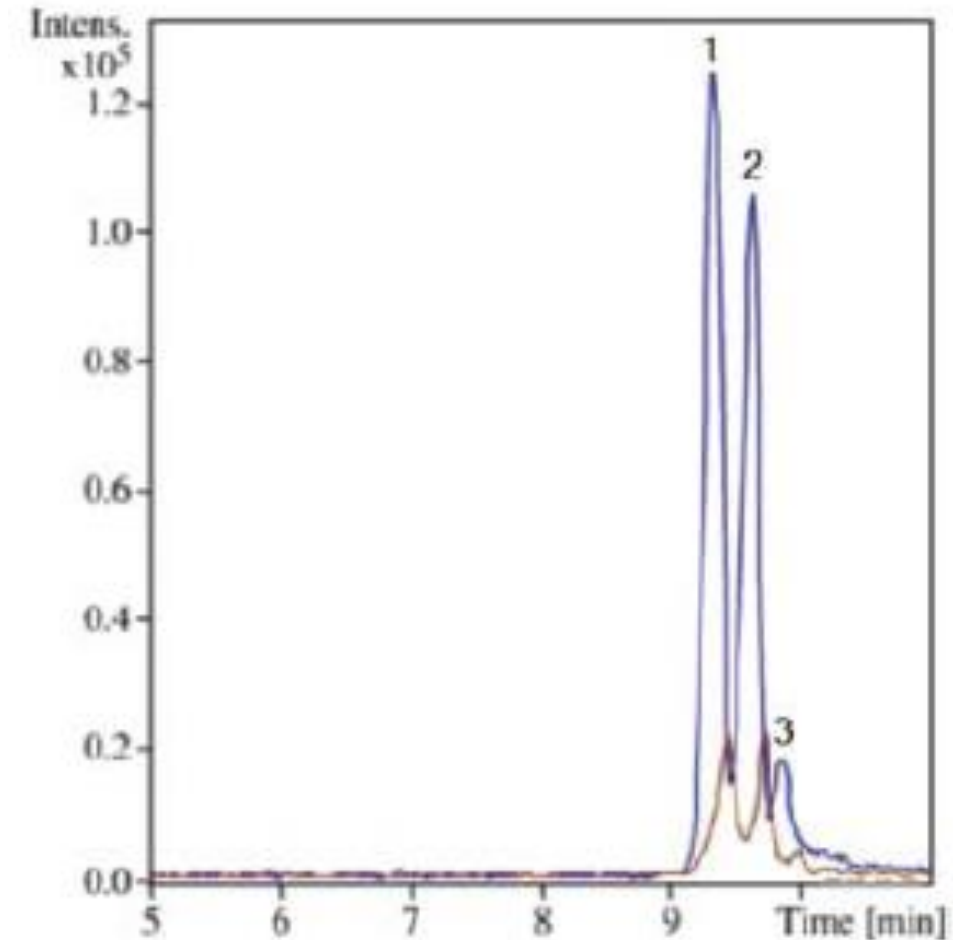
(b)



(a)

Rekombináns humán növekedési hormon (rhGH) egyszeresen és kétszeresen deamidált változatainak elválasztása és azonosítása

- Nem teljesen elváló csúcsok is jelen voltak
- Dekonvolúció után 244 Da-nal kisebb tömegnek feleltek meg ezek a komponensek
- Ez az N-terminális aminosavak (Phe és Pro) spontán hasadásából származtak a 3 féle (nem-, mono- és dideamidált) rhGH esetén



(a)

Hemoglobin-alapú oxigénhordozók analízise

- 75 mM NH_4 -formiát (pH=9.5)
- Bevonatmentes kapilláris
- 56 cm effektív hossz
- 12 s 25 mbar injektálás

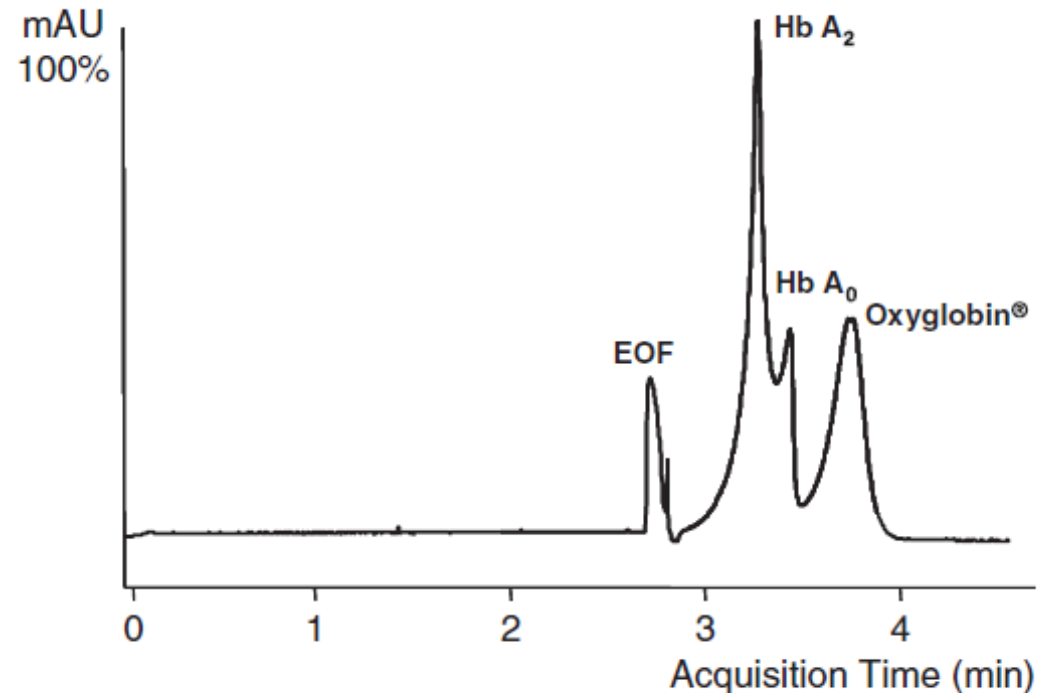
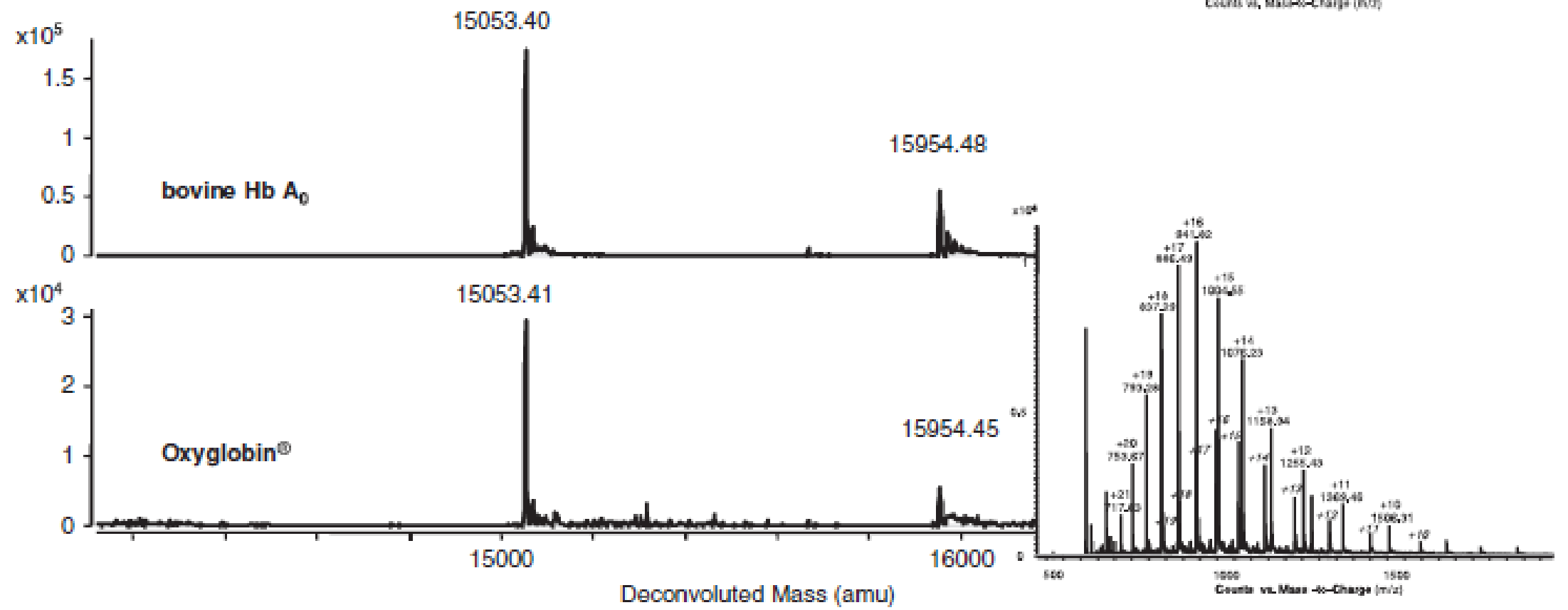
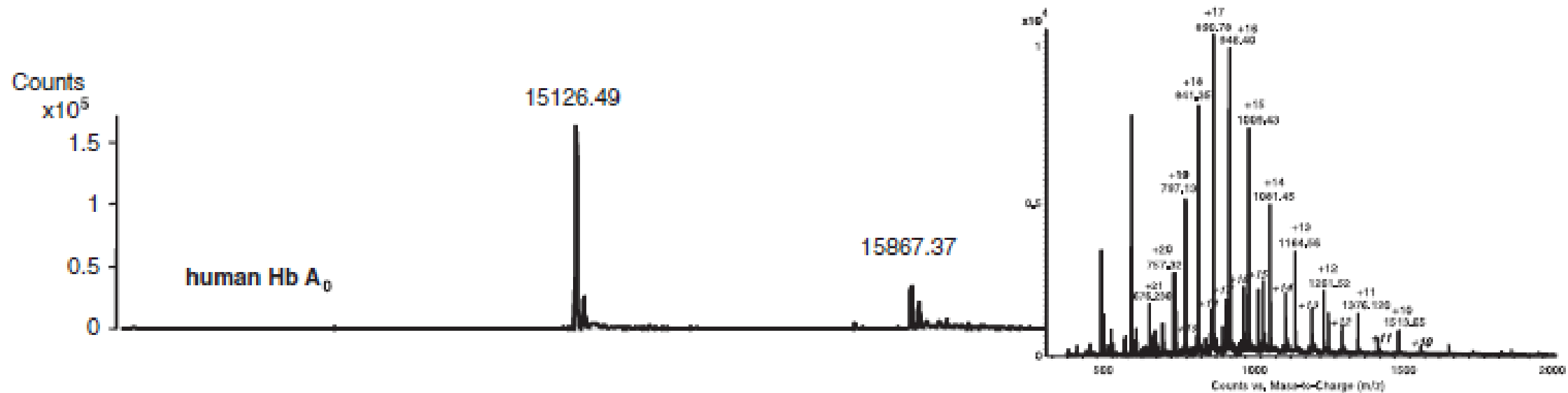


Figure 2. CE-UV electropherogram obtained by injecting a mixture of Hb A₂ (0.1 g/dL), Hb A₀ (0.1 g/dL), and Oxyglobin® (0.2 g/dL). UV/Vis 415 nm online. See text for experimental conditions.



Glokiproteinek

- Glikánrészek szerkezete fontos a biológiai aktivitás szempontjából
- EPO: eritropoetin
 - 1-1 sziálsav különbség a fehérjék közt, sziálsavegységenként ~2 perc migrációs idő változás
 - Hexóz-N-acetil-hexózamin tartalmabani különbség részleges elválasztást eredményezett
 - Akár 250 izoforma is megkülönböztethető

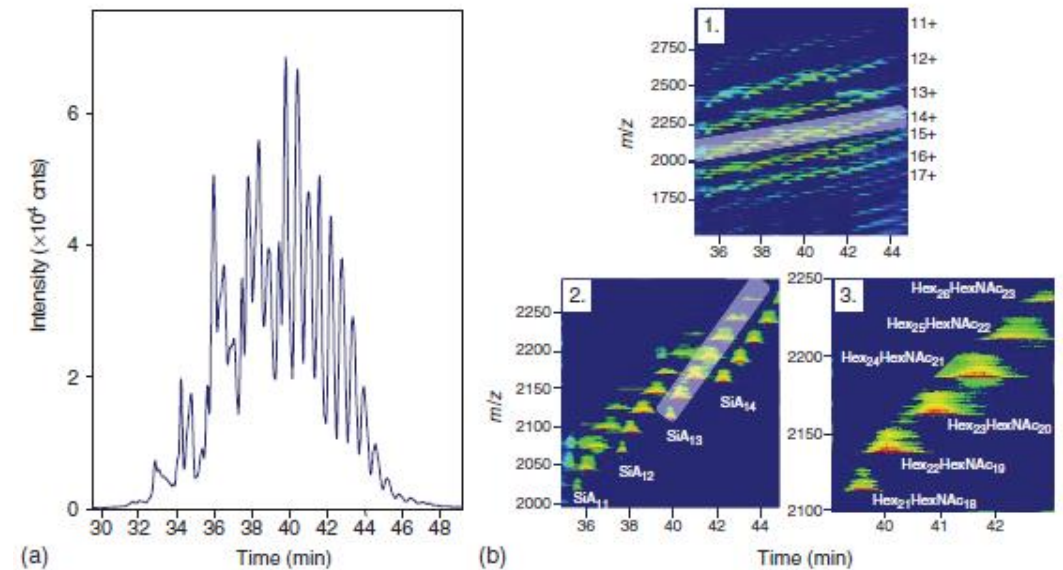
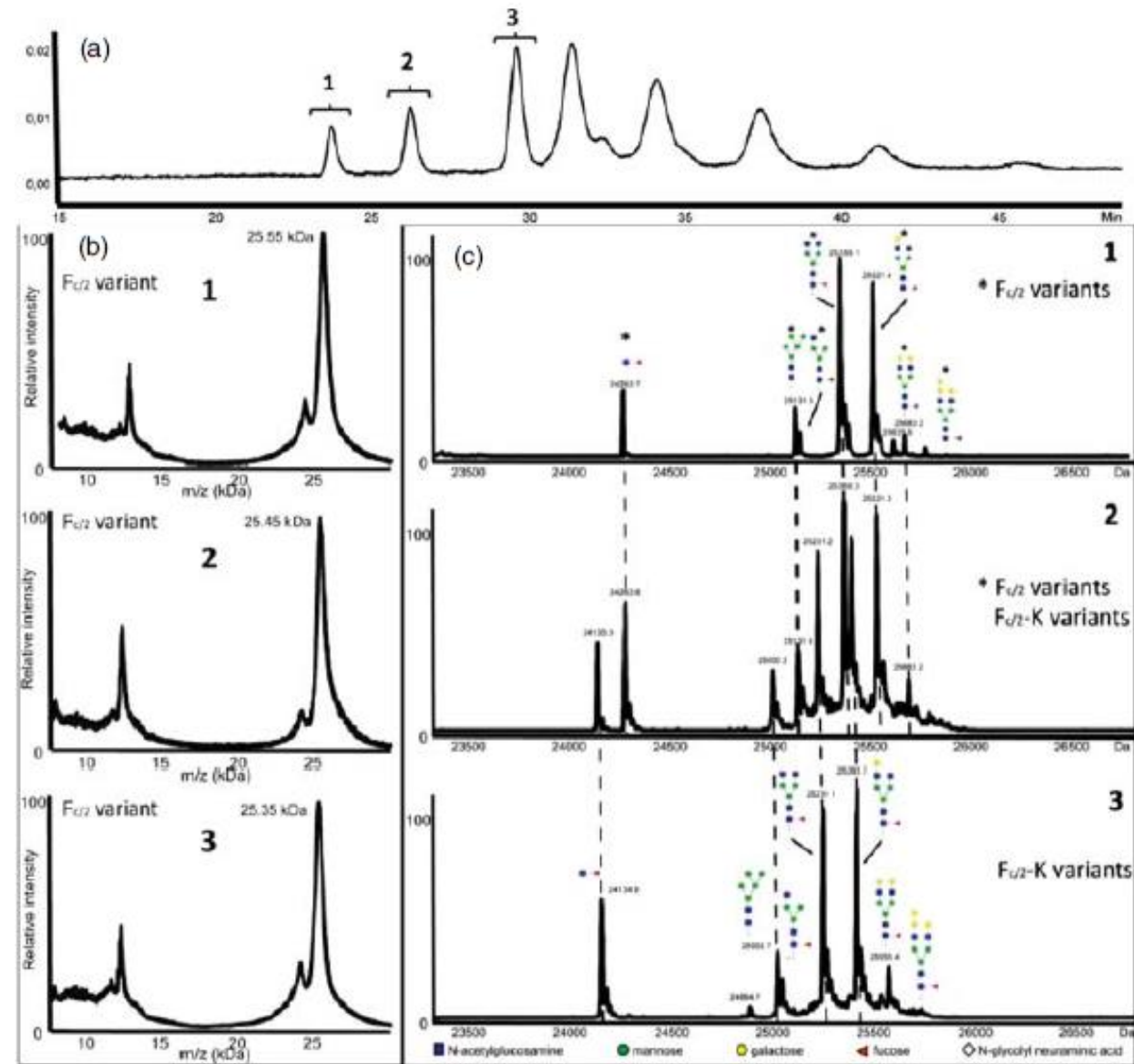


Figure 7.5 CZE-ESI-MS of recombinant human erythropoietin employing a sheathless interface in combination with a neutrally coated capillary. (a) Base peak electropherogram; (b1) contour plot with zooms of (b2)

the 14⁺ charge state of the glycoforms and (b3) the SiA₁₃ sialoforms of the 14⁺ glycoforms. (Reproduced from [40] with permission from American Chemical Society.)

mAbs CZE-MS elválasztása

- Antitestet részlegesen emésztették (Ig degrading enzyme)
- Fragmensek: $F(ab')_2$ (100 kDa), $Fc/2$ (25 kDa)



Biacchi, M., Gahoual, R., Said, N., Beck, A., Leize-Wagner, E., and Francois, Y.-N. (2015) *Anal. Chem.*, **87**, 6240.

Figure 7.6 CZE analysis with off-line MS detection of partially digested antibody. (a) CZE-UV electropherogram showing the charge variants of the $Fc/2$ (peak 1–3) and $F(ab')_2$ (peaks between 30 and 45 min) fragments. (b) MALDI-TOF-MS and (c) ESI-TOF-MS

mass spectra obtained for the three separated and off-line collected $Fc/2$ charge variants. Identified glycoforms are annotated in panel (c). (Reproduced from [60] with permission from American Chemical Society.)

Fehérje-ligand kölcsönhatások

- A BGE tartalmazza a ligandot (aprotonin), a fehérje (tripszinogén) a minta
- Növekvő ligand koncentrációval a 4. csúcs megnő
- Tömegspektrumában megjelennek a tripszinogén-aprotonin adduktok (nyilak)
- Kapilláris: polibrén - dextrán-szulfát – polibrén bevonatú

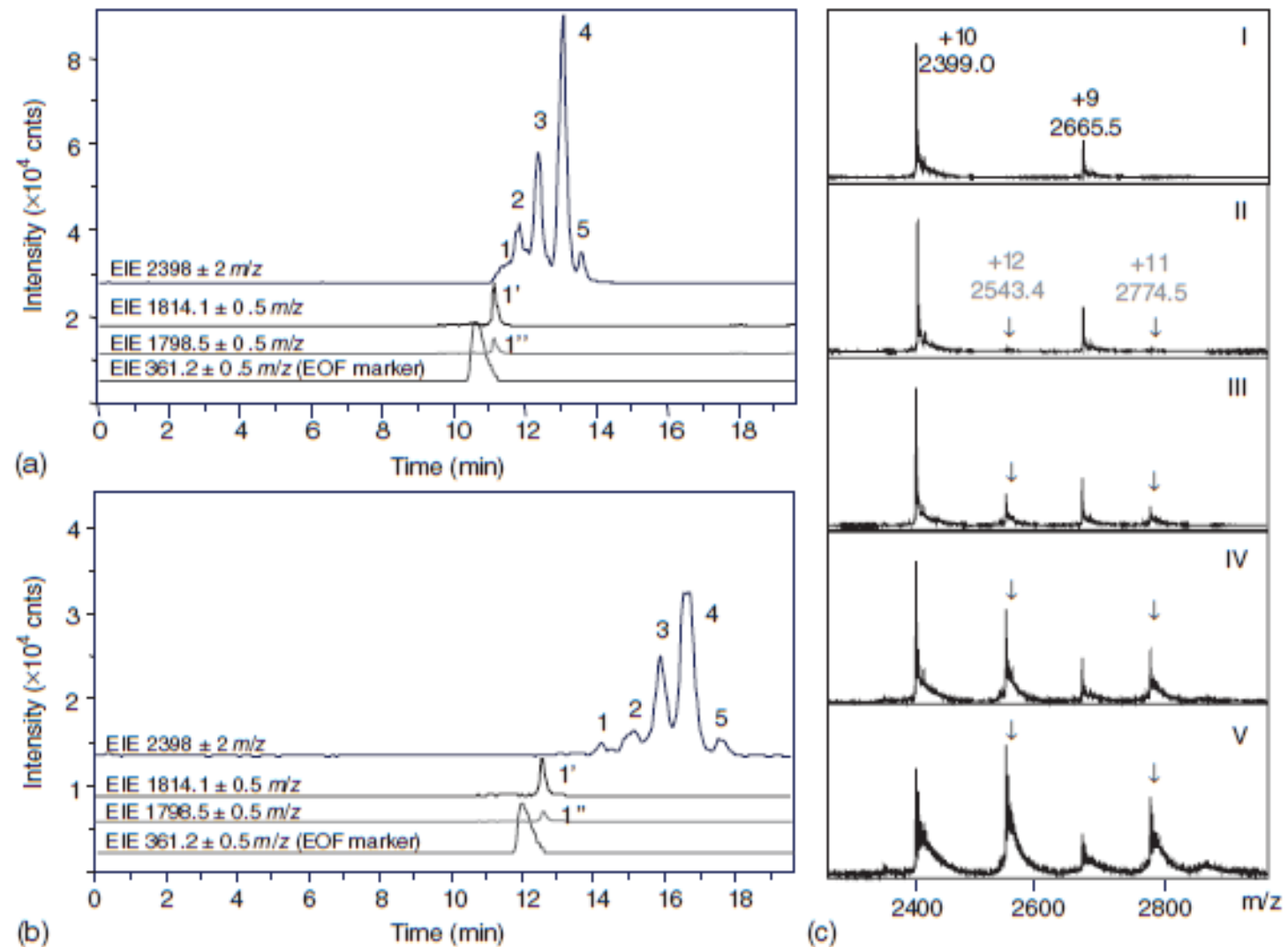


Figure 7.7 CZE-ESI-MS analysis of trypsinogen sample using a positively charged coated capillary and a BGE of 25 mM ammonium acetate (pH 8.0) containing no (a) or 25 μM (b) aprotonin. Extracted-ion electropherograms of trypsinogen (2398 m/z), trypsinogen variants (2397–2399, 1814.1, and 1798.5 m/z) and cortisone (EOF marker)

(371.2 m/z) are depicted. (c) Mass spectra obtained for peak 4 during CZE-ESI-MS of trypsinogen using a BGE of 25 mM ammonium acetate (pH 8.0) containing no (I), 2 (II), 15 (III), 50 (IV), or 150 μM (V) aprotonin. Arrows indicate trypsinogen-aprotonin complex ions. (Reproduced from [88] with permission from American Chemical Society.)

Fehérje-ligand kölcsönhatások

- Fehérje - ligand keverék inkubálása utáni elválasztás
- Metallogyógyszerek kötődése HSA-hoz és transferrinhez (Tf)
 - Gyógyszerek fő kötőhelye a szervezetben
 - CE-**ICP**-MS detektálás (**metallo**-gyógyszerek)
 - Kötődési állandó (váltakozó ligandkoncentrációnál), ill. kölcsönhatás kinetikája (azonos koncentrációnál, különböző időkben nézve) vizsgálható
- Frontál analízis
 - Inkubálás után nagy mennyiségben injektálás
 - Ligand mozgékonyága nagyban eltér a fehérjéétől
 - 2 plató: 1. ligand, 2. fehérje

Metalloproteinek

- Metallotioneinek
 - Kis molekulatömegű fehérjék nagy cisztein és fémtartalommal
 - CZE-ICP-MS-sel jól vizsgálhatóak, borítatlan kvarckapillárisal
 - ICP-nél a mátrixkomponensek nem zavarják

Metalloproteinek

- Metallotioneinek
 - Cd, Cu és Zn mérése ICP-vel

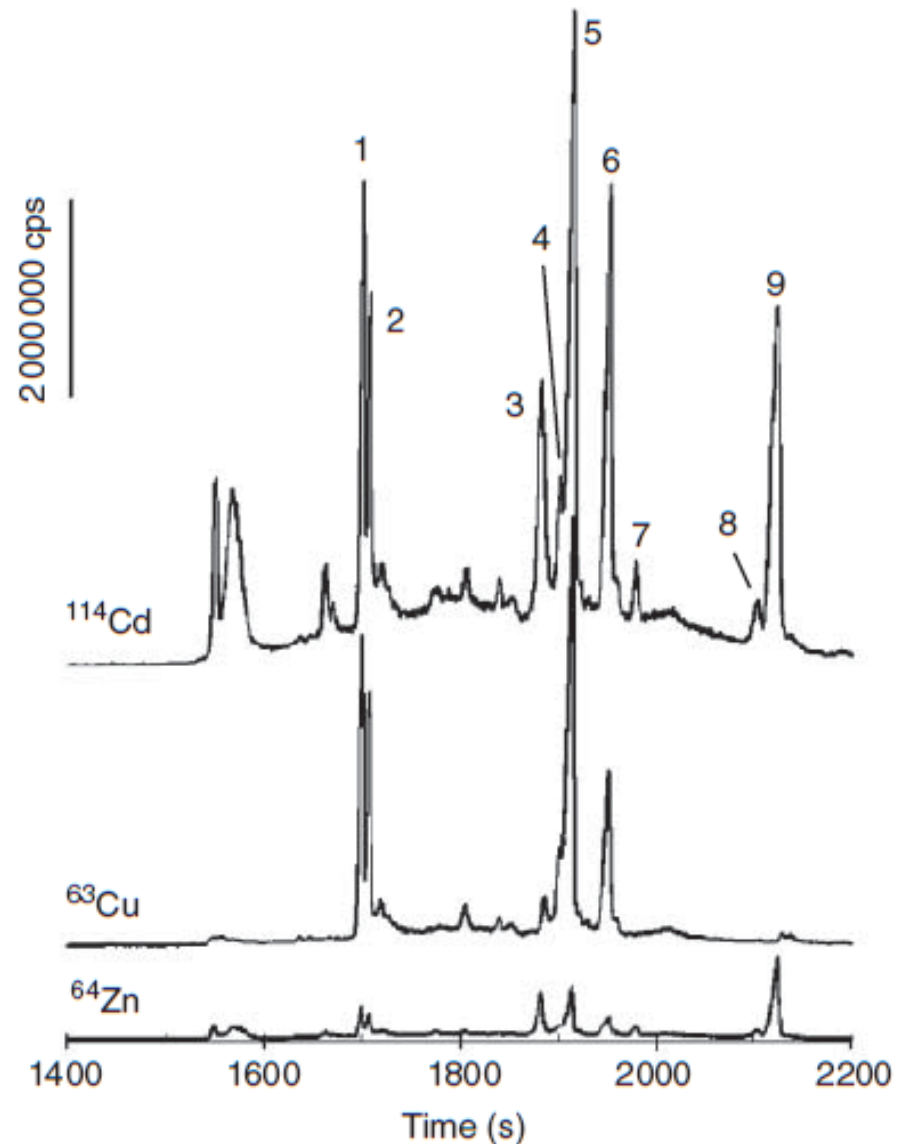


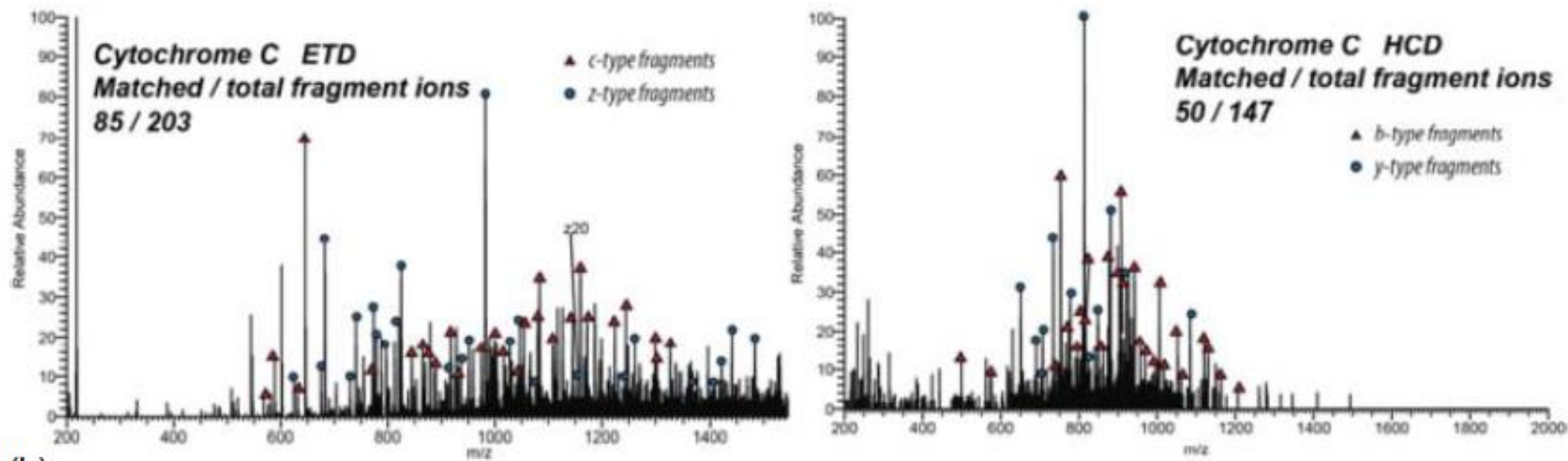
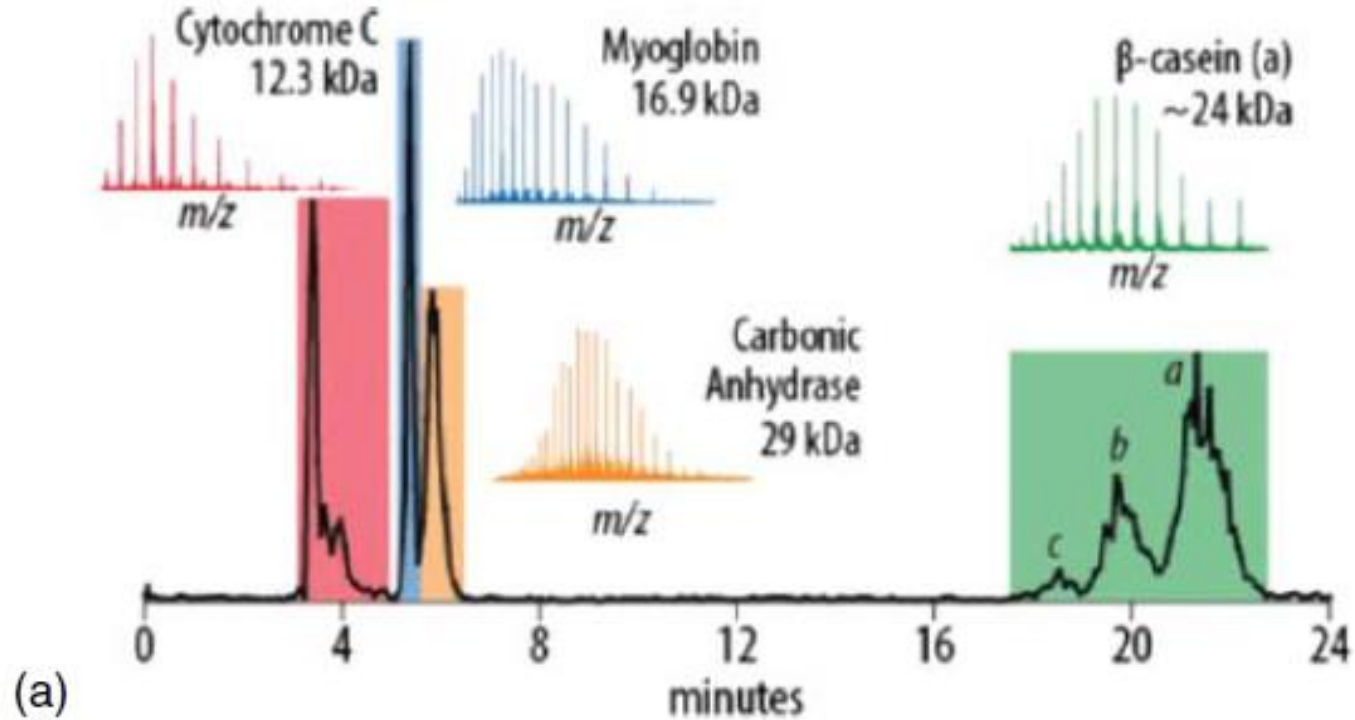
Figure 7.8 CZE-ICP-MS analysis of a rabbit liver MT sample using a 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid coated capillary. The proteins are detected by their cadmium, copper, and zinc content as

monitored with ICP-MS. Numbers indicate the MT isoforms that were identified. (Reproduced from [109] with permission from American Chemical Society.)

Top-down proteomika

- Intakt fehérje fragmentálása
 - ETD fragmentációval (elektron transzfer disszociáció)
 - HCD fragmentációval (higher energy collision dissociation)
- Hátulütő: oldallánc specifikus módosítások meghatározása nehézkes
- Általában kisebb SC% értékek
 - Kiküszöbölés: ETD és HCD kombinálásával

Zhao, Y. et al. (2015)
Anal. Chem., **87**, 5422.



Cytochrome c

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 66/20*

MGDVEKG|K|K|I|F|V|QKCAQCHTVEKGG|K|H|K|T|GPN|L
|H|G|L|F|G|RKT|G|Q|A|P|G|F|S|Y|T|D|A|N|K|N|K|G|I
TW|G|E|E|TL|ME|Y|L|E|NP|K|Y|I|P|G|T|K|M|I|F|A|G|I
|K|K|K|G|E|R|E|D|L|I|A|Y|L|K|K|A|T|N|E

Carbonic anhydrase

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 81/11*

MSHH|W|G|Y|G|K|H|N|G|P|E|H|W|H|K|D|F|P|I|A|N|G|E|R|Q
|S|P|V|D|I|D|T|K|A|V|V|Q|D|P|A|L|K|P|L|A|L|V|Y|G|E|A|T|S|R|R|M|V|N
N|G|H|S|F|N|V|E|Y|D|D|S|Q|D|K|A|V|L|K|D|G|P|L|T|G|T|Y|R|L|V|Q|F|H|F|H|W|G|S|S
D|D|Q|G|S|E|H|T|V|D|R|K|K|Y|A|E|L|H|L|V|H|W|N|T|K|Y|G|D|F|G|T|A|A|Q|Q|P|D|G|L
A|V|V|G|V|F|L|K|V|G|D|A|N|P|A|L|Q|K|V|L|D|A|L|D|S|I|K|T|K|G|K|S|T|D|F|P|N|F|D|P
G|S|L|L|P|N|V|L|D|Y|W|T|Y|P|G|S|L|T|T|P|P|L|L|E|S|V|T|W|I|V|L|K|E|P|I
|S|V|S|S|Q|Q|M|L|K|F|R|T|L|N|F|N|A|E|G|E|P|E|L|L|L|M|L|A|N|W
R|P|A|Q|P|L|K|N|R|Q|V|R|G|F|P|K

β -casein

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 58/2*

MKVLILACLVALALARELEELNVPGEIVESLSSESSEESITRINK
KIEKFCSEEQQQTEDELQDKIHPPFAQTQISLVYPIFFGPI
PNSLPQNIIPPLTQTPVVVPPFLOPEVMGVSKVKEAMAP
KHKEIMPFPKY|PVE|PF|T|E|S|Q|S|L|T|L|T|D|V|E|N|L|H|L|P|L
P|L|Q|S|W|M|H|Q|P|H|Q|P|L|P|P|T|V|M|F|P|P|Q|S|V|L|S|L|S|Q|S|K|V|L|P
V|P|Q|K|A|V|P|Y|P|Q|R|D|M|P|I|Q|A|F|L|L|Y|Q|E|P|V|L|G|P|V|R|G|P|F|P|I|V

Myoglobin

ETD / HCD

Number of fragmentation sites: 63/8*

MGLSDG|E|W|Q|Q|V|L|N|V|W|G|K|V|E|A|D|I|A|G|H|G|Q|E|V|L|R|L
F|T|G|H|P|E|T|L|E|K|F|D|K|F|K|H|L|K|T|E|A|E|M|K|A|S|E|D|L|K|K
H|G|T|V|V|L|T|A|L|G|G|I|L|K|K|K|G|H|H|E|A|E|L|K|P|L|A|Q|S|H|A|T|K|H|L
K|I|P|I|K|Y|L|E|F|I|S|D|A|I|H|V|L|H|S|K|H|P|G|D|F|G|A|D|A|Q|L
G|L|A|M|T|K|L|A|L|E|L|L|F|R|N|D|I|A|A|K|Y|K|E|L|G|F|Q|G

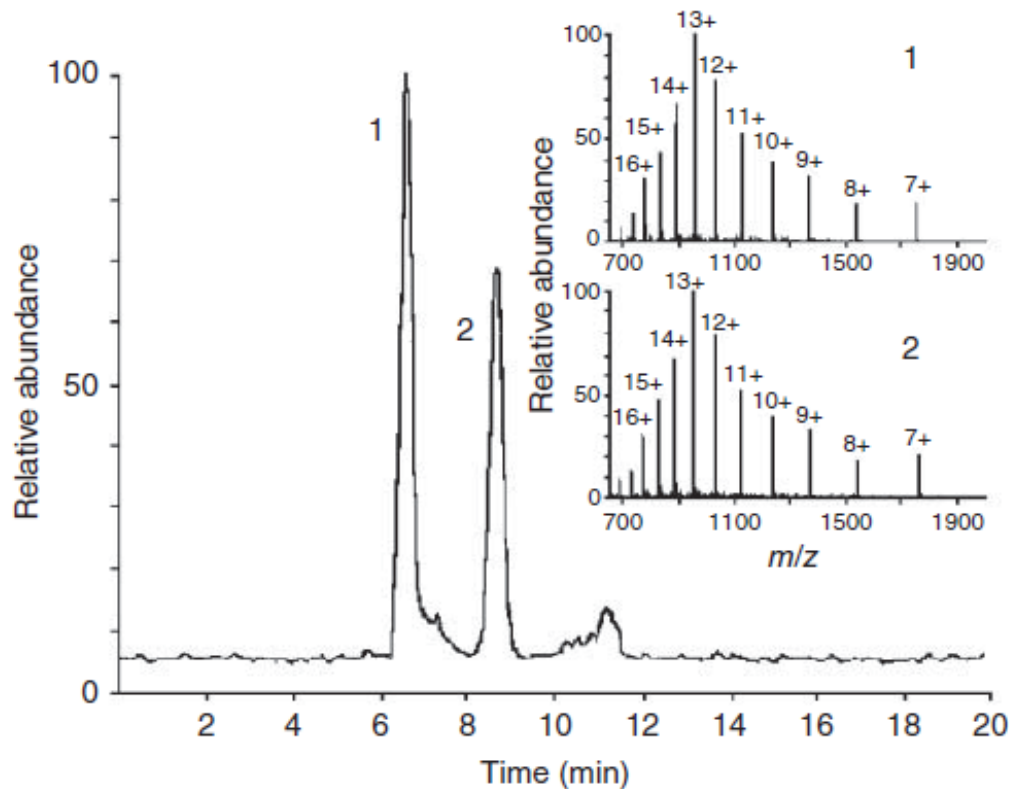
(c)

Figure 7.9 CZE-ESI-MS analysis of four standard proteins. (a) Base peak electropherogram. Colored MS spectra correspond to migration profiles of the designated proteins. (b) ETD and HCD fragmentation spectra of cytochrome c with the identified fragment ions. (c) Sequence maps show

combined fragmentation patterns of ETD and HCD for the four standard proteins. *Number of fragmentation sites: total fragmentation sites/overlapped fragmentation sites. (Reproduced from [142] with permission from American Chemical Society.)

CytC elválasztása

- Oxidált (Fe^{3+}) és redukált (Fe^{2+}) CytC elválasztása CZE-vel



He, T., et al. (1999) *Anal. Biochem.*, **271**, 189.

Figure 7.10 CZE-ESI-MS analysis of cytochrome c incubated with Bcl-X_L peptide, showing both the oxidized (1) and reduced cytochrome c (2). Insets show the ESI mass spectra of the peaks. (Reproduced from [143] with permission from Elsevier.)

CGE-MALDI-TOF-MS

- CGE-vel elválasztott fehérjéket egy mozgó poli(tetrafluoroetilén) (PTFE) membránra viszik fel
- erről SDS leoldható
- MALDI-TOF-MS-sel azonosíthatók a fehérjék

Bontott fehérjék vizsgálata CE-MS-sel

Klinikai proteomika

Klinikai proteomika – CE-MS

- A közlemények többsége az újfajta interfészek kifejlesztésére törekszik, amelyekkel jobb érzékenység érhető el (több azonosított fehérje)

Mintaelőkészítés

- (Klinikai) mátrixkomponensektől meg kell szabadulni
- Pl. vizeletben lévő natív peptidek vizsgálatára:
 - 2 M karbamidot, 10 mM NH_4OH -ot és 0,05% SDS-t tartalmazó vizes oldatban lett „elkészítve” a vizeletminta
 - Ultracentrifugálás (20 kDa MWCO filter) – nagy fehérjék eltávolítása
 - RP C2 oszlop – karbamid és sók eltávolítása
 - Peptidek eluálása 50% AcCN + 0,5% FA-val, majd hígítás 50 μL vízben
- Fehérjék: kvarckapillárisra tapadnának
- Sók: ionszupressziót eredményeznének

Mintaelőkészítés – bottom-up proteomika

- Tripszines fehérjeemésztmény sómentesítése C18-as centrifugaoszlop/pipettahegy segítségével
- Online immobilizált enzimes reaktorok
- 1. kapilláris: fehérjék elválasztása
- 2. kapilláris: peptidek elválasztása
- Köztük mágneses (cserélhető) részecskéken immobilizált tripszin

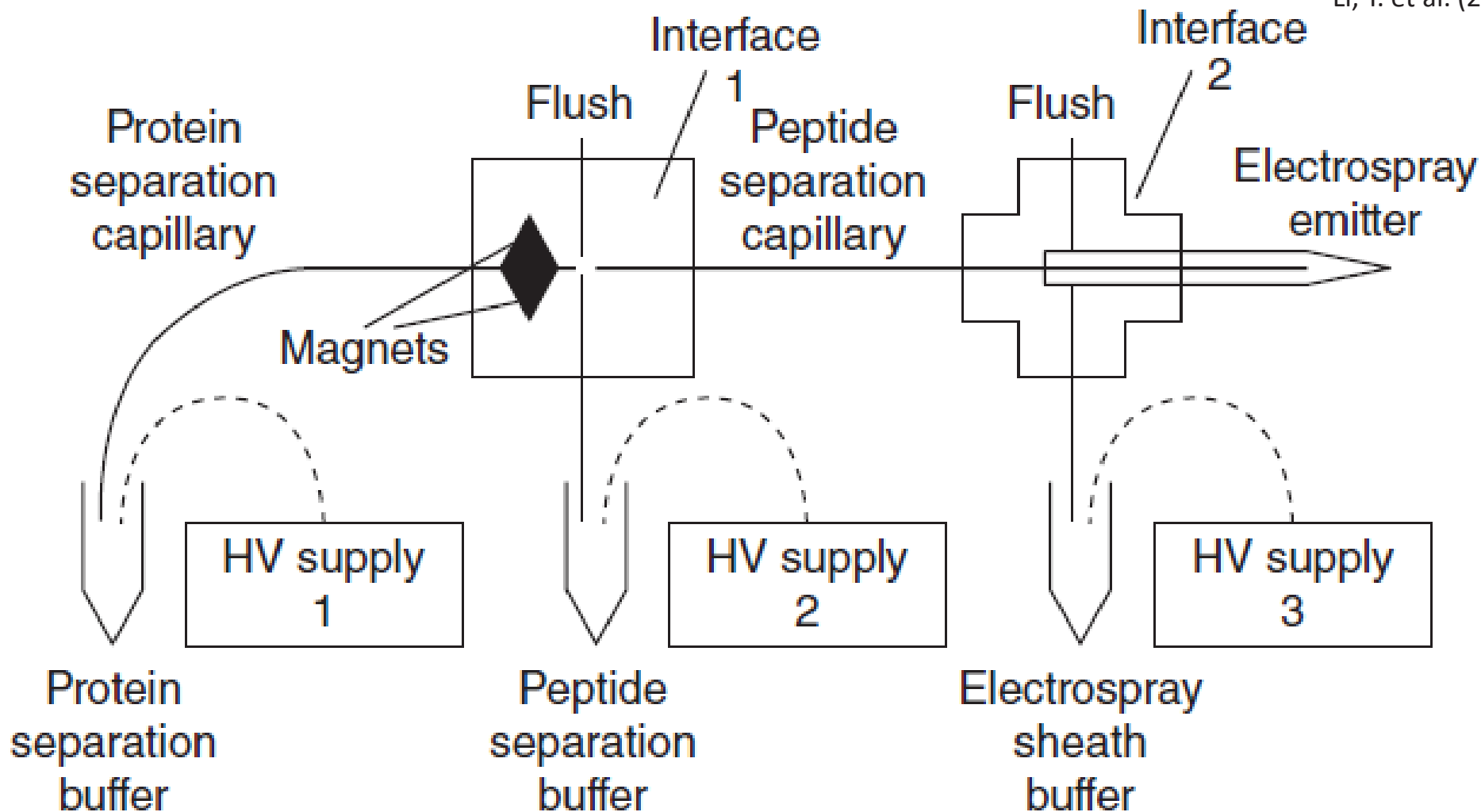
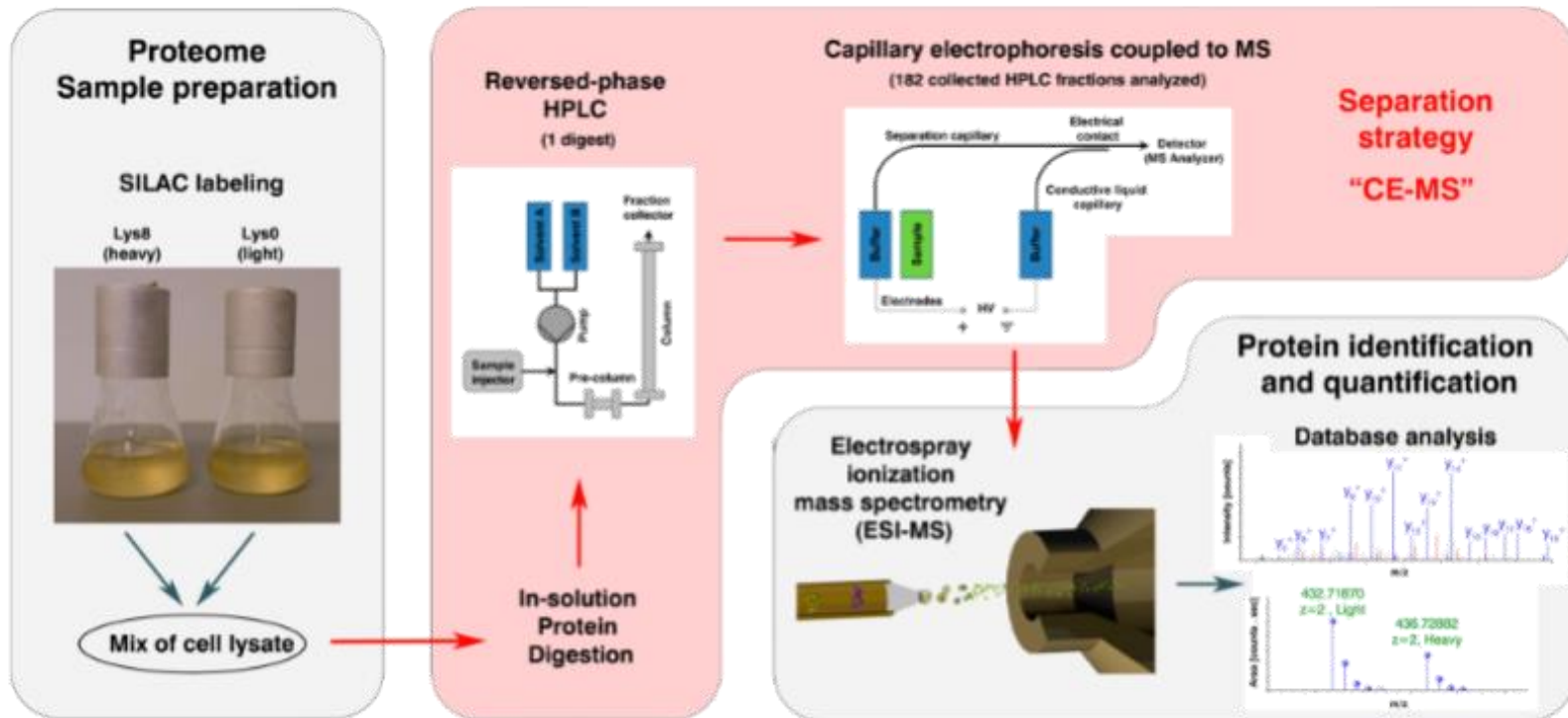


Figure 11.1 Scheme of the two-dimensional CE system containing a replaceable enzymatic microreactor for on-line protein digestion. The magnets hold the trypsin-modified

magnetic beads, forming the replaceable microreactor. High-voltage connections are shown as dashed curves. (Reproduced from [27] with permission from Elsevier.)

RPLC frakcionálás után CE-MS kvantitatív proteomika

- SILAC jelölés: sejt kultúrában, aminosavakból történő stabil izotóp jelölés



Faserl, K., (2015) *Anal. Chem.*, **87**, 4633–4640.

Cikk jó házi

Figure 1. Proteomic workflow used to characterize SILAC labeled yeast strains. Protein extracts of two yeast strains, one heavy-lysine labeled and one normal strain, were mixed. The protein extracts were digested enzymatically, fractionated by RP-HPLC, and analyzed by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. This approach is referred to as "CE-MS".

Peptidek vizsgálata sheathless CE-MS-sel

- Eredményt befolyásoló paraméterek optimalizálása
 - Emitter és MS inlet távolsága
 - Spray feszültség
 - Áramlási sebesség
 - Kapilláris bevonatok
- Fehérjeemésztés: endoproteináz Arg-C
- Tripszines emésztés sok 3 vagy 4-tagú peptidet eredményezne, hisztonokban sok Arg és Lys található
- K. Faserl et al.; Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary ElectrophoresisElectrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid ChromatographyElectrospray Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem. 2011, 83, 7297-7305.

Peptidek vizsgálata sheathless CE-MS-sel

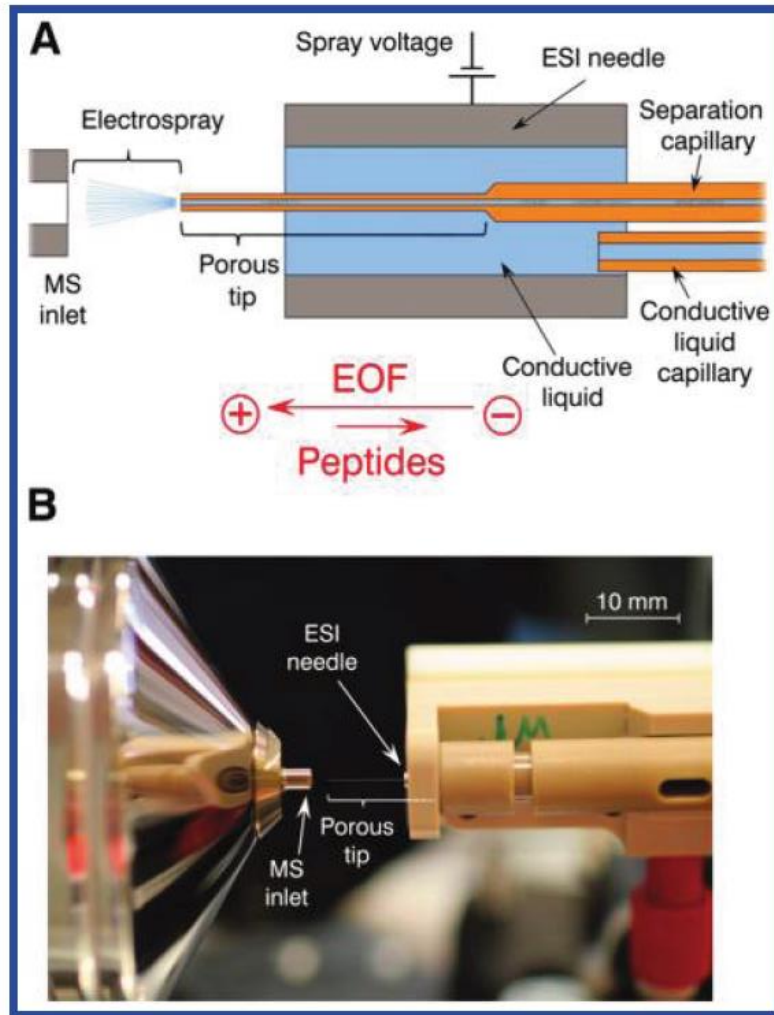


Figure 1. The high-sensitivity porous sprayer interface (A) schematic and (B) photograph of the prototype interface.

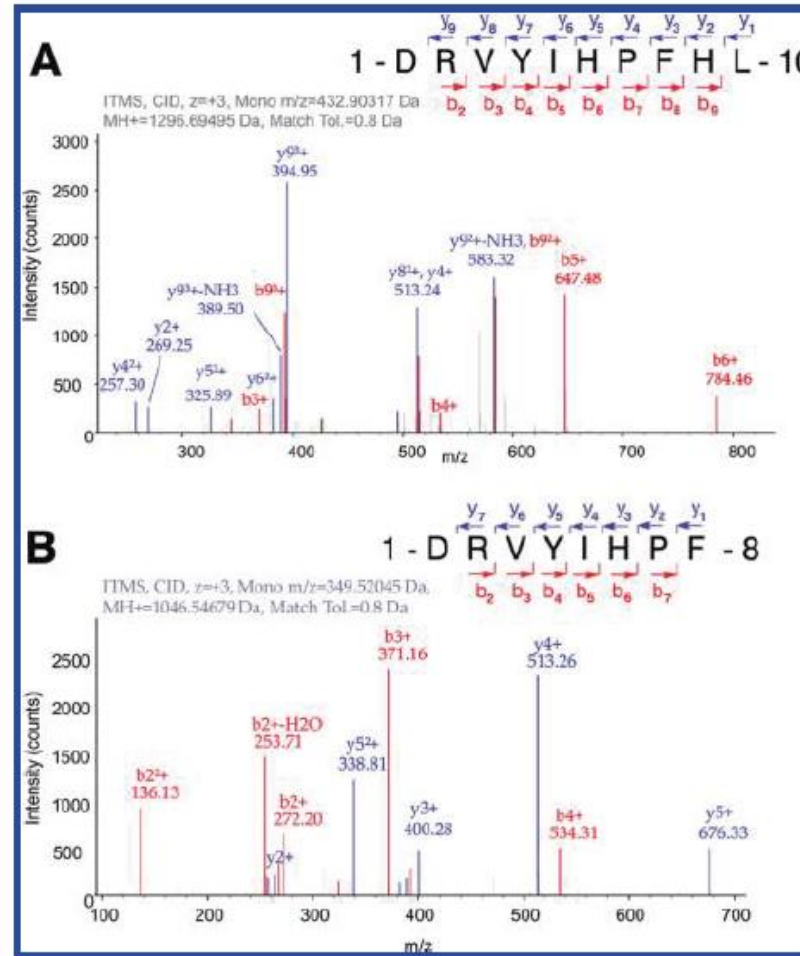
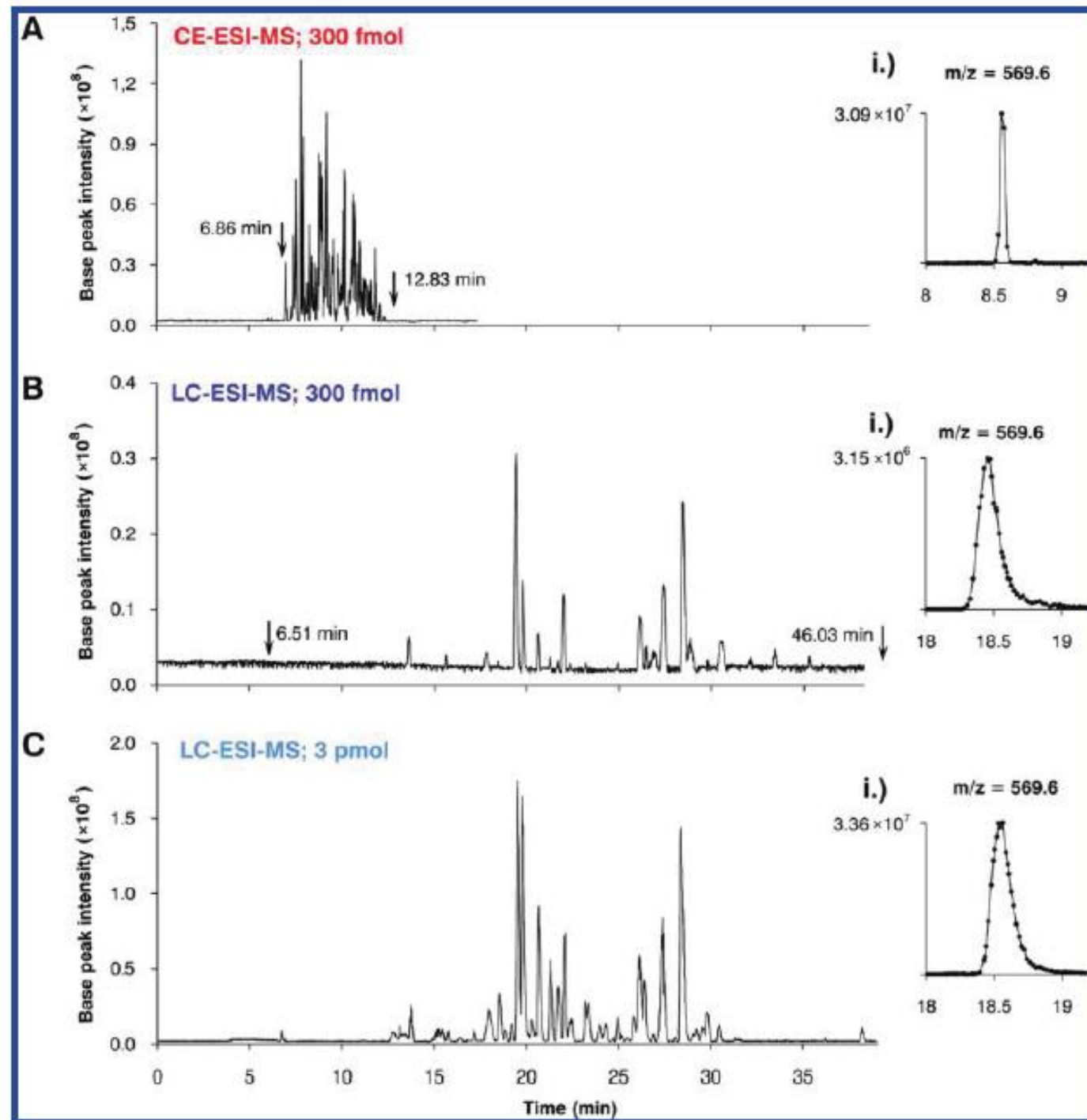


Figure 4. MS/MS spectra obtained from (A) 35.9 amol of angiotensin I and (B) 28.9 amol of angiotensin II. Sample concentration, 95.6 and 77 fmol/ μ L; injected volume, 0.38 nL; other conditions were as in Figure 2. Full scans were recorded in the LTQ Orbitrap XL; MS/MS spectra were recorded in the LTQ ion trap.

Peptidek (hisztonból) vizsgálata sheathless CE-MS-sel

- Figure 6. Base peak electropherogram and base peak chromatograms of rat testis H1 histones digested with endoproteinase Arg-C using (A) CE-ESI-MS, sample amount 6.15 ng (300 fmol); (B) LC-ESI-MS, 6.15 ng (300 fmol); (C) LCESI-MS, 61.5 ng (3.0 pmol). CE conditions were as described in Figure 5.
- LCESI-MS was performed using a homemade fritless column: packed 10 cm with 3 μm reversed-phase C18 (Reprosil). The gradient (solvent A, 0.1% formic acid; solvent B, 0.1% formic acid in 85% acetonitrile) started at 4% B. The concentration of solvent B was increased linearly from 4% to 50% during 50 min and from 50% to 100% during 5 min. A flow rate of 250 nL/min was applied.
- (i) Extracted mass trace of the ion $m/z = 569.6$ corresponding to the triply charged peptide KALAAAGYDVEKNNSR. Each dot represents a single full scan.



Peptidek (hisztionból) vizsgálata sheathless CE-MS-sel vs. nanoLC-MS

- Kisméretű peptidek jobban detektálhatók CE-vel elválasztva, mert LC-n kicsi a retenciójuk (hidrofilek)

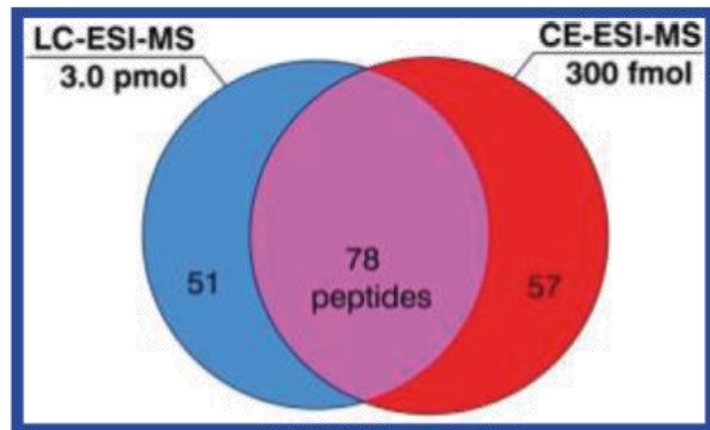


Figure 8. Venn diagram showing the overlap of histone H1 peptides identified by CE-ESI-MS and LC-ESI-MS. Data originate from Figure 6.

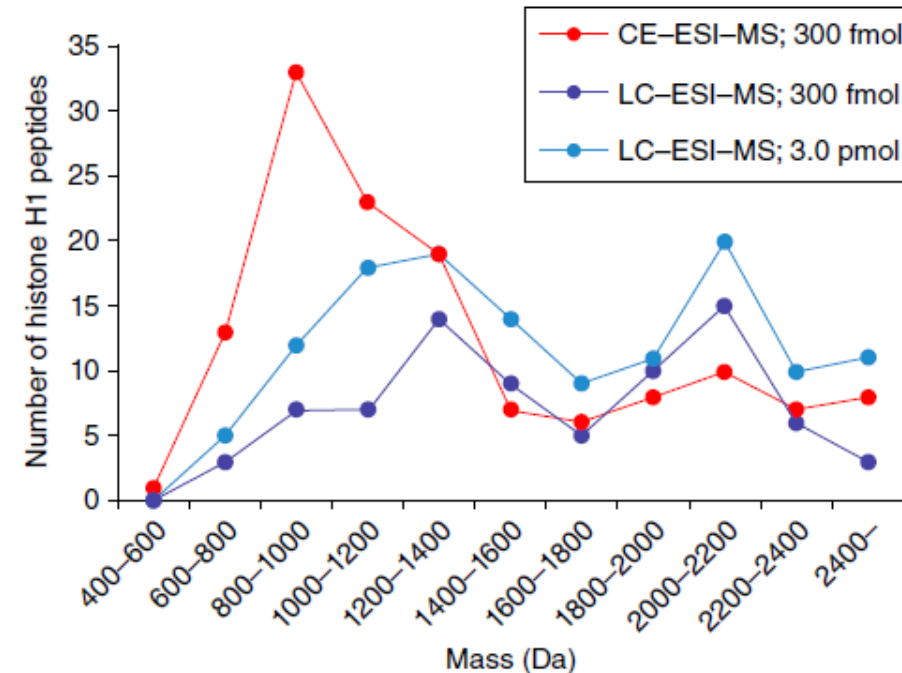


Figure 11.4 Mass distribution of histone H1 peptides identified from perchloric acid extracted from rat testis digest using CE-MS and nano-RPLC-MS. CE conditions: M7C4I-coated capillary (length, 100 cm with porous tip; i.d., 30 μm); BGE, 0.1% (v/v) formic acid; separation voltage, -25 kV; nano-RPLC-MS was performed with a homemade fritless column: packed 10 cm with 3 μm

reversed-phase C18 (Reprosil). The gradient (solvent A, 0.1% formic acid; solvent B, 0.1% formic acid in 85% acetonitrile) started at 4% B. The concentration of solvent B was increased linearly from 4% to 50% during 50 min and from 50% to 100% during 5 min. A flow rate of 250 nl min^{-1} was applied. (Reproduced from [34] with permission from American Chemical Society.)

Klinikai alkalmazás

- Krónikus vesebetegségben szenvedők vizeletvizsgálata

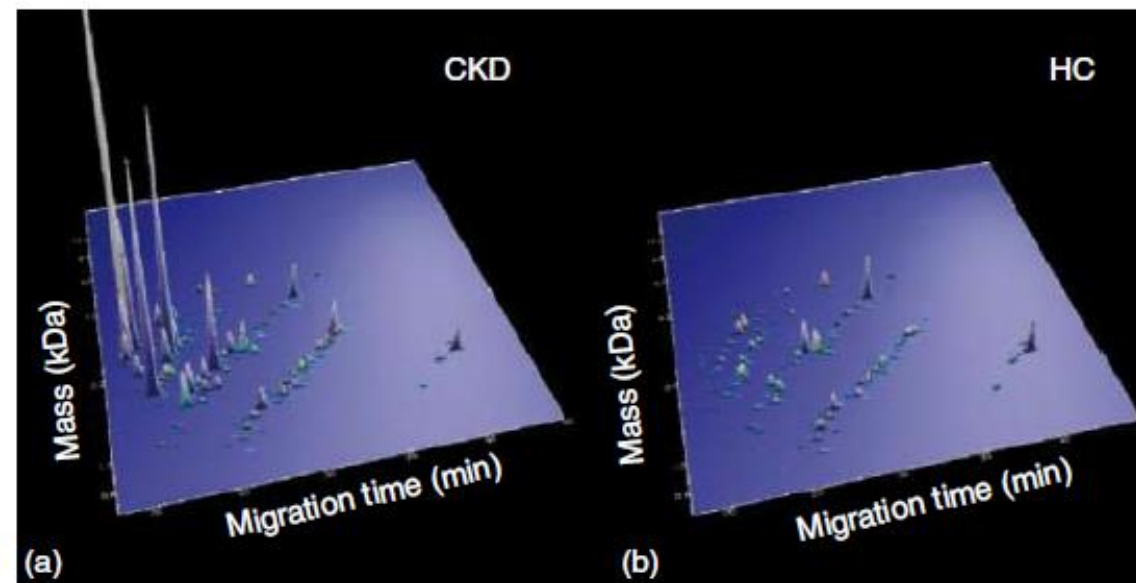


Figure 11.3 Urinary peptide profiles distinguishing patients with chronic kidney disease (CKD) from healthy subjects. Compiled data sets of urine samples from 230 patients with CKD (a) and 379 healthy control subjects (b) are shown. Normalized molecular mass (y-axis) is plotted against normalized CE migration time (x-axis). The mean signal intensity is represented in three-dimensional depiction. CE-MS analysis was performed

at low pH (1% acetic acid, pH ~2) using a 90 cm (50 μm ID) capillary, coupled to TOF MS via a sheath-liquid interface (flow rates in the range of 200 nl min^{-1} , without nebulizer gas) in the mass region $350\text{--}3000 m/z$. The sample was injected for 99 s using 1 psi for injection (circa 60 nl). (Reproduced from [18] with permission from American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

Egyéb

Mátrixhatások mérése CE-MS-ben

- A mintamátrix lecsökkentheti/növelheti az elválasztott mintakomponensek ionizációját
- Komponensek a SL-en keresztül áramlanak
- Mátrix van „elválasztva”
- MS-be érkezéskor lecsökken/ esetleg megnő a jel intenzitás

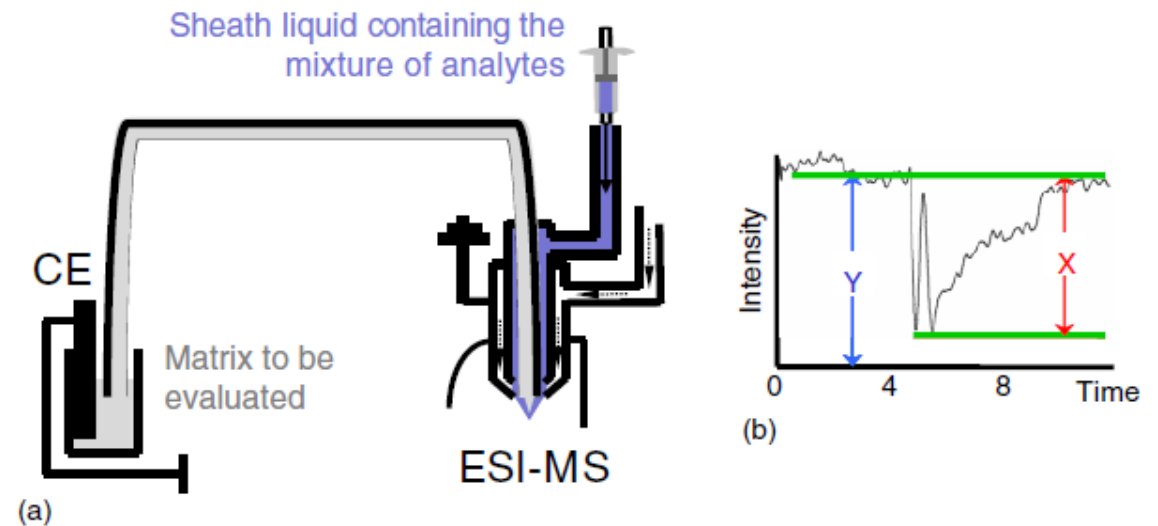


Figure 6.6 Qualitative evaluation of matrix effects by CE-MS. (a) Schematic representation of the coaxial sheath-flow interface used as a postcapillary infusion device and (b) Typical ESI-MS response measured.