

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**A tömegspektrometria előnye savas és amfoter kis és
makromolekulák vizes és nemvizes közegű elektroforetikus
analízisében**

PhD értekezés

Berkics Balázs Viktor

Témavezetők

Dr. Kilár Ferenc
egyetemi tanár

Fenyvesiné Dr. Páger Csilla
egyetemi adjunktus



Pécs, 2024.

TARTALOMJEGYZÉK

I.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
II.	BEVEZETÉS.....	7
III.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
	1. Kapilláris elektroforézis és tömegspektrometria kapcsolási lehetőségei.....	9
	2. Elválasztási stratégiák biológiai mintákhoz.....	9
	i. Szerves savak bormintákban.....	10
	ii. Fehérje molekulák CE vizsgálata.....	13
	iii. Lipid A.....	15
	3. Vizes és nemvizes közegben történő elválasztás.....	21
IV.	CÉLKITŰZÉSEK.....	26
V.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
	1. Reagensek.....	27
	2. Minta előkészítési protokollok.....	27
	i. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	27
	ii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	28
	iii. Lipid A NACE–ESI-QTOF MS/MS vizsgálata.....	29
	3. Mérési körülmények.....	29
	i. Alkalmazott műszerek és szoftverek.....	29
	ii. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	30
	iii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	31
	iv. Lipid A NACE–ESI-QTOF MS/MS vizsgálata.....	33
VI.	EREDMÉNYEK.....	35
	1. A vizes közegben történt módszerfejlesztések eredményei.....	35
	i. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	35
	ii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata.....	36
	2. A nemvizes közegben történt módszerfejlesztések eredményei.....	41
	i. Lipid A NACE–ESI-QTOF MS/MS vizsgálata.....	41
	ii. Az elválasztás hatékonysága és szelektivitása.....	42
	iii. Foszforilációs hely és acilálási profil meghatározása tömegspektrometriával.....	47
VII.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	51
	1. A módszerfejlesztésekhez kapcsolódó kihívások és problémák a CZE-MS és CIEF-MS kapcsolások során.....	51
	i. A kapillárisok.....	53

ii.	Az amfolitok	54
iii.	A szekvenciális injektálás	55
iv.	A fehérjék izoelektromos pontja összevetve az alkalmazott pH gradienssel	55
v.	Összegzés	56
2.	A módszerfejlesztésekhez kapcsolódó kihívások és problémák a NACE-ESI-MS/MS kapcsolások során	57
i.	A nemvizes közeg háttélelektrolitjának kiválasztása	57
ii.	A NACE–ESI-MS kapcsolat paraméterei triaxiális porlasztást alkalmazva	58
iii.	Összegzés	59
VIII.	ÖSSZEFOGLALÁS	61
IX.	MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK	62
1.	Az értekezés alapjául szolgáló publikációk.....	62
2.	Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok.....	62
X.	IRODALOMJEGYZÉK.....	64
XI.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	75

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN - acetonitril

AcOH - ecetsav

BGE - háttélelektrolit oldat

CE - kapilláris elektroforézis

CEC - kapilláris elektrokrómográfia

CE-MS - kapilláris elektroforézis – tömegspektrometria kapcsolása

CGE - kapilláris gélelektroforézis

CID - ütközés indukált disszociáció

CIEF - kapilláris izoelektromos fókuszálás

CL - kemilumineszcencia

CTAB - cetiltrimetil-ammónium-bromid

CZE - kapilláris zóna elektroforézis

DCM - diklór-metán

DNS - dezoxi-ribo-nukleinsav

E. coli - Escherichia coli

EC - elektrokémiail detektálás

ECL/EC - elektrokemilumineszcencia/elektrokémiail detektálás

EOF - elektroozmotikus áramlás

ESI - elektropray ionizációs interfész

FL - fluoreszcencia

GC - gázkromatográfia

HPLC - nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HPLC-MS - nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia - tömegspektrometria kapcsolása

IC - ionkromatográfia

ICR - ionciklotron rezonancia

ITP - izotachoforézis

LC-MS - folyadékkromatográfia – tömegspektrometria kapcsolása

Lipid A - egy heterogén csoportja a bakteriális külső membrán foszfo-glikolipidjeinek

LIT - lineáris ioncsapda

LOS - lipooligoszacharid makromolekula

LPS - lipopoliszacharid makromolekula

MALDI - mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció

MEKC - micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia

MeOH - metanol

MS - tömegspektrometria

MS/MS - tandem tömegspektrometria

MSⁿ - tandem tömegspektrometria (n számú)

NACE - nemvizes kapilláris elektroforézis

NACE-MS - nemvizes kapilláris elektroforézis – tömegspektrometria kapcsolása

NaOH - nátrium-hidroxid

PAA - poliakrilamid

PEO - polietilén-oxid

PVA - polivinil-alkohol

QIT - kvadrupól ioncsapda

QqQ - triple kvadrupól

QTOF - kvadrupól repülési idő analizátor

QTOF-MS - kvadrupól repülési idő analizátor – tömegspektrometria kapcsolása

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

TEA - trietil-amin

TLC - vékonyréteg kromatográfia

UV - ultraibolya

UV-DAD - ultraibolya dióda soros detektor

UVPD-CID - ultraibolya fotodisszociációs fragmentáció

II. BEVEZETÉS

A kapilláris elektroforézis (CE) egy modern, sokoldalú analitikai technika, amelyet pozitívan töltött, negatívan töltött és töltés nélküli vegyületek elválasztására használnak, akár ugyanabban a mérésben is. Bár a módszert először Tiselius használta 1937-ben, a CE alapjait Hjertén fektette le 1967-ben, aki először mutatta be a különböző vegyületek elválasztásának (elméletét, előnyeit és hátrányait) lehetőségét olyan forgócsövek segítségével, amelyek belső átmérője 3 mm volt szabad zóna elektroforézisben. [1] Az évek során különböző CE módokat fejlesztettek ki és tanulmányoztak, nevezetesen a kapilláris zóna elektroforézist (CZE), a kapilláris gélelektroforézist (CGE), a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiát (MEKC), az izotachoforézist (ITP), a kapilláris izoelektromos fókuszálást (CIEF) és a kapilláris elektro-kromatográfiát (CEC). [2] A CE mára egy általánosan használt elválasztási technikává vált, mivel nagyon kis mennyiségű mintát igényel (1-10 nL), könnyen automatizálható és alkalmazható, rövid elemzési idővel rendelkezik és rendkívül sokoldalú.

A CE során többféle detektálási stratégia alkalmazható. Korábban leginkább UV vagy fluoreszcens detektorokat használtak, melyekhez szükséges a kapilláris külső bevonatának eltávolítása. Más készülékeket vezetőképesség és amperometrius detektorokkal szereltek fel. Manapság a tömegspektrometria (MS) egyre gyakrabban használt detektálási mód a CE-ben. A CE és az MS kapcsolása igen hatékony analitikai eszközt eredményez, mivel kombinálja a kiemelkedő detektálási érzékenységet, a szerkezeti információk nyújtásának képességét és a CE magas elválasztási hatékonyságát. Így a CE-MS mind a detektálást, mind az ismeretlen minta szerkezetének meghatározását kínálja.

A kapilláris elektroforézis képes elkerülni a szerves oldószerek használatát az elválasztások során. A nemvizes kapilláris elektroforézis (NACE) a környezeti és toxicitási aggályok mellett akkor kerül szóba, ha az adott vizsgálandó vegyület nem oldódik közönséges vizes oldószerekben, pufferben és felületaktív anyagokban, például hidrofób ionos vegyületeknél. Emellett a legtöbb szerves oldószer könnyebben párolog és alacsonyabb felületi feszültséggel rendelkezik, mint a víz, ami a NACE-t alkalmasabbá teszi az MS-hez való kapcsoláshoz. Ennek eredményeként a NACE-MS kapcsolat nagyon

hatékony és sokoldalú, mivel ez az analitikai technika számos előnnyel rendelkezik: gyors, nagy hatékonyságú, alacsony mintafelhasználású és magas szelektivitású. [3-5]

Az értekezésben bemutatásra kerülő kifejlesztett módszerek hozzájárulnak:

- hat féle szerves sav kimutatásához bormintákból és ezáltal borok minőségi ellenőrzéséhez, eredetvizsgálatához;
- tömegspektrometriás kapcsolat kialakításához szekvenciális injektálási protokollal megvalósított kapilláris izoelektromos fókuszálás során, új lehetőségeket nyitva fehérjék elválasztásához;
- lipid A molekulák szerkezeti vizsgálatához, foszforilációs és acilációs profiljaik meghatározáshoz, ezáltal a bakteriális fertőzések és kiváltott immunválaszaik pontosabb megértéséhez.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kutatás és az eredmények könnyebb megértése érdekében egy rövid irodalmi áttekintésre kerül sor. Először a CE-MS kapcsolás lehetőségei, majd a biológiailag fontos minták, például szerves savak, fehérjék és lipid A molekulák elválasztási stratégiái kerülnek bemutatásra. Végül a CE-t használó vizes és nemvizes rendszerekben végzett elválasztások kerülnek részletezésre.

1. Kapilláris elektroforézis és tömegspektrometria kapcsolási lehetőségei

A kapilláris elektroforézis és a tömegspektrometria összekapcsolása egy hatékony analitikai eszközt eredményez az élettudományokban, például a proteomikában, metabolomikában, glikomikában és gyógyszer analízisben, mivel a CE elválasztási hatékonysága kombinálódik a MS detektálási érzékenységgel és a szerkezeti információk nyújtásának képességével. A CE-MS kapcsolat leggyakrabban elektropray ionizációs (ESI) interfész használatával történik. Az első tudományos közlés óta többféle típusú CE-MS interfész került bemutatásra. Azonban nem egyszerű a CE-t az MS-el kapcsolni, mert a két eszköz között zárt elektromos áramkört kell létrehozni. Emellett a kapilláris kimenetének, amely az MS forráshoz csatlakozik, háromelektrodás rendszert kell képeznie (CE bemenet, CE kimenet/ESI-kibocsátó, MS bemenet). Ráadásul az MS érzékeléshez nagyon stabil ionizációs folyamatot kell biztosítani. A tervezés alapján három fő kategóriába sorolhatjuk a CE-MS kapcsolási stratégiákat: koaxiális köpenyfolyadék áramú, köpenyfolyadék nélküli és folyadékcsatlakozási interfészek. A minták közvetlen ionizálásához ambiens nyomáson, egy új deszorpciós ionizációs módszert írtak le. [6]

2. Elválasztási stratégiák biológiai mintákhoz

Ebben a szakaszban az analitikai stratégiák kerülnek áttekintésre, amelyek a dolgozathoz kapcsolódó minták elválasztásához voltak szükségesek.

i. Szerves savak bormintákban

Manapság egyre növekvő érdeklődés mutatkozik a természetes antioxidáns, antimikrobiális és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkező vegyületek iránt. A bor számos vegyületet tartalmaz, mint például szénhidrátokat, szerves savakat, polifenolokat, fehérjéket, alkoholokat, ásványi anyagokat és egyéb összetevőket, egy nagyon összetett keveréket eredményezve. A borokban található szerves savakat antioxidáns jellegük következtében szükségszerű vizsgálni. [7, 8]

A szerves savak fontos vegyületek, amelyek befolyásolják a szőlő és a bor stabilitását, ízét, aromáját és színét. A szőlőkben található szerves savak több mint 90%-a almasavból és borkósavból származik, amelyek élesztők és mikroorganizmusok anyagcseréjének eredményeként keletkeznek az erjedési folyamat során. Ezek a vegyületek erős savak, és alacsony molekulatömegűek (<192,1 g/mol, <5,03 pKa), hozzájárulnak a borok pH-jához, kémiai és mikrobiológiai stabilitásához, így felelősek a bor érzékszervi és esztétikai jellegéért. [9, 10] A szőlők savtartalma 8 és 13 g/L között mozog, és nagymértékben függ a szőlőfajtától és az év során uralkodó éghajlati viszonyoktól. A borban lévő savak koncentrációja 5,5 és 8,5 g/L közötti. [11]

1. Táblázat A szerves savak jellemzői a PubChem adatbázis alapján [8]

Szerves savak és kémiai képleteik	Moláris tömeg [g/mol]	Sűrűség [g/cm ³]	Olvadáspont [°C]	Disszociációs állandó [pKa]
Oxálsav (COOH) ₂	90.03	1.90	189.50	4.40
Borkósav C ₄ H ₆ O ₆	150.09	1.70	168.00	3.07
Hangyasav HCOOH	46.03	1.22	8.30	3.75
Almasav C ₄ H ₆ O ₅	134.09	1.60	127 - 132	3.51; 5.03
Ecetsav CH ₃ COOH	60.05	1.04	16.60	4.76
Citromsav C ₆ H ₈ O ₇	192.10	1.54	153.00	2.79
Borostyánkősav C ₄ H ₆ O ₄	118.10	1.57	188.00	4.21
Fumársav C ₄ H ₄ O ₄	116.07	1.64	287.00	4.54
Tejsav C ₃ H ₆ O ₃	90.08	1.20	16.80	3.86

A szőlőben megtalálható fő savak: az oxálsav, a borkósav, a tejsav, a fumársav, az almasav és a citromsav, míg a borban a tejsav, a borostyánkősav és az ecetsav képződik az alkoholos erjedés során. [12] Ezeknek a savaknak a jellemzői megtalálhatók az **1.**

táblázatban. A szőlőkben és a borokban borkősav található legnagyobb mennyiségben, amely jelentősen befolyásolja a borok teljes savasságát. A nem érett szőlőben a koncentráció akár 15 g/L is lehet, míg a napsütéses órák számától függően a mustban 2-6 g/L. Ez az érték az erjedés során lecsökken a tartarát kristályok kicsapódása miatt. Az almasav jelenléte érdes ízt ad a borhoz. Tartalma csökken az almasav-bontó erjedés során, mivel tejsavvá alakul, ami „borpuhítást” (a bor aroma tartalma emelkedik, lágyabb és testesebb íz létrejötte) eredményez és gyümölcsös ízt szabadít fel. A citromsav gátolja az élesztők növekedését, és részt vesz a biokémiai és anyagcsere-folyamatokban (pl. Krebs-ciklus). [13] A bor készítése során ez a komponens hozzáadható a borhoz azért, hogy szabályozza a savasságot, de koncentrációja nem haladhatja meg az 1 g/L-t. A szukcininsav kesernyés jegyeket ad a borhoz, és az alkoholos erjedés során keletkezik. A shikiminsav alacsony koncentrációban (10-150 mg/L) jelen van a mustban majd átkerül a borba a maceráció és erjedés folyamatai során. A shikiminsav-tartalom alapján meghatározható a szőlő eredete. [14] A szukcininsav, az ecetsav, a citromsav, a tejsav, az almasav és a glutaminsav másodlagos támogatóként szerepel a vas felszívódásában. Antibakteriális aktivitást tulajdonítottak a szukcininsavnak, az almasavnak, a tejsavnak, a borkősavnak, a citromsavaknak és az ecetsavnak. [15]

Mivel a szerves savak fontosak a bor stabilitása szempontjából, koncentrációjukat nyomon kell követni az egész borászati folyamat során, kezdve a szőlő levétől, folytatva az alkoholos erjedésen át, egészen a bor stabilizálásáig. A savtartalom analízise használható például az eredetiség meghatározására vagy a minőségellenőrzési folyamatban a tárolás vagy az érlelés miatti romlás jeleként, mivel a szerves savak osztályai és tartalma jellemző ízt adnak a borhoz. Az italokban, így a borokban található szerves savak mennyiségi meghatározása igen fontos az ipari és a kutatási szektorban is. [8] A szerves savtartalom ellenőrzése bormintákban nemcsak élelmiszer minőségellenőrzési szempontból fontos, hanem az emberi egészségre gyakorolt jótékony hatásai miatt is. [16]

A szerves savak meghatározása általában kromatográfiai technikákkal történik, például nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) [17-19], gázkromatográfiával (GC)

[20, 21] vagy ionkromatográfiával (IC). [22, 23] Ezek a technikák lehetővé teszik a metabolitok elválasztását, detektálását, jellemzését és mennyiségi meghatározását.

A fentebb említett technikák korlátai miatt előtérbe került szerves savak meghatározására szőlőben és borokban a kapilláris elektroforézis alkalmazása, mivel rövid analízisidővel, hatékony felbontással, automatizálva vizsgálhatók kevés vegyi anyag és minta felhasználásával. [9-12, 24-26] A CE sokoldalú eszköz az olyan bonyolult minták, mint például a bor analíziséhez, mivel lehetővé teszi azon töltött és poláris vegyületek elválasztását és azonosítását, amelyeket nem lehet szétválasztani HPLC módszerekkel vagy GC-vel. Ezen kívül lehetőséget kínál a különböző jellegű, akár hőinstabil minták egyidejű analízisére egyetlen futtatásban, bonyolult mintaelőkészítés nélkül. [22]

Általánosan elmondható, hogy a kapilláris elektroforézis módszerei hasznos technikák az alacsony molekulatömegű szerves savak analíziséhez. [27, 28] A legutóbbi jelentős áttekintések, amelyek a kapilláris elektromigrációs módszerek alkalmazásának előrehaladásaira összpontosítanak az élelmiszeranalízisben, összefoglalnak a borkészítés során néhány fontosabb aspektust. [29-32] Ezek az áttekintések széles körűen mutatják be az élelmiszerrel kapcsolatos, különböző kémiai tulajdonságokkal rendelkező molekulákra vonatkozó CE analíziseket (aminosavak, biogén aminok, szénhidrátok, királis vegyületek, szennyező anyagok, DNS-ek, élelmiszer-adalékanyagok, heterociklusos aminok, lipidek, peptidek, növényvédő szerek, fenolok, pigmentek, polifenolok, fehérjék, maradványok, toxinok, vitaminok, kis szerves és szervetlen vegyületek, valamint egyéb kisebb vegyületek).

Az elválasztási hatékonyság javítása érdekében a kapilláris hosszúságot, a puffer ionerősségét, pH-ját és viszkozitását szükséges beállítani. A kapilláris elektroforézis tömegspektrometriával való kapcsolása [33], vagy különösen egy kvadrupól repülési idő tömegspektrométerhez (QTOF-MS) kapcsolása hatékonyan növeli az érzékenységet, magas tömegpontosságot és felbontást biztosítva nagy mintamérési sebesség mellett. Az utóbbi technika alkalmazására a borok elemzésében ezidáig nem állt rendelkezésre irodalmi közlemény.

ii. Fehérje molekulák CE vizsgálata

Manapság növekvő érdeklődés tapasztalható a tömegspektrometrián alapuló módszerek iránt a proteomikai kutatásokban. A CE-MS hatékonyan használható proteomikai vizsgálatokra. [4] Ebben a szakaszban a CE módszerek lehetőségei, korlátai és kihívásai kerülnek megvitatásra szintetikus és biológiai mintákból történő fehérjék és peptidek vizsgálata során.

A proteomikai közösség figyelemmel követi a CE-MS platformok legújabb előrelépéseit, mint például hatékony és gyors elválasztások, alacsony minta- és oldószerfogyasztással, amelyek vonzó eredményeket mutatnak. Így a CE-MS alternatívává válhat az LC-MS-hez képest. [34, 35]

A CE elválasztások vizes pufferekben végrehajthatók, a fehérje komplexek elválaszthatók az eredeti szerkezetükben, így megőrizve a fehérjéken belüli nem-kovalens kölcsönhatásokat és a fehérjeegységek közötti kölcsönhatásokat, még az MS-detektálás előtt.

Számos CE-alapú technikát publikáltak már fehérjék és peptidek analízisére, azonban leggyakrabban a CZE-t használják. [34] CZE során a minták eltérő sebességgel vándorolnak a kapillárisban a töltés/méret arány szerint.

A proteomikában egy másik gyakori CE elválasztási technika a CIEF, amely magas felbontású elválasztásokat kínál. [36] A CIEF során az elválasztás a minták izoelektromos pontja alapján történik. A CIEF offline és online kapcsolása az MS-sel Hühner és munkatársai által 2015-ben áttekintésre került. [37]

Egy hagyományos CIEF rendszerben a mintát egy amfolit oldattal keverik össze, mielőtt beinjektálnák a kapillárisba. [38] A feszültségkülönbség által létrehozott pH-gradiens miatt, a minta molekulái elkezdnek vándorolni a kapillárisban, amíg el nem érik az izoelektromos pontjaiknak megfelelő pH-értéket. A CIEF MS-sel való összekapcsolásakor a katoliont az ESI interfész segítségével juttatják be az MS-be, ami magas háttérzajt eredményez, és nem kompatibilis a köpeny nélküli interfésszel, így ez a módszer nagyon korlátozottan használható.

Kilár és munkatársai kifejlesztettek egy szekvenciális injektálási protokollt, amelyben az amfolitokat és a minta komponenseit külön-külön injektálják be. [39] A szekvenciális beinjektálási protokoll, más előnyök mellett, lehetővé teszi olyan amfoter vegyületek elválasztását, amelyek pI -értékei nem esnek a mérés során alkalmazott amfolitok pH-tartományába. Páger és munkatársai sikeresen demonstrálták a CIEF MS-sel való kapcsolását az amfoter festékek és az amfolitok egymás utáni injektálása után (amfolit-minta-amfolit sorrendben) és megmutatták, hogy a szétválasztás elérhető egyetlen amfolit-zóna alkalmazásával is (a minta zónája előtt vagy után). [40] Számítógépes szimulációkat végeztek annak érdekében, hogy megvizsgálják a különböző minta injektálási stratégiák hatását a CIEF-ben [41], tanulmányozva a minta komponenseinek viselkedését az amfolitok pH gradiensen kívül eső pI -értékekkel. [42]

A fehérjék, különösen a pozitív töltésű fehérjék hajlamosak megkötődni a fedetlen, negatív töltésű szilika kapilláris felületén, ami jelentős problémákat okoz, mint például az elektroosmotikus áramlás (EOF) megváltozása, csúcs szélesedés, elválasztási hatékonyság csökkenése és csúcs aszimmetria. Számos megközelítés került leírásra az ilyen nemkívánatos fehérje-kapilláris fal kölcsönhatások minimalizálására. Az elektroosmotikus áramlás (EOF) a töltéssel rendelkező felület (uncoated – nem bevonatos – kapilláris) mentén, elektromos tér hatására kialakuló folyadékáramlás. [43]

Egyik ilyen megközelítés az extrém pH használata [44] vagy magas ionerősség [45], de ezek sok mintamolekula esetében nem megfelelőek, gyenge hatékonyságot és hosszú analízisidőt eredményezve. [46]

Egy másik megközelítés a kapilláris bevonatok használata, amelyek csökkenthetik a fehérje adszorpciót, és lehetővé teszik az EOF finomhangolását a szelektivitás javítása érdekében. [47] A leggyakrabban a kapillárisfal módosítása történik [48-57], amelyet főként a következőként lehet kategorizálni: kovalensen kötött polimer bevonatok [52], fizikailag adszorbeált polimer bevonatok (statikus és dinamikus) [53-57] és kis molekulatömegű adalékok.

A dinamikus bevonatok használata esetén a háttéreltrolitban oldható anyagok könnyen hozzáadhatók a futópufferhez annak érdekében, hogy befedjék a kapilláris falat a szétválasztás során [58] és a felületi koncentrációjukat úgy állítják be, hogy

megőrzik az egyensúlyt a folyadék és a szilárd felületi fázisok között. A leggyakrabban használt anyagok vagy kis ionok, mint például aminok vagy oligoaminok, anionos és kationos felületaktív anyagok (nátrium-dodecil-szulfát - SDS, cetiltrimetil-ammonium-bromid - CTAB, stb.), vagy semleges hidrofil polimerek, mint például a polietilén-oxid (PEO), polivinil-alkohol (PVA), cellulózok, dextránok és ion folyadékok. [48, 58-60] A dinamikus bevonatok gazdaságosak, könnyen előkészíthetők és hatékonyan lefedik a szilanol csoportokat a szilika kapilláris belső felületén. [46] Ezeknek az egyensúlyon alapuló bevonatoknak folyamatosan regenerálódniuk kell a kapilláris falon adszorbeált réteg frissítésével. [61] Ha szükséges, a bevonat eltávolítása is könnyű, mivel reverzibilisen adszorbeálódnak a kapilláris felületére. [59] Sajnos a dinamikus bevonatok zavarhatják a szétválasztási és/vagy detektálási rendszereket, különösen a tömegspektrometriát. Ha a bevonat belép az MS-be, akkor a minta jelcsökkenését és/vagy az ionforrás és az ionoptika szennyeződését okozhatja. [62]

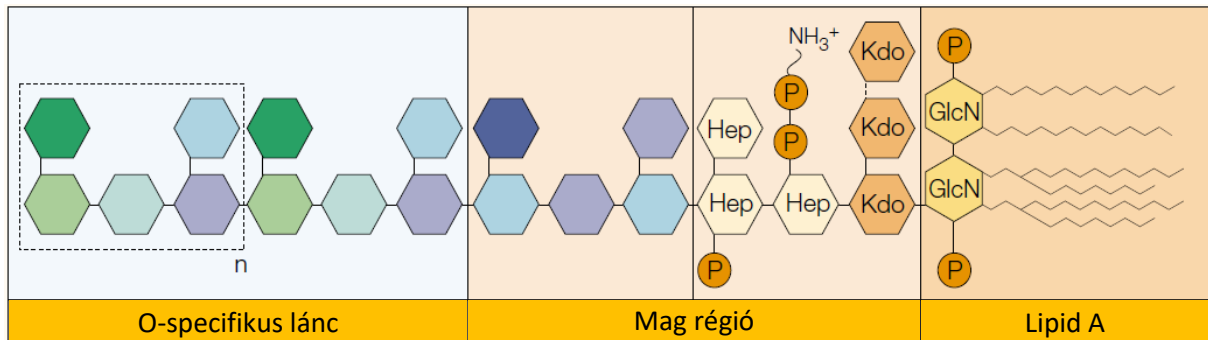
Az állandó bevonatok az üveg kapilláris belső felületéhez vagy fizikai adszorpcióval, vagy kovalens kötéssel, irreverzibilisen kapcsolódnak. [63] A fizikailag adszorbeált állandó bevonatok előnyei a következők: (i) egyszerűség a bevonat kialakításában; (ii) könnyű bevonatregenerálási lehetőség; és (iii) minimális függés a felület kémiai tulajdonságaitól. [48, 51] A bevonatok elektrosztatikus, hidrofób kölcsönhatások vagy hidrogénkötések segítségével adszorbeálódnak a szilika felületére. [64] A dinamikus bevonatokkal ellentétben az állandó fizikai bevonatok nem igényelnek stabilizáló anyagokat a háttérelektrolitban a felületi lefedettség fenntartásához.

A kovalens (kémiai) kapilláris bevonatok általában magukban foglalják a szilika kapilláris falán lévő felületi szilanol csoportok módosítását. A kovalens bevonatok hosszú távú stabilitást biztosítanak és kompatibilisek a tömegspektrometriás detektálással. [62]

iii. Lipid A

A lipopoliszacharid- és lipooligoszacharid-típusú makromolekulák (LPS/LOS) - más néven endotoxinok - jellemző összetevői a Gram-negatív sejtfa külső membránjának. Ezek a sejtfa felület 75%-át fedik le. A szerkezeti egységek alapján különböző kemotípusok különböztethetők meg: S-, SR- és R-kemotípus. Az S-típusú LPS molekulák Gram-negatív baktériumokból származnak és három különböző kovalensen kapcsolt régióra

oszthatók, amelyeket az **1. ábrán** láthatunk: 1) az O-poliszacharid lánc, 2) a mag oligoszacharid, amely külső és belső magra osztható, és 3) a hidrofób foszfo-glikolipid, más néven lipid A régió. [65]



1. Ábra LPS molekula szerkezete [65] Rövidítések: GlcN - D-glükózamin; Hep - L-glicero-D-manno-heptóz; Kdo - 2-keto-3-deoxi-oktulozonsav; P - foszfát. [65]

A Lipid A egy heterogén csoportja a bakteriális külső membrán foszfo-glikolipidjeinek, amelyek fontos szerepet játszanak a Gram-negatív sepszis patogenezisében. Intenzív heterogenitás jelenik meg a Lipid A törzsei között, amely lehet, bizonyos csoportok száma és pozíciója, más szubsztituensek jelenléte vagy a zsírsavak számának, pozíciójának és típusának különbsége miatt.

Általában a vázban két 2-amino-2-deoxi-D-glükópiranóz diszacharid található, néhány esetben megfigyeltek egy 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glükópiranóz diszacharidot is. [66, 67] Egy foszforsav csoport is kapcsolódik a vázhoz, amely további szubsztituensekkel módosítható, mint például foszforsav, foszfoetanolamin, etanolamin, glükózamin, galaktozamin, aminoarabinóz, stb. A C2/C2' pozíciókhoz amidkötésű zsírsavak, a C3/C3' pozíciókhoz észterkötésű zsírsavak kapcsolódnak, amelyek legtöbb esetben β -hidroxizsírsavak. További észterkötésű zsírsav-szubsztitensek, másodlagos zsírsavak is jelen lehetnek ezeken az elsődleges β -hidroxizsírsavakon. A természetes előfordulású lipid A változatok különböző kombinációkat képezhetnek a központi diglükózamin vázhoz kapcsolódó foszforilációból és acilációból.

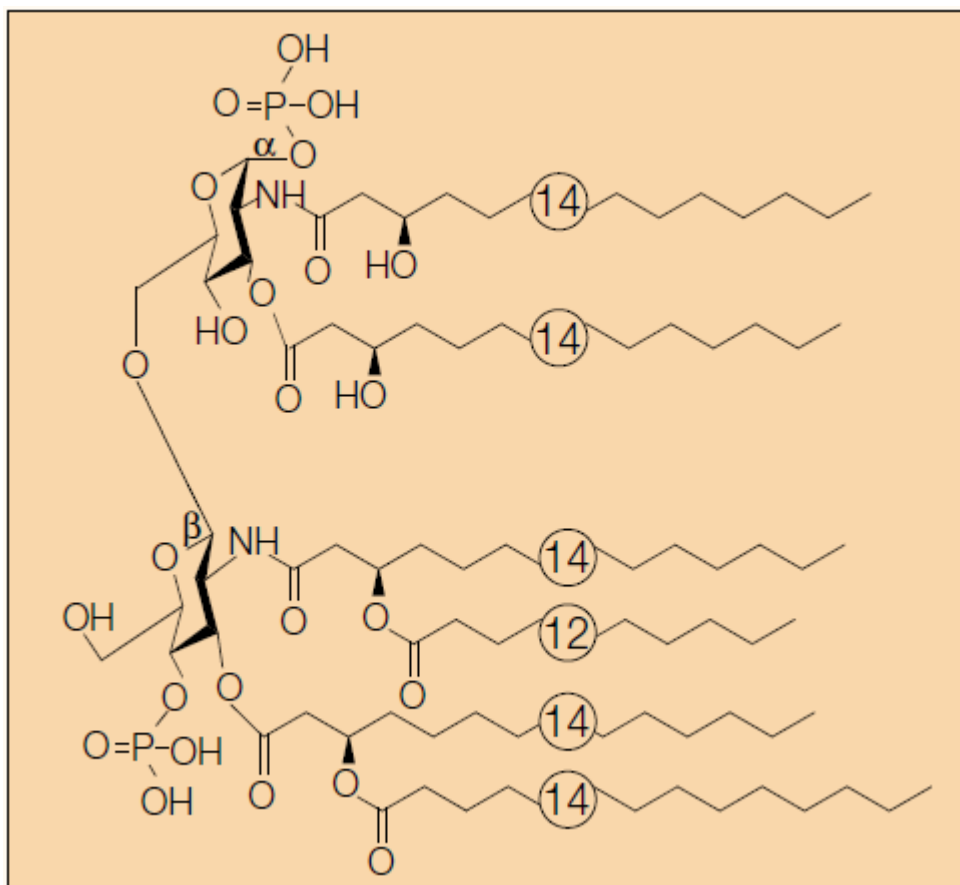
Az *Escherichia coli* által termelt kanonikus lipid A, amelyet a **2. ábrán** láthatunk, egy C1-/C4'-biszfoszforilált $\beta(1\rightarrow6)$ kötésű d-glükózamin diszacharid, amelyen négy 3-hidroxi-mirisztoil csoport található a C2 és C2', valamint a C3 és C3' pozíciókban amid- vagy észter-kötések révén, amelyek közül kettő (a C2' és C3' pozíciókban) további lauril- és mirisztinsavval észterezett. [68, 69] Az ilyen lipid A szerkezet hat acil-lánccal (12–14 szénatom hosszúságú) és két foszfát csoporttal rendelkező jelátviteli útja optimális a lipopoliszacharid receptor teljes aktiválásához. [70]

Az endotoxinok lipid A régiója lényeges szerepet játszik a gazda immunrendszer megfelelő működésében. [71] Amikor az LPS molekulák szabadulnak fel a Gram-negatív baktériumokból, a lipid A régió kölcsönhatásba lép a Toll-like receptorokkal az immunsejtek felszínén. [72] Ez a folyamat megelőző mechanizmus a fertőzések megszüntetésére és a rákos sejtek szaporodásának megelőzésére. Azonban a szepszisben, a Gram-negatív fertőzés miatt, az endotoxinok magasabb koncentrációjának jelenléte a véráramban túlzott, szabályozatlan immunválaszokhoz, szepszis sokkhoz, vagy akár halálhoz vezethet. [73, 74]

Általában a következő szerkezeti jellemzők határozzák meg ezeknek a vegyületeknek a biológiai hatékonyságát: a zsírsav-lánccok száma, kötőhelyei és típusa, valamint a foszfát csoportok száma és cseréje (például foszfoetanolamin vagy glikozil maradékokkal). [75-78] A foszforil és acil csoportok száma és pozíciója kulcsfontosságú szerkezeti meghatározó tényező azok biológiai aktivitásában. Például, a gazda immunválasza gyengül, ha a lipid A alul acilált (vagy akár túl acilált), vagy csak egy foszfát csoportot tartalmaz. [75] Érdekes módon kimutatták, hogy a lipid A redukáló terminális foszfáttal (a C1 pozícióban) gyulladáskeltőbb volt, mint a nem redukáló terminális foszfáttal (a C4' pozícióban). [79-81] Néhány tetra-acilált lipid A akár antagonistikus tulajdonságokkal is rendelkezhet. [82-84] Különösen érdekes az olyan nem-toxikus 3-O-deacil-4'-monofoszforil lipid A, amely *Salmonella* eredetű és már jóváhagyott oltóanyag-adjuvánsként klinikai felhasználásra. [85]

A klinikai terápiában természetes eredetű Lipid A-t használnak. Ezek heterogén rendszerek, több különböző arányban jelenlévő lipid A keverékei. Néhány enzim funkcióját biotechnológiailag előállított törzsekkel lehet befolyásolni annak érdekében,

hogy bizonyos lipid A bioszintézis lépéseket végezzenek el. [86, 87] Azonban ez nem biztosít abszolút lipid A-homogenitást, ami kívánatos lenne a terápiás kutatások és fejlesztések szempontjából. Ezekben a keverékekben nem lehetséges pontos szerkezet-hatás kapcsolatokat megállapítani. A molekuláris szintű immunválaszok megértésének fő iránya az olyan analitikai módszerek kidolgozása, amelyek alkalmasak a lipid A minták heterogenitásának felderítésére, ami jelentős kihívást jelent a kutatók számára. A tömegspektrometria és a tandem tömegspektrometria technikák (MS/MS vagy MSⁿ) jelentik a fő szerkezetvizsgálati módszereket, amelyek részletes és átfogó szerkezeti információkat nyújthatnak különböző lipid A-ról. [88, 89]



2. Ábra Escherichia coli típusú lipid A szerkezete [65]

Az utóbbi néhány évtizedben a tömegspektrometria fejlesztése (ionforrások, analizátorok) jelentős előrelépést jelentettek a bakteriális LPS molekulák szerkezetének azonosításában.

A tandem tömegspektrometriás módszerek kulcsfontosságú szerepet játszanak a lipid A komponensek szerkezetének tanulmányozásában. Alapvetően az analizátor típusa határozza meg, hogy melyik tandem tömegspektrometriás technika alkalmazható: az ütközés indukált disszociáció (CID) a leggyakrabban használt a lipid A komponensek fragmentációs analízisében. [90-95]

A térben elválasztott tandem tömegspektrométer esetében a fragmentáció akkor következik be, amikor inert gáz atomok/molekulák (N_2 , He, Ar, Xe, stb.) ütköznek a mintamolekulákkal egy ütközési cellában a két analizátor között (triple kvadrupól (QqQ) vagy kvadrupól repülési idő (QTOF)). A másik típus az időben elválasztott tandem tömegspektrometriás eszközök, mint például a kvadrupól ioncsapda (QIT), lineáris ioncsapda (LIT), ionciklotron rezonancia eszközök (ICR).

A deprotonált lipid A ionok tandem tömegspektrometriás elemzése intenzíven tanulmányozásra került, ami lehetővé tette néhány következtetés levonását a fragmentációs szabályszerűségekről. Ezen tudás és a gyűjtött szabályszerűségek alapján Ting és munkatársai kifejlesztettek egy hierarchikus tandem tömegspektrometriás algoritmust (HiTMS néven), amelyet a spektrumok elemzési folyamatának felgyorsítására terveztek és alkalmazkodik a gyors tandem tömegspektrometriás technikákhoz. [96] A szoftver egy elméleti CID MS^n adatbázison alapul, amelyet manuális értékeléssel nyertek korábbi lipid A mérésekből. Tartalmazza azokat a potenciális elméleti fragmens ionokat, amelyek különféle fragmentációk során képződhetnek (gyűrű-gyűrű és intra-gyűrűs kötések hasadásával), és befolyásolják egy adott baktériumtörzs specifikus lipid A ionjának cukorszerkezetét. Egy minden lehetséges kötéshasadásból származó semleges veszteségi adatbázist hoztak létre (a glikánváz fragmentációjakor lehetséges semleges vesztesékek mellett az acil- és foszfátcsoportok eltávolítását is beleértve). A szoftver összehasonlítja az ismeretlen lipid A ion szerkezetének különféle rendekben megjelenő termékionok specifikus tömegeit az adatbázisokkal, majd becsléseket ad az egyezési fokról, végül ajánlást tesz a szerkezetre.

Morrison és munkatársai kifejlesztettek egy általánosabb, adatbázis-független, lipid A szerkezetazonosító algoritmust, amelyet UVliPiD néven neveztek el, és amely rendszeres spektrális értékelést végez a biszfoszforilált lipid A molekulákon. Ebben az esetben az

UVPD-CID kombinációs technikával nyert MS/MS tömegspektrumok biztosítják az automatizált szerkezetértékelés alapját. [97]

A lipid A minták heterogenitásának feltérképezésére különféle elválasztási technikákat alkalmaztak az LPS-kivonatokból. A keverékeket az acilezés vagy foszforiláció mértéke szerint lehet szétválasztani normál fázisú vékonyréteg-kromatográfiával (TLC). Ezeket a frakciókat vagy destruktív (kén-dioxid dehidratálás) [98] vagy nem-destruktív (radioizotóp) technikákkal lehet vizualizálni, illetve off-line MS vagy HPLC segítségével lehet tovább vizsgálni. [98-100]

Számos tanulmány foglalkozik lipid A minták elemzésével HPLC segítségével. Általában fordított fázisú oszlopokat és gradiens eluálást használnak. A lipid A molekulák, amelyek nem tartalmaznak kromofor csoportot vagy alacsony moláris abszorpcióval rendelkeznek, nem érzékelhetők UV detektorral. Ebben az esetben elkerülhetetlen a derivatizálási folyamat alkalmazása, melynek során UV vagy fluoreszcens detektor kerül felhasználásra. A derivatizálás potenciális kockázata az, hogy a minta összetétele megváltozhat: vagy bizonyos funkciós csoportok elvesztése történik, vagy a különböző természetű összetevők aránya megváltozik. Nem derivatizált lipid A szétválasztása szintén leírásra került már HPLC rendszerrel, amely egy fényszórás detektorral volt felszerelve. [101-103]

Annak érdekében, hogy a lipid A minták (amelyek heterogének és különböző koncentrációban tartalmaznak összetevőket) szerkezetével kapcsolatban a hatások és összefüggések elemezhetőek és megérthetőek legyenek egy megfelelő analitikai technikát kell alkalmazni. A biológiailag fontos molekulák észlelése, amelyek alacsony koncentrációban vannak jelen, csak egy specifikus, nagy érzékenységű detektorral érhető el, amelynek széles dinamikus tartománya van. [104] Talán ez az oka annak, hogy csak néhány tanulmány foglalkozik a lipid A minták elemzésével MS és tandem MS alkalmazásával, amelyeket magas hatásfokú szétválasztási technikákkal párosítanak. A fő kihívás az, hogy megfelelően hatékony szétválasztást érjenek el egy olyan mobilfázis rendszerrel, amely lehetővé teszi a lipid A komponensek oldatba való juttatását és ionizálását.

Egy gradiens eluálású fordított fázisú HPLC-MS módszert fejlesztettek ki szintetikus lipid A adjuvánsok mennyiségi meghatározására és oldódási kinetikájuk tanulmányozására, ahol három komponens alapvonalbeli szétválasztása rövid időtartamban történt. [105] Ez a módszer azonban nem alkalmazható a heterogénebb mintákra az alacsony csúcskapacitás miatt. Később egy fordított fázisú UV-fotodisszociációs HPLC-MS/MS módszert mutattak be a komplex lipid A izolátumok szétválasztására egy genetikailag módosított *E. coli* törzsből. Ebben az esetben, a 30 perces gradiens eluálást követően a szerkezetazonosítás lehetséges volt olyan lipid A molekulák esetén is, amelyek különböző mértékben voltak acilezettek és foszforiláltak. [106]

Az egyes lipid A komponensek szerkezetének elemzésére a közvetlen MS/MS alkalmazása lágy ionizációs módszerekkel (például ESI vagy MALDI) vált elsődleges analitikai technikává, magas szelektivitást és érzékenységet biztosítva. [88] A leggyakrabban kloroform (vagy diklór-metán [DCM]) és metanol tartalmú oldószereket használnak az amfilipid A molekulák feloldására. Azonban az egyszerre jelen levő kis molekuláris változások és szerkezeti izomerek megértéséhez a közvetlen MS/MS kevésbé alkalmas az elkerülhetetlen ionszupressziós hatás és a szerkezeti izomerek MS jeleinek átfedése miatt. A poláris, töltött minták szétválasztásához a CE remek alternatíva az LC-hez képest. Intakt lipid A-t alig vizsgálták CE-hez kapcsolt MS-sel. Az irodalomban csak egy tanulmány foglalkozik a CE-MS alkalmazásával a szabad lipid A molekulafajok analízisére és szétválasztására. [107]

3. Vizes és nemvizes közegben történő elválasztás

A nemvizes háttélektrolitok alkalmazásával egy új technika valósul meg, mely Nemvizes Kapilláris Elektroforézis (NACE) néven terjedt el. Ez a módszer általában akkor kerül alkalmazásra, ha a minta gyengén vagy egyáltalán nem oldódik közönséges pufferben és felületaktív anyagokat tartalmazó oldatban. Ezzel a CE alkalmazhatósága kibővül, mivel számos fontos szempont megváltozik a vizes közeg használatához képest. A tiszta organikus oldószerek vagy azok elegyeinek alkalmazásával a szelektivitás általában más, mint a vizes CE esetében, de ezt a szelektivitást nem lehet előre megjósolni. A szétválasztási mechanizmus ebben az esetben olyan kölcsönhatásokon

alapul, amelyek nem tudnak létrejönni, vagy gyengék a vizes háttélelektrolitokban (elektrosztatikus és donor-akceptor kölcsönhatások). Mivel a nemvizes háttélelektrolit vezetőképessége gyakran alacsony, lehetővé teszi a magas elektromos térerősség, magas szétválasztási sebességek (összehasonlítva a kromatográfiás módszerrel, 10-szeres sebességű elemzést jelentettek az emberi vér mintáinál [108]), valamint a nagyobb átmérőjű kapillárisok (belső átmérő akár 530 μm -ig [109]) használatát. A NACE-nek további előnye az alacsony adszorpció, a magas szelektivitás, óriási a fölénye a víztől instabil vagy oldhatatlan anyagok, például foszfolipidek, polimerek, zsírsavak, festékanyagok, organomerkúrium-vegyületek, hidrofób polipeptidek, szerves foszforvegyületek, szteroidok, nukleinsavfestékek, tropán alkaloidok és hidrofób gyógyszerek analízisében, valamint a királis vegyületek elválasztásában. Ez a technika alkalmas az anionos és kationos felületaktív anyagok szétválasztására is. Az organikus oldószerek alacsony felületi feszültsége és gyakran magasabb illékonyága lehetővé teszi a NACE és a tömegspektrometria online kapcsolatát. [110, 111]

A leggyakrabban használt szerves oldószerek a NACE-ben a MeOH, ACN és ezek elegyei. Előnyük, hogy alacsony a fénytörésük, ami fontos a leggyakoribb detektálási elv, az UV-abszorbancia esetén. [112] Mivel ezeknek az oldószereknek viszonylag alacsony a forráspontja, a gázbuborékok képződését és az elpárolgást alacsony alkalmazott áramerősséggel kell szabályozni. A gázbuborékok képződése megszüntethető a teljes rendszer néhány atmoszférára való nyomás alá helyezésével, de figyelembe kell venni, hogy a túl alacsony áramerősség kisülésekhez és szikrázáshoz vezethet, ami tűzveszélyt jelenthet. [3] Egyéb gyakran használt oldószerek az etanol, 1-propanol, 2-propanol, ecetsav, formamid, N-metilformamid, N,N-dimetilformamid és dimetil-szulfoxid. [111] Ahogy korábban említésre került, ezeknek az oldószereknek a fizikai-kémiai tulajdonságai (például a dielektromos állandó, viszkozitás és a proton felvétel vagy leadási képesség) különböznek a vizes oldatokétól. A minták pK_a értékei jelentősen változhatnak az organikus oldószerek cseréje esetén, ami megváltoztatja a minták mobilitását. Emellett az elválasztási szelektivitás is javulhat az ionpár vagy konjugáció alapján az organikus oldószerek elektrolitösszetételének megváltoztatásával. [111] Az elektroforetikus migrációt egy oldószere vagy oldószerelegy többféle módon is befolyásolhatja. A migráció megváltozhat az oldott minták méretének változása miatt.

Ezenkívül az oldószerek dielektromos állandói és sav-bázis tulajdonságai befolyásolják az oldott anyagok protonálódási egyensúlyát (pK_a értékek), valamint a minták háttérekrolit adalékokkal való kölcsönhatását is.

Gyakorlatban a NACE alkalmazásainál fontos megérteni, hogy az egyensúlyban lévő minták minden formája elegendően oldható-e az organikus oldószerben, különben a különböző formák elérhetik az oldhatósági határokat, és kicsapódhatnak. Az oldhatósági határok közelítése különböző hatásokhoz vezethet, például túllépheti a telített oldatok kialakulását; kicsapódást eredményezhet, amelyet a mozgó ionos forma tőlük való térbeli elválasztása követ; vagy elkerülhetetlenül a különböző formák irreverzibilis adszorpciójához vezethet a kapilláris falán. Mégis, a szerves oldószerek használatának következtében a NACE alkalmazásakor gyakrabban találkozhatunk oldhatósági problémákkal a háttérekrolit komponensei között. [112]

A legfőbb detektálási módszerek, mint az UV-látható abszorbancia (UV), a fluoreszcencia (FL), az elektropray ionizáció-tömegspektrometria (ESI-MS), az elektrokémiai detektálás (EC), az elektrokemilumineszcencia/EC (ECL/EC) kettős detektálás, és a kemilumineszcencia (CL), sikeresen kapcsolhatóak voltak a NACE-hez. A különböző detektálási módszerek kiválaszthatók az organikus oldószerek tulajdonságai szerint. [3]

Az UV a leggyakrabban használt detektálási módszer a NACE-ben. A magas elválasztási feszültség hatása az elektroforézis áramára kicsi, lehetővé téve a széles átmérőjű kapilláris használatát (akár 530 μm), ami növeli az optikai út hosszát és javítja a detektálás érzékenységét, de rossz felbontást eredményez a szívóhatás miatt. Ez elkerülhető a CE elektrolitot tartalmazó üvegek folyadékszintjének pontos kiegyenlítésével. [3]

A NACE-ESI-MS-t először Tomlinson alkalmazta mifentidin és metabolizmusa analízisére. [113] Később Yang és munkatársai ezt a módszert használták lipofil polipeptidok elemzésére. [114] Nemrégiben Scriba áttekintette a NACE-MS előrelépéseit a gyógyszerészeti, környezeti és királis analízisek területén. [110] Gutiérrez pedig a fenolok elemzését mutatta be olívaolajban, vizes CZE-ESI-MS és a NACE-ESI-MS módszert használva. [115, 3]

Annak ellenére, hogy a NACE és különösen a NACE-MS előnyeit részletesen leírták, csak 1994-ben jelentek meg az első publikációk, és azóta sem széles körben alkalmazzák. [113, 116] Ennek fő oka az, hogy a minták disszociációja és migrációja az organikus oldószerekben nem olyan jól ismert, mint a vizes elektrolitokban. A váltás a NACE-re nem triviális dolog, mivel minden fontos paramétert érint. Először ellenőrizni kell az oldószer kompatibilitását az eszközzel, mert agresszívek lehetnek, és feloldhatják a műanyag alkatrészeket. Az oldószer pK_a értékei jelentősen eltérnek a vizes oldatoktól, így a háttérelktrolit pH-ja is változni fog. Az oldószerek jelentős mértékben eltérnek az autoprotolízis állandóiban. Ez egy teljesen más pH skálát eredményez, mint amit vízben kapunk.

Több tanulmány foglalkozott különböző oldószerek és a víz összehasonlításával CE-MS-ben. Hét β -blokkoló analízise során formamidot és n-metil-formamidot hasonlítottak össze metanollal, acetonitrillel és vízzel [117], minden oldószerhez 25 mM ammónium-formiátot és 1 M hangyasavat adtak, kivéve a vizet, ahol 1 M hangyasavat használtak. Az összes oldószer különböző elválasztási szelektivitást mutatott. A legnagyobb hatékonyságot az N-metilformamidban mérték elméleti tényezőszám tekintetében, míg a leggyorsabb analízist az acetonitrilben érték el. A MS detektálás használatával az acetonitril és metanol adta a legintenzívebb MS jeleket (kb. 10-szer nagyobb jel/zaj arány).

Vizsgálatra került a formamid, a N-metilformamid, a dimetilszulfoxid, a metanol és az acetonitril hatása a vízzel összevetve a CE-MS elválasztási és detektálási teljesítmény tekintetében, 2-aminobenzimidazol, prokain, propranolol és kinin model vegyületek felhasználásával. [118] Akár 300-szoros érzékenységgjavulást is tapasztaltak a tesztvegyületek detektálásában acetonitrilben és metanolban a magasabb forráspontú oldószerekhez képest.

Bár a peptideket általában vizes háttérelktrolitokkal vizsgálják, mivel vízben oldhatóak [119, 120], a NACE hatékonyan alkalmazható a lipofil peptidek meghatározására is. Az első alkalommal a NACE-MS-t 1999-ben használták a peptidek elemzésére, amikor a hidrofób ciklikus peptid antibiotikumokat, a gramicidin S-t és a bacitracint vizsgálták 20

mM ammónium-acetátos metanol/acetonitril (25:72) oldószerben, mely 0,5% hangyasavat tartalmazott. [114]

Unger és munkatársai összehasonlították a HPLC-t és a NACE-t az afrikai *Ancistrocladus* fajokból származó naftilizokinolin-alkaloidok elemzésére, poliakrilamid-bevonatú kapilláris használatával. [121] Különböző elválasztási szelektivitásokat és migrációs sorrendeket figyeltek meg a két módszer esetében. Csak a NACE volt képes azoknak a szerkezeti izomereknek a szétválasztására, melyek analízisére a HPLC nem volt megfelelő. A CE-MS/MS használatával öt alkaloidot azonosítottak gyökérgégek metanolos extraktumából.

A víz és a nemvizes CE-t is összehasonlították a β -karbolin-alkaloidok elemzésére a *Psychotria viridis* leveleiben [122], ahol újra más migrációs sorrendet és elválasztási szelektivitást figyeltek meg a NACE-MS és a vizes háttéreléktrolit használata esetén. Itt azonban a vizes pufferrel jobb elválasztási hatékonyságot értek el.

Már az 1990-es évek végén a különböző foszfolipid osztályok képviselőit elválasztották acetonitril/2-propanol/hexán alapú háttéreléktrolit segítségével. [123] Ebben a tanulmányban a NACE-t alternatívaként értékelték a foszfolipidek analízisére a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiával szemben, mivel az utóbbi módszer nem mindig alkalmas a MS detektálásra a detergens magas koncentrációja miatt.

Mivel a lipid A vegyületek rosszul oldódnak vízben, a NACE ígéretes alternatív technikát jelent a lipid A elemzéséhez CE segítségével. Az apoláris oldószerek, mint például a metanol és a klóroform/diklór-metán elegye, megfelelően oldják a lipid A molekulákat, és lehetővé teszik az ESI ionforrás alkalmazását. Az szerves oldószerekben való jobb oldhatóság különösen fontos azoknak az alkalmazásoknak, amelyek bonyolult lipid A keverékek elemzésével foglalkoznak, melyek gyakran egy közel összefüggő lipofil molekulahalmazt mutatnak.

IV. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során olyan robusztus és megbízható módszerek kidolgozására helyeztük a hangsúlyt, melyek lehetővé teszik a kapilláris elektroforézis és tömegspektrometria kapcsolását mind vizes, mind nemvizes közegben. A kidolgozott vizes és nemvizes módszereket ezután biológiai szempontból fontos minták elemzésére alkalmaztuk.

Főbb céljaink:

- CZE-ESI/QTOF-MS módszer optimalizálásának segítségével szerves savak mennyiségi meghatározása vörösborokban.
- Szekvenciális injektálási protokoll fejlesztése a fehérje minták hatékony kapillárisba való bejuttatására a tömegspektrometriás elemzés érdekében, mellyel az amfolitok zavaró hatása kikerülhető.
- Nemvizes közegben CE-MS módszer alkalmazásával (az oldódási korlátok kiküszöbölésével) a lipid A izomerek szétválasztása és jellemzése foszforilációs és acilációs mintázataik alapján.
- A megfelelő CE polarítások és MS detektálási körülmények kiválasztása, ideértve a szívóhatás és külső nyomás alkalmazását is, annak érdekében, hogy a lipid A molekulák negatív és pozitív ionizációs módokban fragmentációs mintázatokon keresztül kerüljenek azonosításra.
- A lipid A foszforilációs és acilációs izomereinek szétválasztása és jellemzése CE-MS és CE-MS/MS módszerrel.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Reagensek

A macedón Vranec bor analíziséhez használt reagensek - tejsav, szukcininsav, almasav, borkősav, shikiminsav és citromsav standardok, polibrén (hexadimetrin-bromid, PB), ecetsav, hangyasav, ammónium-hidroxid és nátrium-hidroxid - a Sigma-Aldrich-től (Steinheim, Németország) származtak. Ultratiszta desztillált víz (LC-MS Chromasolv®) a Fluka-tól (Buchs, Svájc) származott.

A fehérje elválasztásokhoz víz, metanol (LC-MS CHROMASOLV® minőség), hangyasav (eluens komponens LC-MS-ben) és ammónium-hidroxid oldat (28,0–30,0%), lizozim (14,3 kDa) tojásfehérjéből (≥90%), citokróm c (12,4 Da) lószívából (≥95%), miogloblin (17,0 kDa) lószívából (≥90%), és β-laktoglobulin A (18,4 kDa) tejből (szarvasmarha) származó a Sigma-Aldrich-től (Steinheim, Németország, és Saint Louis, MO, USA) kerültek beszerzésre. A foszforsav (85 m/m %), a nátrium-hidroxid és a sósav a Spektrum 3D-től (Debrecen, Magyarország) származott.

A lipid A analízis során metanol (MeOH) (LC-MS Chromasolv®), diklór-metán (DCM) (Chromasolv Plus, HPLC-hez, ≥99,9%), trietil-amin (TEA) és ecetsav (AcOH) (eluens adalékanyagok LC-MS-hez), nátrium-hidroxid (NaOH) és acetonitril (ACN) a Sigma-Aldrich-től (Steinheim, Németország) kerültek beszerzésre.

2. Minta előkészítési protokollok

i. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata

A tejsav, szukcininsav, almasav, borkősav, shikiminsav és citromsav standardok LC-MS minőségű desztillált vízben kerültek feloldásra, majd 4°C-on tárolásra. A kalibráláshoz használt standard oldatokat megfelelő pufferoldattal (ammónium-acetát) történő hígítással állítottuk elő a törzsoldatokból használat előtt.

Ecetsav (100 mM) vagy hangyasav (100 mM) 100 mM ammónium-hidroxiddal került titrálásra a kívánt pH-ra annak érdekében, hogy ammónium-acetát vagy ammónium-formiát oldatot kapjunk háttélelektrolitként (BGE) (10 – 75 mM koncentrációban). Az

optimális mérési eredményeket az 50 mM ammónium-acetát (pH=6) használatakor nyertük.

A *Vitis vinifera* L., cv. Vranec V1 fajtából származó szőlőt szőlőkertben termesztették. A szőlőt manuálisan szüretelték (20 kg) optimális technológiai érettségben (18-24°Brix) 2014 szeptemberében/októberében, majd a BOVIN Pincészet, Negotino, Észak-Macedónia pincéjébe szállították. A szőlőt mechanikus inox daráló segítségével préselték és ként (50 mg/L) adtak hozzá az erjesztés előtt 22-24°C-on. A kén-dioxidot 5%-os kénsav formájában adták hozzá. A SO₂ hozzáadása után kereskedelmi pektolitikus enzimek készítményt (Endozym Rouge, AEB, Olaszország) alkalmaztak a színezőanyagok, bőrtanninok és aromák magasabb koncentrációjának eléréséhez (1 g/hL). Két-három óra múlva a bort *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel (Fermol Medterranee, AEB, Olaszország) oltották be. Az élesztőt mustban való újr hidratálást követően (20 g/hL) táplálékkiegészítőkkel (10 g/hL) látták el (Fermol Plus starter, beszerzés AEB, Olaszország, amely 59,8% diammónium-foszfátot, 39,52% cellulózt és 0,6% tiamin-hidrokloridot tartalmaz). A szőlőpépet 7 napig áztatták, és ezen időszak alatt a fűtőket napi két alkalommal mechanikusan lepréselték, amíg az teljesen alámerült. Az áztatási időszak után a bort a szőlőmaradéktól mechanikusan elkülönítették, majd szobahőmérsékleten 10 literes tartályokban tárolták. Tíz nap konzerválás után a bort ismét kezelés alá vették kénsavval (30 mg/L). A második átmosásra két hónap tárolás után került sor, amikor a bort palackozták és körülbelül 8 hónapig egy pincében 8-10°C-on tárolták. Az elemzés ezután következett.

Az összes bormintát desztillált vízzel hígítottuk (arány: 1:5), 0,22 µm-es membránszűrővel (PVDF fecskendőszűrő, Nantong FilterBio Membrane Col, Ltd, Kína) átszűrtük, majd injektáltuk a kapilláris elektroforézis készülékbe. Háttélektrolitként ammónium-acetát pufferoldatot használtunk az MS-sel való kompatibilitás biztosítása érdekében. A kapilláris belső falát polibrénnel vontuk be az EOF és az organikus savak adszorpciójának kivédése miatt.

ii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata

A fehérjék törzs oldatai (6 mg/ml) vízben kerültek feloldásra és 4°C-on tárolásra. A keskeny vagy széles pH-tartományokat lefedő Ampholine pH 4–6, pH 7–9 vagy pH 3,5–

10 oldatok (LKB, Bromma, Svédország) különböző koncentrációkban kerültek felhasználásra.

Anolitiként és katolitiként 50 mM hangyasav (pH 2,3) oldatot és 100 mM ammónium-hidroxid (pH 11,0) oldatot készítettünk, illetve az anolit és katolit oldatokat egymással titráltuk, amikor az elektrolitok más pH-értékeket igényeltek.

A mintákat és az oldatokat 30 percig ultrahangos fürdőben gáztalanítottuk, majd felhasználás előtt 0,45 µm-es membránszűrőn átszűrtük.

iii. Lipid A NACE-ESI-QTOF MS/MS vizsgálata

A *Shigella sonnei* II. fázisú törzse 37°C-on került tenyésztésre laboratóriumi fermentorban Mueller-Hinton tápoldatban, pH 7,2-n, amíg el nem érte a késői logaritmusos fázist (kb. 10 óra), majd centrifugálással került összegyűjtésre. A baktérium LPS-ek, az acetonnal szárított organizmusokból hagyományos forró fenol/víz eljárással [124] lettek kinyerve, a baktériumsejt száraz tömegének 5%-os hozamában, végül a minták liofilizálásra kerültek.

A lipid A enyhe savas hidrolízissel került felszabadításra az LPS-ből 1% (v/v) AcOH (pH 3,9) oldatban 100°C-on 1 órán át; ezután az oldat centrifugálásra került (8000 × g, 4°C, 20 percig). A lipid A-t tartalmazó pellet négy alkalommal lett desztillált vízzel átmosva, majd liofilizálva. Kb. 0,1 mg lipid A került feloldásra 200 µL MeOH:DCM:TEA:AcOH (80:20:0,36:0,12, v/v/v/v) elegyben, majd 5 percig centrifugálásra 21 000 × g-n.

3. Mérési körülmények

i. Alkalmazott műszerek és szoftverek

Munkánk során Agilent 7100 kapilláris elektroforézis készülékkel és Agilent 6530 Q-TOF LC-MS rendszerrel dolgoztunk. A két készülék összekapcsolása egy Agilent Jet Stream ESI interfészen keresztül történt. A CE készülék irányításához és az adatfeldolgozáshoz a ChemStation B. 04.03. és 7.01 verziót használtuk. A tömegspektrométert az Agilent MassHunter B.04.00 szoftver irányította.

ii. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata

Kapilláris elektroforézis

A kapilláris, 80 vagy 120 cm hosszú (belső átmérő: 50 μm , Polymicro Technologies, Phoenix, USA) és polibrénnel volt dinamukusan fedve. Az új kapillárisok az alábbiak szerint lettek kondicionálva: acetonos öblítés (2 perc), víz (2 perc), 1 M NaOH (20 perc), víz (5 perc), dinamikus fedés (1% polibrén oldat, 15 perc) és háttélektrolit (5 perc). A futások között rövid előkondicionálás történt, 1% PB oldattal (2 perc), vízzel (2 perc) és háttélektrolit oldattal (4 perc). A kapilláris tisztítása desztillált vízzel (5 perc) történt a futtatások után. A minták hidrodinamikusan lettek injektálva 50 mbar nyomáson 2 másodpercig. A kapilláris injektálási végén a negatív pólus volt (katód oldal). A megfigyelt áram erőssége kb. 15 μA volt -20 kV feszültség alkalmazásakor (80 cm hosszú kapilláris esetén). A kapilláris a mérések során 25°C-on volt termosztálva.

Tömegspektrometriás detektálás

A köpenyfolyadék (1 v/v % hangyasav oldat) 0,7 $\mu\text{L}/\text{perc}$ áramlással került szállításra egy LC izokratikus pumpával (1260 Infinity sorozat, Agilent Technologies, Waldbronn, Németország). Az ESI/QTOF-MS negatív ionizációs módban működött, 4,5 kV porlasztófeszültséget alkalmazva. Száritó gáz jellemzői: nitrogén 325°C, 8 L/perc áramlási sebesség. A porlasztó gáz nyomása 35 psi volt. A köpenygáz hőmérséklete 350°C volt, 11 L/perc áramlással. A TOF-MS paraméterei a következők voltak: fragmentátor, 100 V, és szkimmer, 65 V. A repülési idő analizátor által szkennelt tömeg/töltés (m/z) tartomány 50–250 m/z volt, maximális adatfelvételi idővel 1000 ms/spektrum. A deprotonált $[M-H]^-$ ionok (m/z 89,0244 tejsav, m/z 117,0193 borostyánkősav, m/z 133,0142 almasav, m/z 149,0092 borkősav, m/z 173,0455 shikiminsav és m/z 191,0197 citromsav) kiszámított m/z értékei a teljes ion elektroferogramokból (TIE) vagy a báziscsúcs elektroferogramokból kerültek extrahálásra. [125, 126] A hat szerves savból (tejsav, borostyánkősav, almasav, borkősav, shikiminsav és a citromsav) egyenként öt különböző koncentrációjú standard oldatot készítettünk a kereskedelemben megvásárolható standardok felhasználásával. Ezek alapján felvettük az adott komponensekhez tartozó kalibrációs görbéket: az extrahált ion csúcsok területeit ábrázoltuk a koncentráció függvényében, majd a kapott

pontokra egyenest illesztettünk. Az egyenesek alapján meghatározhatóak voltak a Macedón Vranec bormintában lévő szerves savak koncentrációi.

iii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata

Alkalmazott detector paraméterek

Az elektroferogramok 200 nm és 280 nm hullámhosszon kerültek felvételre.

Alkalmazott Kapillárisok

A poliakrilamid (PAA) bevonatú kapillárisok szilika kapillárisokból (50 µm belső átmérő) készültek, amelyek a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) szereztünk be. A PAA bevonatú kapillárisok fedési eljárása korábban már bemutatásra került. [127]

A PAA fedett kapillárisok 10 mM foszforsavval kerültek feltöltésre és tárolásra a felhasználásig. Az UV detektáláshoz, a detektáló ablak (kb. 3 mm széles) egy szike segítségével készült el a kapillárisok külső poliimid bevonatának eltávolításával. A CIEF – MS kísérletekhez a poliimid bevonatot (kb. 1 cm hosszan) eltávolítottuk a kapilláris végeiről.

IEF körülmények

A kapillárisok teljes hossza 70 és 70,6 cm között változott. Az UV detektálás a kapilláris anód felőli végétől 61,5 cm-re történt. A minta injektálása előtt a kapillárisokat 7 percig katolit oldattal mostuk. Minden IEF kísérlet után azonnal 10 percig foszforsavas öblítés történt. Az amfolitok és a mintaoldat két vagy három egymást követő lépésben került injektálásra, 50 mbar nyomást alkalmazva (a kapilláris anód felőli végén). Az amfolit zónák típusa, koncentrációja és hossza változott. A tipikus „40/6/40” injektálás során „40/6/40” másodpercig injektáltuk egymás után injektálva az amfolitot, a mintoldatot és újra az amfolitot. Ezzel az injektálási elrendezéssel a 70,6 cm hosszú kapilláris kb. 7%-a volt feltöltve amfolit/minta/amfolit zónákkal. Történtek kísérletek egyetlen amfolit zóna alkalmazásával is (vagy a mintazóna előtt vagy pedig után), amelyek amfolit/minta vagy minta/amfolit injektálási zónákkal záródtak. Ezek a „fél-szendvics” zónák az időértékekkel (másodpercekben) jelölésre kerültek, pl. „40/6/0” vagy „0/6/40” (a nulla azt jelenti, hogy nincs amfolit injektálás a minta után vagy előtt).

Az IEF feszültségkülönbség alkalmazásával indult el (az elektromos térerő 200 és 300 V/cm között változott). A koncentrált zónák mobilizálása vagy 50 mbar nyomással történt az anód felől 10 perc fókuszálás után, a feszültség alkalmazása mellett, vagy egyszerűen az MS ESI interfész szívó hatásának használatával. A mérés folyamán a feszültségkülönbséget állandó értéken tartottuk. Az amfolitok és a minta komponenseinek migrációját UV detektálással lehetett követni 200 nm-en, míg a fehérjék fényelnyelése 280 nm-en került detektálásra. A kapilláris-tartó hőmérséklete 20°C-on volt tartva. Minden kísérlet legalább háromszor került megismétlésre.

Tömegspektrometriás detektálás

A Q-TOF MS műszer Agilent Jet Stream ESI ionforrással működött pozitív ionizációs módban, <10 ppm tömegpontossággal, 10000-20000 tömegfelbontással (121–2722 m/z), 10000/s mérési frekvenciával és 2 GHz detektálási frekvenciával. Az ESI ionforrás az alábbi feltételek mellett működött: a porlasztó gáz (N₂) nyomása 20 psi, a szárító gáz (N₂) hőmérséklete és áramlási sebessége 300°C és 7 L/perc, a köpenygáz (N₂) hőmérséklete és áramlási sebessége pedig 300°C és 11 L/perc volt. Az ESI kapilláris feszültsége 4000 V volt, a fragmentor és a szkimmer potenciálja 200 V, illetve 65 V-ra volt állítva. A köpenyolyadék (4:1 metanol/víz, 1% v/v hangyasav tartalommal) 10 µL/perc áramlási sebességgel működött. A tömegkalibráláshoz felhasznált referencia ionok a purin (121.050873 [M+H]⁺) és a hexakis-(1H,1H,9H-perfluorononiloxi)foszfazén (2721.8948 [M+H]⁺) voltak. A fajlagos tömeg tartomány 600–3000 m/z között volt 1 spektrum/s mérési frekvenciával.

Az extrahált ion (EI) elektroferogramokat a következők szerint készítettük: kiválasztásra került egy meghatározott tömeg (m/z ±20 ppm) a Q-TOF MS műszer tömegspektrumából. A következő többszörösen töltött pozitív ionok lettek figyelembe véve a megadott m/z értékekkel (m/z±0.5 Da) lizozim esetében: 1431.2 (10+), 1590.0 (9+), 1790.1 (8+), 2044.4 (7+); citokróm c esetében: 825.5 (15+), 884.4 (14+), 952.1 (13+), 1546.2 (8+), 1767.1 (7+); miogloblin esetében: 848.9 (20+), 893.4 (19+), 943.2 (18+), 998.4 (17+), 1060.9 (16+), 1212.3 (14+); béta-laktoglobulin A esetében: 1148.5 (16+), 1225.3 (15+), 1312.4 (14+), 1413.6 (13+), 1531.1 (12+), 1837.3 (10+). A fehérjék

molekulatömegei a többszörösen töltött ion sorozatból a MS szoftver dekonvolúciós funkciójával lettek meghatározva.

iv. Lipid A NACE-ESI-QTOF MS/MS vizsgálata

A nemvizes háttélelektrolit oldatot MeOH, DCM és ACN különböző arányú elegyei adták, TEA-val és AcOH-val mint ionos adalékokkal kiegészítve változó koncentrációban. Az optimális háttélelektrolit oldat összetétele MeOH:DCM:TEA:AcOH (40:60:1,08:0,36, v/v/v/v) volt. Az elválasztásokhoz kezeletlen kvarc kapillárisok (50 µm belső átmérő, 375 µm külső átmérő; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) kerültek felhasználásra, melyek hossza 55 cm volt. Egyidejű UV-DAD detektálás nem történt. A minták 50 mbar nyomással 7 másodpercig kerültek injektálásra, ezt követte a háttélelektrolit 50 mbar nyomással 5 másodpercig. A nemvizes elektrolit oldat párolgásproblémái miatt a kapilláris 20°C-on került termosztálásra. Az alkalmazott feszültségkülönbség +30 kV volt a normál CE polaritási módban (anód az inlet oldalon) és -30 kV a fordított CE polaritási módban (katód az inlet oldalon). Az elválasztási feszültségkülönbség 0-tól +30 kV vagy -30 kV-ra 0,2 perc alatt növekedett. Használat előtt a kapillárist MeOH-tal 5 percig, majd 1 M NaOH-tal 10 percig, ezután vízzel 10 percig, végül háttélelektrolittal 10 percig mostuk. A futások között a kapillárist 3 percig a futató oldattal mostuk. A kapilláris végét a triaxiális elektropray interfészbe illesztettük be. Az eredeti Agilent rozsdamentes acél ESI tű lecserélésre került az Agilent G7100-60041 platina tűre. A stabil elektropray fenntartása érdekében a kapilláris hegye 0,3 mm-rel kipozionálásra került a platina tű végétől, és a poliimid bevonatot kb. 0,5 cm-es részen eltávolítottuk. A koaxiális köpenyolyadék 0,06% (v/v) TEA-t és 0,02% (v/v) AcOH-t tartalmazott MeOH-ban 5 µL/perc áramlási sebességgel, amit egy izokratikus pumpa (Agilent Technologies) adagolt a szplitteren keresztül 1:100 arányban. Az elektropray feszültség mind a negatív, mind a pozitív ionmódokban 3,0 kV-ra volt állítva. A nitrogén szárító gáz áramlási sebessége 5,0 L/perc volt 200°C-on, 15 psi nyomással, kivéve a mintabevitel alatt, amikor a nitrogén gáznyomását 1 psi-re csökkentettük. Az Agilent Jet Stream köpenygáz áramlási sebessége és hőmérséklete 2 L/perc és 90°C volt. A minták 500–2100 m/z fajlagos tömeg tartományban 4 spektrum/s mérési frekvenciával kerültek gyűjtésre. Az adathalmazok az *E. coli* típusú lipid A bisz-, mono- és nemfoszforilált komponenseinek különböző fokú acilációs m/z értékeivel kerültek összevetésre. Az

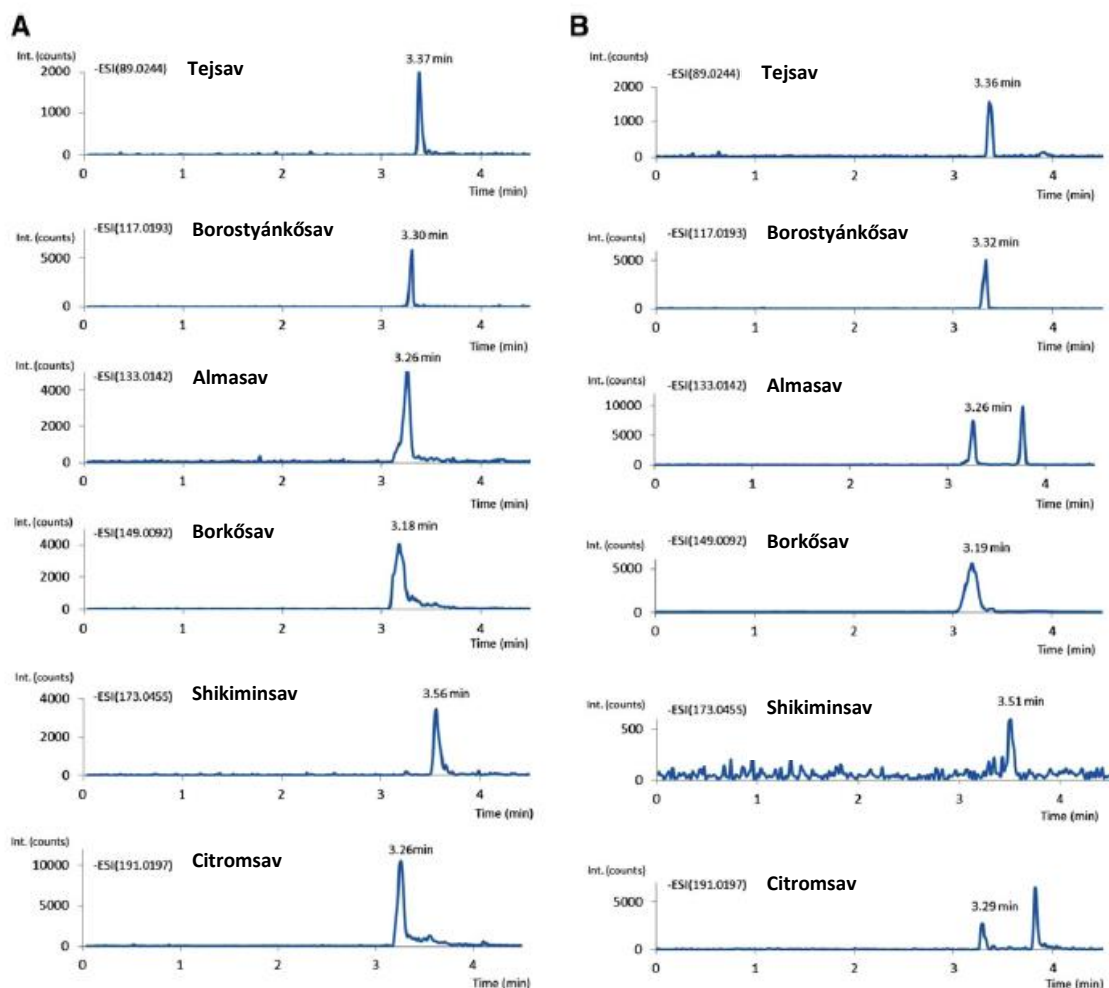
ioncsúcsok CID MS/MS kísérletekkel prekursor m/z -függő lineáris ütközési energia gradiens alkalmazásával kerültek azonosításra mind pozitív-, mind negatív-ion módokban. A lineáris energia gradiens meredeksége 0,026 volt a pozitív- és 0,044 a negatív-ion mód esetében, az MS/MS spektrumok automatikus MS/MS módban kerültek rögzítésre 50–2100 m/z fajlagos tömeg tartományban, 2 spektrum/s mérési frekvenciával.

VI. EREDMÉNYEK

1. A vizes közegben történt módszerfejlesztések eredményei

i. Macedón Vranec borminta CZE-ESI-QTOF-MS vizsgálata

Egy gyors elválasztási módszer került kifejlesztésre CZE-ESI/QTOF-MS alkalmazásával, mellyel sikerült a különböző szerves savak koncentrációit meghatározni egy macedón vörösbor mintából. A borban elválasztott szerves savak: a tejsav, a borostyánkősav, az almasav, a borkősav, a shikiminsav és a citromsav. A **3. A ábra** ábrázolja a szerves savak standardjainak az extrahált ion elektroferogramjait, míg a **3. B ábra** a Vranec bor mintához (V1) tartozó extrahált ion elektroferogramokat mutatja be.



3. Ábra. Extrahált ion elektroferogramok a) a szerves savak standardjairól (egyenként 100 mg/l), és b) a Vranec borban (V1) lévő szerves savakról. Kísérleti körülmények: kapilláris: hossza 80 cm; 50 μm belső átmérő; Háttérelektrolit 50 mM ammónium-acetát puffer pH 6,0; dinamikus bevonat polibrénnel; alkalmazott

feszültségkülönbség -20 kV; áram: $15 \mu\text{A}$; hidrodinamikus injektálás 50 mbar 8 másodpercig. Tömegspektrometriás detektálás: ESI köpenyolyadék összetétel 1% hangyasav, áramlási sebesség $0,7$ l/perc; köpenygáz hőmérséklet 350°C ; áramlási sebesség 11 l/perc; porlasztási feszültség $4,5$ kV; a szárítógáz hőmérséklete 325°C ; a porlasztó nyomása 35 psi; akkumulációs idő 1000 ms/spektrum. [164]

A kísérletek során két illékony puffer, az ammónium-acetát és az ammónium-formiát került kipróbálásra az MS detektálás optimalizálása érdekében. Egyik háttélektrolittal sem sikerült az egyes vegyületek alapvonalbeli elválasztása, azonban ez nem volt szükséges, mivel megfelelő extrahált ion elektroferogramok keletkeztek, és a részleges elválasztás még mindig biztosított előnyöket. Az ammónium-acetát kiváló extrahált ion csúcsokat eredményezett, így kiválasztásra került háttélektrolitként. Az ammónium-acetát koncentrációjának növelése 10 -ről 75 mM-ig a csúcsok szélesedését, míg alacsonyabb háttélektrolit koncentrációk hosszabb migrációs időket eredményeztek. Optimális körülményként az 50 mM ammónium-acetát puffer ($\text{pH}=6,0$) lett kiválasztva a szerves savak elválasztására.

Sem 80 cm-es, sem 120 cm-es kapilláris használatával nem sikerült az egyes vegyületek alapvonalbeli elválasztása. Kiemelendő, hogy a borkósav, almasav és borostyánkósav egymáshoz közel vándorolt, ezt követte a tejsav, shikiminsav és citromsav. A további kísérleteinkhez a rövidebb mérési idő miatt a 80 cm-es kapillárist választottuk.

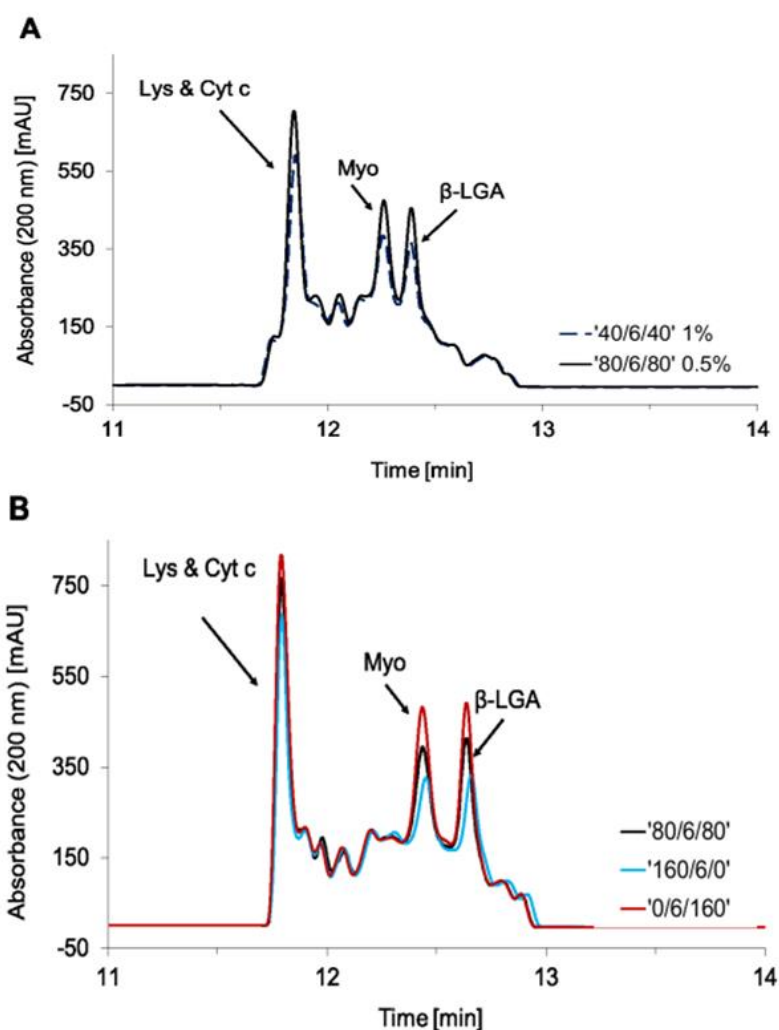
Az elválasztás és a csúcsalak fenntartása érdekében a 20 kV-nál magasabb potenciálkülönbség nem került alkalmazásra, mivel a feszültség növelése rosszabb felbontást és csúcsszélesedést eredményezett. A kísérletek során 1% v/v hangyasav került alkalmazásra köpenyolyadékként, ami megfelelően elősegítette a szerves savak ionizációját.

ii. Fehérje minták CIEF-szekvenciális injektálás-ESI-QTOF-MS vizsgálata

A módszerfejlesztés során egy négy fehérjét tartalmazó keverék került mintaként alkalmazásra (lizozim, pI : $11,35$; citokróm c, pI : $10,25$; miogloblin, pI : $6,8$; β -laktoglobulin A, pI : $5,3$). Szekvenciális injektálási protokoll segítségével mind az amfolit, mind a mintakeverék bejuttatásra került egy 70 cm hosszú, PAA-bevonatú kapillárisba CIEF-ESI/QTOF-MS analízis során. A CIEF mérések során UV- és MS-detektálás is történt. Egy

10 perces fókuszálási lépés után a minta mobilizációja 50 mbar nyomás alkalmazásával történt az UV- illetve MS detektorhoz, az alkalmazott feszültség fenntartása mellett. Összehasonlítottuk az 1%-os Ampholine pH 3,5–10 amfolit oldatot és „40/6/40” injektálás protokollt, egy fele akkora (0,5% v/v) amfolit koncentráció, de hosszabb „80/6/80” injektálási protokoll alkalmazásával. A **4. A ábra** mutatja az átfedő izoelektroferogramokat, amelyek azt jelzik, hogy a pH gradiens állandó marad, az amfolit zóna migrációja pedig 11,7 és 12,9 perc között történik a megadott kísérleti körülmények mellett. 200 nm-en mind az amfolitok, mind a fehérjék vándorlása követhető (ezen a hullámhosszon mindegyik komponens megfelelő elnyelést mutat).

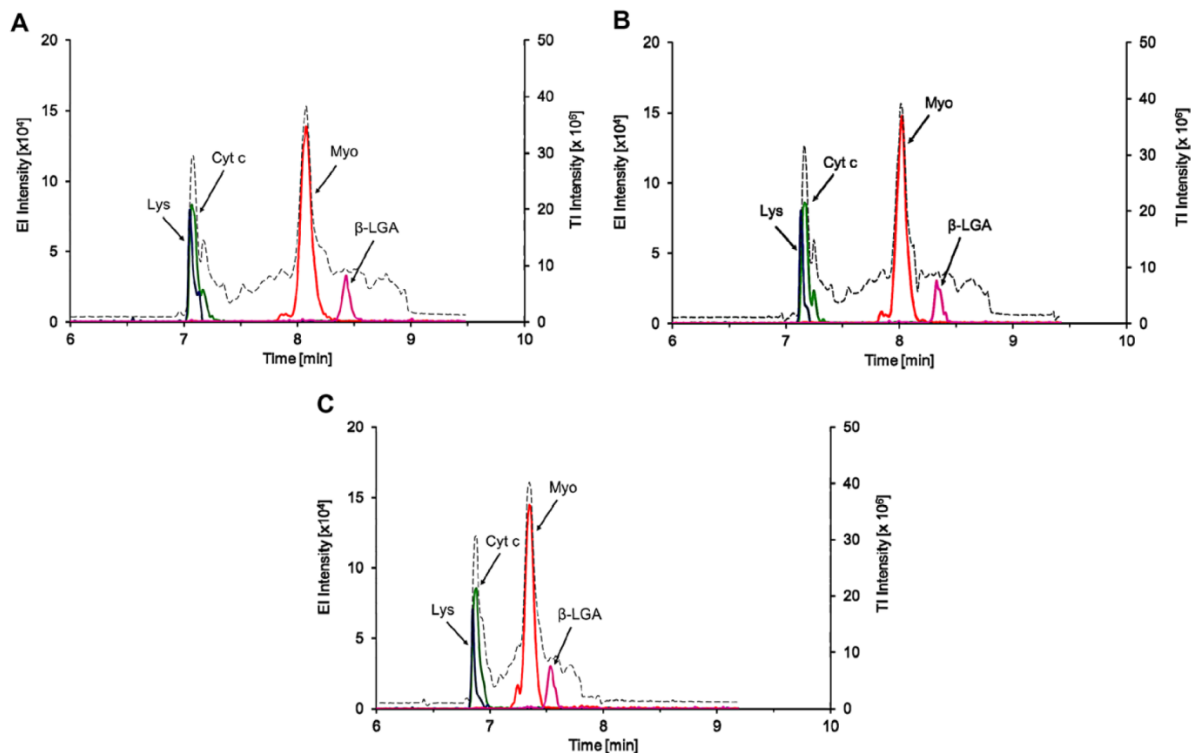
Különböző injektálási protokollok kerültek összehasonlításra, mint például „80/6/80”, „160/6/0” vagy „0/6/160”, 0,5%-os, az előzőhöz képest szűkebb pH tartományú, Ampholine pH 7–9 amfolit oldat alkalmazása mellett (**4. B ábra**). Megfigyelhető, hogy az amfolit zónák hossza szinte azonos maradt. Különösen figyelemre méltó, hogy a széles pH-tartományú amfolit használatakor a két bázikus fehérje nem volt jól elválasztható, habár a másik két fehérje alapvonal szinten elvált. A szűk pH-tartományú amfolitok (pH 7–9) használata esetén azonban hasonló kísérleti feltételek mellett (alkalmazott nyomás, mobilizáció) az el nem választott két bázikus fehérje a pH gradiens katód felőli szélére vándorolt.



4. Ábra A fehérjék izoelektroferogramjai (A) 1 vagy 0,5%-os Ampholine oldat (pH 3,5–10) és (B) 0,5%-os Ampholine oldat alkalmazásakor (pH 7–9) UV-detektálással. Kísérleti körülmények: PAA bevonatú kapilláris 70 cm (61,5 cm az UV-detektorig) × 50 μm belső átmérőjű; anolit 50 mM hangyasav, pH 2,3; katolit, 100 mM ammónium-hidroxid, 50 mM hangyasavval pH 8,5-re titrálva. Amfolit/minta/amfolit zónák szekvenciális injektálása 50 mbar nyomással, (A) „40/6/40” – 1% Ampholine pH 3,5-10 és „80/6/80” – 0,5% Ampholine pH 3,5-10; (B) „80/6/80”, „160/6/0” és „0/6/160” – 0,5% Ampholine pH 7–9. Alkalmazott feszültség +20 kV (télerősség 286 V/cm); mobilizálás: 10 perc fókuszálás után 50 mbarral a feszültség alkalmazása mellett; detektálási hullámhossz 200 nm; fehérjék koncentrációja, 2 mg/ml. A kísérleteket Agilent 7100 CE műszerrel végeztük. Rövidítések: Lys, lizozim; Cyt c, citokróm c; myo, miogloblin; β-LGA, β-laktoglobulin A. [165]

Az **5. ábra** szemlélteti a négy fehérje elválasztását Ampholine pH 7–9 amfolitokkal MS-detektálással, miután jelentős módosításokat vezetünk be a CIEF kísérletekben. Annak ellenére, hogy a PAA bevonat nem mobilizálja a pH gradienst, a CE műszer kapcsolódása

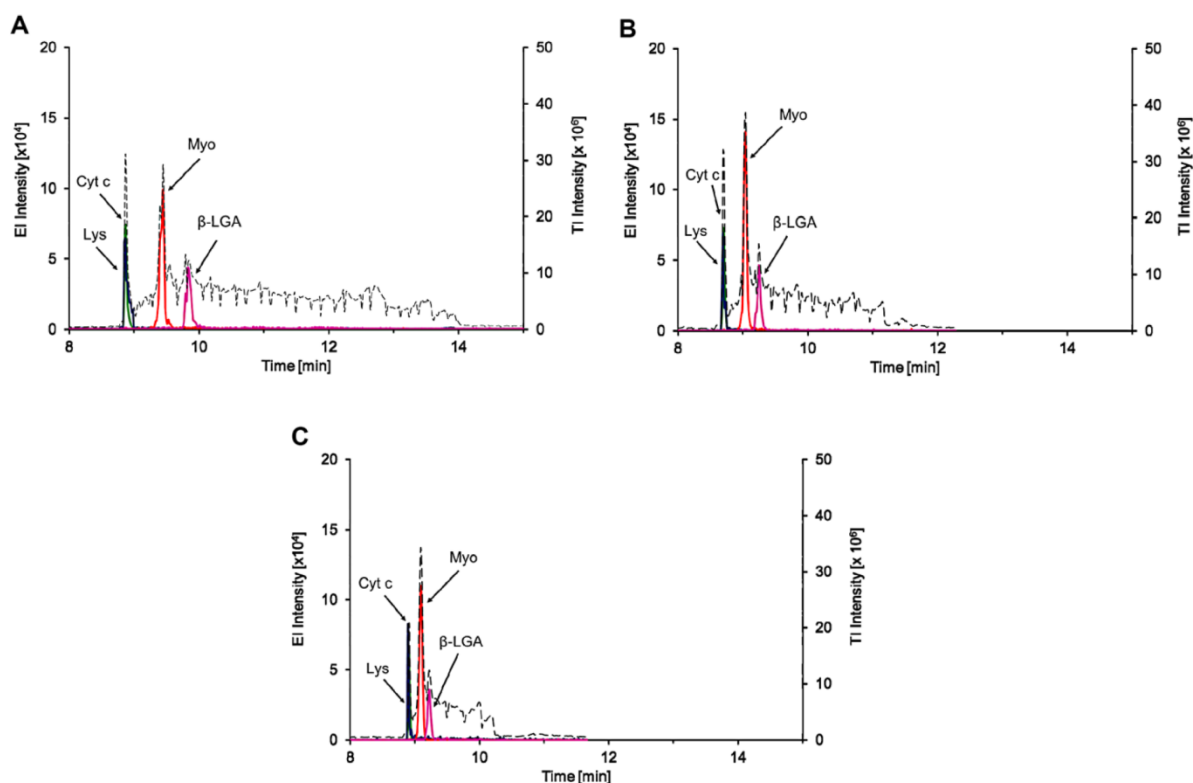
az MS-hez az ESI interfészen keresztül indukálja a zónamobilizációt (porlasztógáz szívó hatása). A nyomás alkalmazásának hiányában is a komponensek jelentősen gyorsabban érték el az MS detektort, mint a korábbi UV-detektálást alkalmazó kísérletben (ahol volt mobilizálás: 10 perc fókusálás után 50 mbaral mobilizáltuk a zónákat a feszültség alkalmazása mellett). A „40/6/40” injektálási protokoll (a korábbi mérés esetén kétszer több amfolitot injektáltunk **4. B ábra**) alkalmazása (csak 0,5 v/v% amfolitok felhasználásával) a négy fehérje elválasztását eredményezte, bár eltérő felbontással (**5. A ábra**). Az **5. B ábra** azt mutatja, hogy konzisztens volt a pH gradiens hossza, amikor csak „fél-szendvics”, „0/6/80” de ugyanazon amfolit kerültek alkalmazásra, összességében azonos mennyiségben. Ebben az esetben az amfolit komponenseket csak a mintakomponensek injektálása után injektáltuk, ahogy azt a „0” jelzi. A fél amfolit zóna alkalmazása, „0/6/40” esetén a gradiens zóna hossza megfelelő volt, ahogy azt a **5. C ábra** is mutatja.



5. Ábra A fehérjék izoelektroferogramjai 0,5% Ampholine oldat pH 7–9 alkalmazásakor, MS detektálással. Az amfolit / minta / amfolit zónák 50 mbar nyomással történő injektálására szekvenciális injektálási protokollt alkalmaztunk: (A) „40/6/40” (B) „0/6/80” (C) „0/6/40”. Kísérleti körülmények: PAA bevonatú kapilláris 70,6 cm × 50 µm belső átmérőjű; anolit 50 mM hangyasav, pH 2,3; katolit, 100 mM ammónium-

hidroxid, 50 mM hangyasavval pH 8,5-re titrálva. Alkalmazott feszültség +20 kV (télerősség 283 V/cm); minták koncentrációja: 1,3 mg/ml lizozim (pI 11,35, Lys), 1,1 mg/ml citokróm c (pI 10,25, Cyt c), 1,5 mg/ml mioglobin (pI 6,8, Myo), 1,6 mg/ml β -laktoglobulin A (pI 5,3, β -LGA). Az extrahált ion (EI) elektroferogramokhoz választott tömegek (m/z \pm 20 ppm): m/z 1590,4 (lizozim), m/z 824,9 (citokróm c), m/z 893,2 (mioglobin), m/z 1670,5 (β -laktoglobulin A). A teljes ion (TI) intenzitást szaggatott vonal jelzi. A kísérleteket Agilent 7100 CE műszerrel végeztük, amely Q-TOF MS műszerhez volt kapcsolva. [165]

Az amfolit koncentrációjának hatása az elválasztás hatékonyságára és a pH gradiensre három különböző koncentráció esetén került megfigyelésre Ampholine pH 4-6 oldattal. Ahogy azt a **6. ábra** mutatja, az amfolit koncentrációjának csökkentése 1% -ról 0,5% -ra és 0,25% -ra élesebb fehérje csúcsokat és rövidebb pH gradiens zónákat eredményez. Bár a két bázikus fehérje sávja átfedi egymást (nem választhatók el egymástól), a mioglobin és a β -laktoglobulin A jól elkülönülnek az alapvonalon.



6. Ábra A fehérjék izoelektroferogramjai (A) 1%, (B) 0,5% és (C) 0,25% Ampholine oldat pH 4-6 alkalmazásakor, MS detektálással. Amfolit / minta / amfolit zónák szekvenciális beinjektálása 50 mbar nyomással: „40/6/40”. A többi kísérleti körülmény és a rövidítések megegyeznek az **5. ábrával**. [165]

2. A nemvizes közegben történt módszerfejlesztések eredményei

i. Lipid A NACE–ESI-QTOF MS/MS vizsgálata

Az első kísérletek célja a nemderivatizált bakteriális foszfoglikolipidek elválasztása volt NACE–ESI-MS segítségével. Tekintettel a lipid A önmagában rejlő heterogenitására, a különböző komponensek, amelyek magas felbontású Q-TOF MS mérésekkel kerültek megkülönböztetésre, egyszerre voltak jelen a mintában. A lipid A anionok elemzéséhez a *S. sonnei* esetében az elválasztás közegéül szolgáló oldószer tiszta metanol volt, amelyhez 0,36:0,12 térfogatarányban (v/v) TEA:AcOH elegyet adtunk.

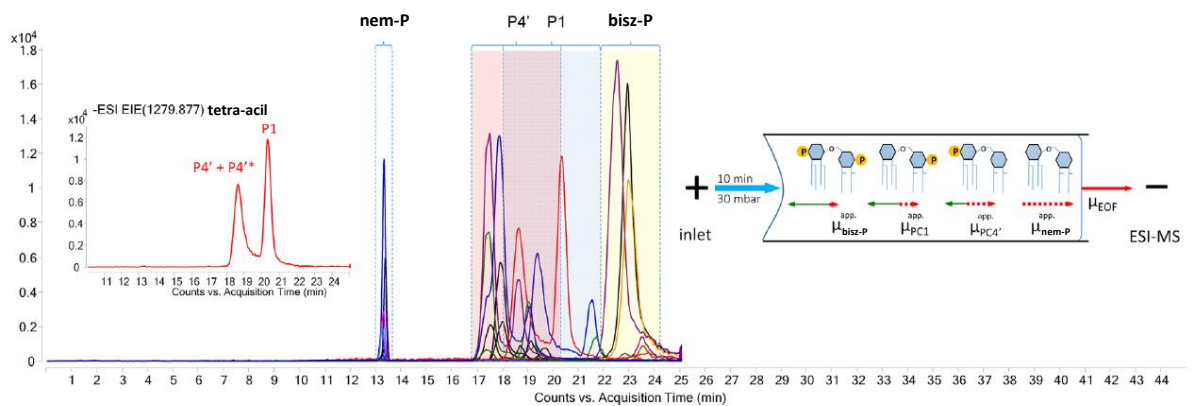
A **7. ábra** a normál polaritás használatával kapott elektroferogramot mutatja. Az acil láncok számában különböző lipid A vegyületek hatékonyan elválasztásra kerültek a foszforiláltságuk alapján: nem-foszforilált, monofoszforilált és biszfoszforilált formákra. Ezek a vegyületek jelentős különbséget mutattak töltés-méret arányukban. Mint lipofil, gyenge savak, a foszforilált lipid A komponensek nettó negatív töltést hordoztak enyhén lúgos körülmények között, ami anód irányba kényszerítette őket. Azonban a kapilláris fal szilanol csoportjainak deprotonálódásával (pH>7 tiszta metanos közegben) az EOF áramlás az anionos lipid A komponenseket a katód felé mozgatta (MS detektálás normál CE polaritási módban).

Az előzetes eredmények azt mutatták, hogy a lipid A komponensek anód irányú mobilitása és az EOF katód irányú mobilitása közel azonos nagyságrendű, bár az EOF kicsivel nagyobb mértékűnek mutatkozott. Mivel a lipid A zóna ellentétes irányban vándorolt az EOF-fel (kivéve a nem-foszforiláltakat, amelyek az EOF-fel együtt mozogtak), a nagyobb anódos mobilitású komponensek viszonylag stabilak maradtak az adott kapilláris pozícióban, ami megnehezítette számukra a detektor elérését normál polaritási módban. A CE-MS rendszer optimalizálása érdekében viszonylag rövid kapilláris hosszúság (55 cm) és a lehető legmagasabb feszültség (30 kV) került alkalmazásra. Ezenkívül a feszültségkülönbség fenntartása mellett 10 perc után külső nyomást (30 mbar) is alkalmaztunk annak érdekében, hogy a nem-foszforilált vegyületek (EOF markerei) elérjék az MS-t.

Az extrahált ion elektroferogramokban monofoszforilált lipid A esetén több szerkezeti izomer komponens volt megfigyelhető, amelyeket az egyedi migrációs idők

különböztettek meg annak ellenére, hogy ugyanazt a m/z -t és molekulaképletet tartalmazták. Az MS/MS mérések megerősítették, hogy a monofoszforilált lipid A ionok közötti különbség a foszfát csoport kötési helye volt - a diglükózamin alapváz C1, vagy C4' pozíciójában. Négy csúcs csoport került megkülönböztetésre a 25 perces elválasztási idő alatt, amelyek a nem foszforilált, C4'-monofoszforilált, C1-monofoszforilált és biszfoszforilált lipid A-t képviselték (a két monofoszforilált lipid A zónája átfedésben volt).

A C4'-monofoszforilált tetra-acilált komponenseknél a tandem tömegspektrum kimutatta az egymástól el nem választott acilációs izomerek jelenlétét (lásd a **7. ábrában** lévő bal oldali részábrát).



7. Ábra A *S. sonnei* baktérium kivonatában jelenlévő különböző lipid A-k NACE-ESI-QTOF MS analizisével kapott extrahált ion elektroferogramok (EIE). Kapilláris méretei: 55 cm × 50 μm, feszültség: 30 kV (normál CE polaritás, detektálás a katód végén), nyomásrásegítés: 0 perc: 0 mbar, 10 perc: 30 mbar. Háttélektrolit oldat: MeOH 0,36:0,12 (v/v) TEA:AcOH elegyével. A bal oldali ábrarész a tetra-acilezett monofoszforilált lipid A izomerek EIE-jét mutatja m/z 1280-nál. A jobb oldali részábrára a vegyületek migrációs sorrendjét mutatja. Jelölések: bisz-P, biszfoszforilált lipid A; P1, C1-monofoszforilált lipid A; P4' és P4'* , a C4'-monofoszforilált lipid A acilezési izomerjei; nem-P, nem foszforilált lipid A. [166]

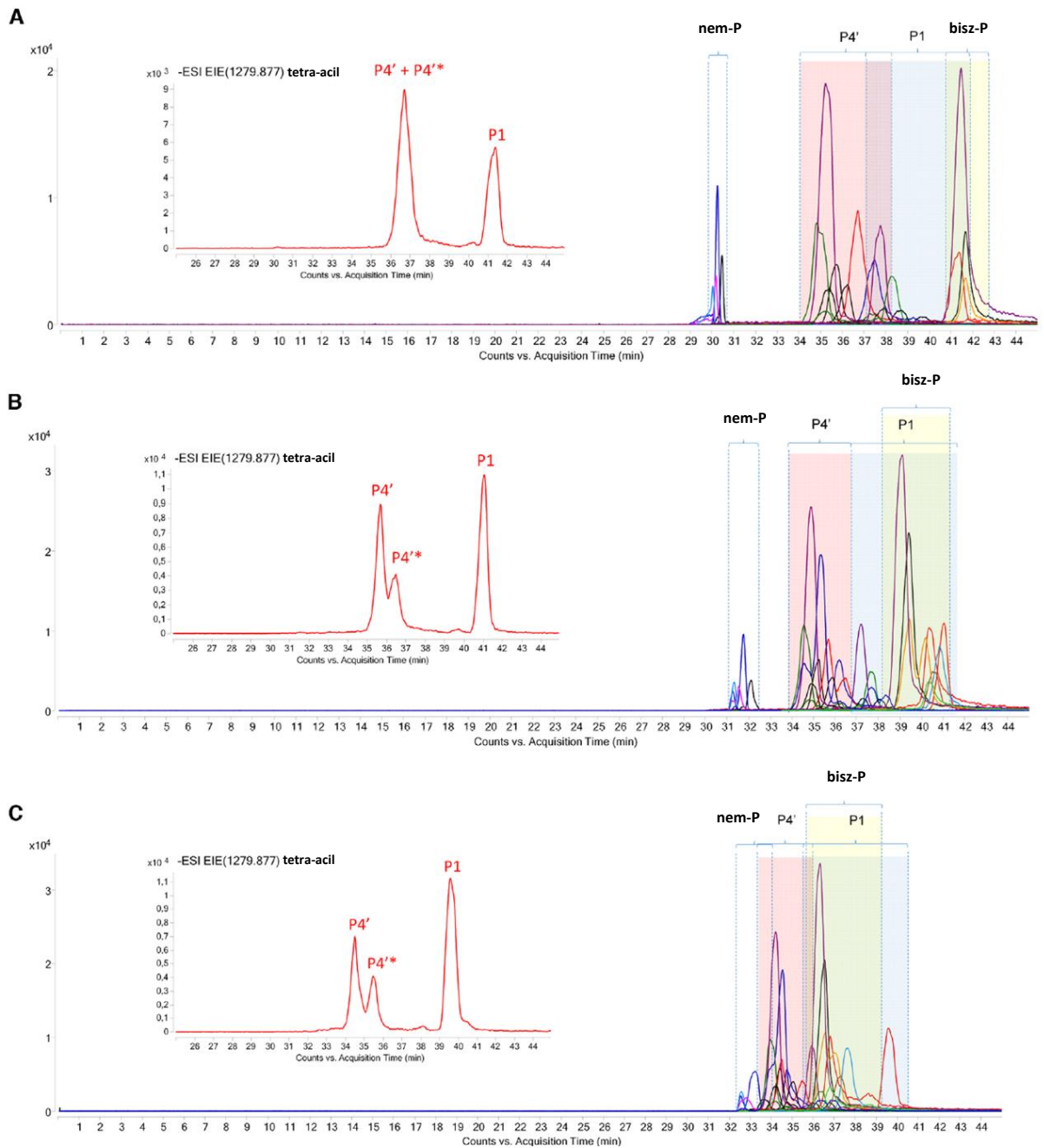
ii. Az elválasztás hatékonysága és szelektivitása

Az elválasztás hatékonyságának és szelektivitásának optimalizálása érdekében a háttélektrolit oldat oldószer-összetételének, elektrolit-összetételének és elektrolit-koncentrációjának hatása került vizsgálatra, azon céllal, hogy mit okoz a kiválasztott lipid A komponensek migrációs idejében, elválasztási hatékonyságban és a felbontásban. A **8. ábrán** az összetett lipid A minta elektroferogramjai láthatók különböző arányú

oldószer elegyekben (20%-tól 60%-ig DCM-ban és metanolban) normál CE polaritási módot használva. Az elektrolit adalékok (0,72:0,24 TEA:AcOH) koncentrációi a DCM-MeOH elegyben állandóak voltak az oldószerhatás értelmezéséhez. Ahogyan azt az ábrán láthatjuk, a DCM hozzáadása a futtató elektrolithoz jelentősen csökkentette az EOF-t, ami közel 20 perccel hosszabb mérési időt eredményezett a tiszta metanolhoz képest. Fontos megjegyezni, hogy 30 perc után külső nyomás (30 mbar) került alkalmazásra annak érdekében, hogy a mintazóna elfogadható migrációs idővel rendelkezzen.

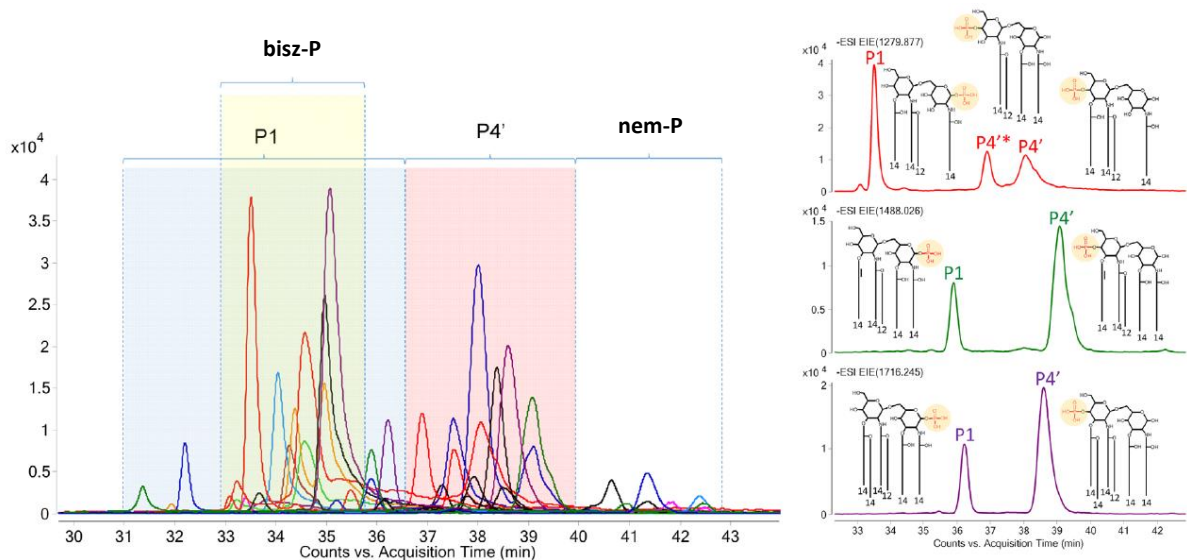
A migrációs idő változásán túl különféle jelentős különbségek figyelhetők meg az egyes lipid A komponensek migrációs viselkedésében. Például a C1 és C4' monofoszforylált izomerek migrációs zónái egyértelműen elkezdtek szétválni 40% feletti DMC-tartalom mellett (**8. B ábra**). Ezenkívül a legmagasabb DCM százalékos arány alkalmazásakor a C1 mono- és a biszforylált csúcs csoportok migrációs sorrendjének megfordulása történt (**8. C ábra**). Ez a változás a biszforylált vegyületek disszociációjának (töltés csökkenés) tulajdonítható a DCM-ben.

Továbbá, lépésről lépésre javuló felbontás látható különböző aciláltságú, nem-foszforylált lipid A komponenseknél (amelyek az EOF front közelében mozognak). Ezeknek a vegyületeknek a legjobb elválasztása 40% DCM tartalomnál érhető el. Feltehetően a nemionos molekulák ionos heterokonjugátumokká alakultak át a háttérektrólitban jelen lévő acetátionokkal. Az ionos komponensek mobilitása fordítottan arányos a méretükkel, ebben az esetben a lipid A aciláltsági fokával. Ennek eredményeként a nagyobb nem-foszforylált molekulák lassabban mozogtak, és az EOF frontjához közel migráltak. Amikor a háttérektrólit nem, vagy kevesebb mint 40%-ban tartalmazott DCM-t, a lipid A molekulák affinitása az acetátionok felé alacsonyabb volt, és ennek eredményeként nem történt meg a nem-foszforylált összetevők elkülönülése.



8. Ábra A *S. sonnei* baktérium kivonatában jelenlévő különböző lipid A-k NACE-ESI-QTOF MS analízisével kapott extrahált ion elektroferogramok (EIE). Kapilláris méretei: 55 cm \times 50 μ m, alkalmazott feszültség: 30 kV (normál CE polaritás), nyomásrásegítés: 0 perc: 0 mbar, 30 perc: 30 mbar. Háttélektrolit oldat: (A) 20:80 (v/v) DCM:MeOH, (B) 40:60 (v/v) DCM:MeOH és (C) 60:40 (v/v) DCM:MeOH kiegészítve 0,72 :0,24 (v/v) TEA:AcOH mindhárom esetben. A részábrák a tetra-acilezett monofoszforilált lipid A izomerek EIE értékét mutatják, m/z 1280-nál extrahálva. Jelölések megegyeznek a **7. ábrával**. [166]

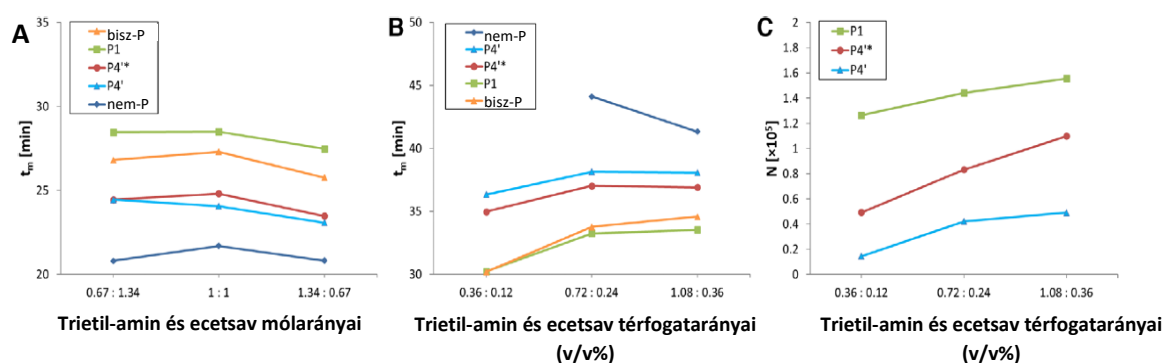
A metanol fokozatos cseréje DCM-ra jelentős hatással volt a tetra-acilációs izomerek szétválasztására, különösen akkor, ha a DCM koncentrációja meghaladta a háttélelektrolitban a 40%-ot (40% DCM-nál $R=0,83$, 60% DCM-nál $R=1,18$; lásd a **8. ábra B, C** részábráin). Valószínű, hogy a két tetra-acil-izomer DCM-ban való oldódása nagyobb különbségeket okoz a molekulageometriájukban. Ezáltal a töltés/tömeg arányuk eltérő lesz. Azonban, ha a rendszer polaritását megfordítjuk, jelentős javulás érhető el a két izomer szétválasztásában. A **9. ábra** a háttélelektrolitban lévő só koncentrációjának optimalizálása és állandó nyomásrősegítés alkalmazása mellett, fordított CE polaritású elrendezésben detektált átfedő extrahált ion elektroferogramokat mutatja be.



9. Ábra A *S. sonnei*-ben jelenlévő különböző lipid A-k NACE-ESI-QTOF MS analizésével nyert extrahált ion elektroferogramok (EIE). Kapilláris méretei: 55 cm × 50 μm, rákapcsolt feszültség: -30 kV (fordított CE polaritás, detektálás az anódos végén), nyomásrősegítés: 0 perc: 3 mbar, 30 perc: 30 mbar. Háttélelektrolit oldat: 40:60 (v/v) DCM:MeOH 0,72:0,24 (v/v) TEA:AcOH-val. A részábrák a 1280 m/z, 1488 m/z és 1716 m/z mellett extrahált tetra-, penta- és hexa-acilezett, monofoszforilált lipid A izomerek szerkezetét és EIE-it mutatják be. Jelölések megegyeznek a **7. ábrával**. [166]

A konstans külső nyomás alkalmazása (3 mbar) elegendőnek bizonyult az EOF katód irányú mobilitásának leküzdéséhez. A **9. ábra** azt is mutatja, hogy az elektrolyt koncentrációk növelése (1,08:0,36, TEA:AcOH) lehetővé tette a két acilálási izomer teljes elválasztását az elektroforetikus mobilitásaikban levő jelentős különbségek miatt. Normál vagy fordított CE polaritás alkalmazásakor az egyes lipid A komponensek

vándorlási sorrendjében egy különbség volt megfigyelhető, ami a NACE rendszer megváltozott szétválasztási szelektivitását mutatja a két polaritási módban (összehasonlítva a **8. B** és a **9. ábrát**). A polaritás váltás különösen hasznos azoknak a komponenseknek a detektálására, amelyek vagy a minta zóna kezdeténél, vagy a végénél vándorolnak. Például normál CE polaritás használatakor a nem-foszforilált lipid A komponensek számára kevesebb idő jutott, hogy elválasszódjanak egymástól, összehasonlítva a fordított CE polaritású mérésekkel azonos körülmények között.



10. Ábra A trietil-amin és az ecetsav elektrolit adalékok mólarányának hatása (A) a vándorlási időre 60:40 (v/v) MeOH:DCM oldószerben, valamint a sókoncentráció szintjének hatása (B) a migrációs időre és (C) az elméleti tányérszámra és felbontásra 40:60 (v/v) DCM:MeOH oldószerben. Kapilláris méretei: 55 cm × 50 μm, (A) rákapcsolt feszültség: 30 kV (normál CE polaritás), nyomásrásegítés: 0 perc: 0 mbar, 20 perc: 30 mbar, (B) és (C) rákapcsolt feszültség: –30 kV (fordított CE polaritás), nyomásrásegítés: 0 perc: 3 mbar, 30 perc: 30 mbar. A TEA és az AcOH 1:1 mólaránya megegyezik a 0,36:0,12 térfogataránnyal. Jelölések megegyeznek a **7. ábrával**. [166]

A **10. ábra** a migrációs idők és az elméleti tányérszámok változásait mutatja be öt reprezentatív lipid A molekula esetében (különböző foszforilációs komponensekkel és két acilálási izomerrel). Ezek a változások összefüggésben állnak a TEA és AcOH elektrolit adalékok mól- és térfogatarányával a nemvizes háttérelktrolitban. Először a savas és lúgos adalékok mólaránya került vizsgálatra 1:2, 1:1 és 2:1 arány mellett, miközben az adalékok összes anyagmennyisége állandó maradt (**10. A ábra**). Az egyenlő mólarány (1:1) került kiválasztásra a további vizsgálatokhoz, mivel a legjobb elválasztás ezen arány esetén alakult ki az acilálási izomerek között.

Ezután a teljes adalék koncentráció hatását tanulmányoztuk mind normál, mind fordított CE polaritási módban. A fordított polaritási mód eredményeit a **10. B** és **C** ábrák mutatják be. Fordított módban az EOF ellenáramként működik, így az elválasztást külső nyomással kellett segíteni. A sókoncentráció növekedése elnyomta az EOF-t, amint azt a nem-foszforilált komponens látható mobilitása bizonyítja normál módban. Enyhe csökkenés volt megfigyelhető a komponensek elektroforetikus mobilitásában. A legalacsonyabb sószinten az EOF meghaladta a külső nyomással segített áramlást, ami a nem-foszforilált izomer detektálásának elmaradását eredményezte. Azonban az elektrolit adalékok magasabb koncentrációi lehetővé tették a teljes minta zóna nagyobb felbontású elválasztását, ami a lipid A ionok közötti nagyobb elektroforetikus mobilitás különbségeknél köszönhetően javította a felbontást.

A **10. C ábra** illusztrálja a hatékonyság növekedését az elektrolit koncentrációval párhuzamosan, különösen a P4' és P4'* acilálási izomerek esetében. Az alacsony, közepes és magas sószintekhez tartozó felbontások: fordított polaritás módban R = 1,5; 1,8; 2,1 és normál polaritás módban R = 0,6; 0,8; 1,5 voltak. Összességében a fordított polaritási mód, 40:60 (v/v) DCM:MeOH nemvizes oldószer eleggyel és 1,08:0,36 (v/v) TEA:AcOH tartalommal optimális kompromisszumnak tűnik a komplex lipid A mintában az egyedi vegyületek hatékony szétválasztásához és MS/MS fragmentációjához.

iii. Foszforilációs hely és acilálási profil meghatározása tömegspektrometriával

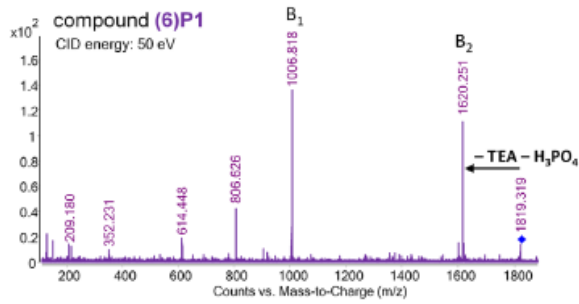
A 40-60% DCM-t tartalmazó háttélelektrolitban a lipid A molekulák megnövelt oldhatósága növelte a detektált MS jelek intenzitását és csökkentette az alsó kimutatási határértékeket. Ez a fejlesztés lehetővé tette a pontos szerkezetazonosításhoz szükséges MS/MS fragmentációs mérések alkalmazását. A háttélelektrolitban és a köpenyfolyadékban a TEA, mint adalék került alkalmazásra, mely negatív ion módban lúgossá téve a közeget segítette a lipid A komponensek deprotonálódását $[M-H]^-$ vagy pozitív ionmódban lehetővé tette a trietil-amónium addukt-ionok $[M + H + TEA]^+$ kialakulását. A lipid A ionformák CID körülmények közötti fragmentációs profiljait korábban már leírták, így a vonatkozó fragmentációs profilok könnyen értékelhetők voltak. A következőkben csak a fő ioncsúcsokról lesz szó. [91, 128-131]

A pozitív ionmódú tandem tömegspektrumokban (**11. ábra**) domináns B típusú ionok (B_1 és B_2 , melyek a glükózamin diszacharid glikozid kötéseinek $C1'$ és $C1$ pozícióiban történő hasadása révén keletkeztek) kerültek megfigyelésre. Ezek a fragmentációs ionok diagnosztikai ionként szolgálnak a lipid A foszforilációs mintázatának detektálására. Például a B_2 ion jelzi a foszforilációs állapotot a $C1$ pozícióban a hozzáadott adduktképző ágens (TEA), valamint a $C1$ szubsztituens (azaz H_3PO_4 a $C1$ -foszforiláció esetén vagy H_2O a $C4'$ -foszforiláció esetén) elvesztésével. Továbbá, a B_1 ion közvetett információt nyújt a foszforilációs állapotról a $C4'$ pozícióban.

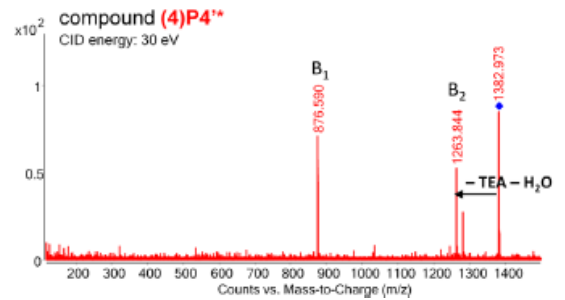
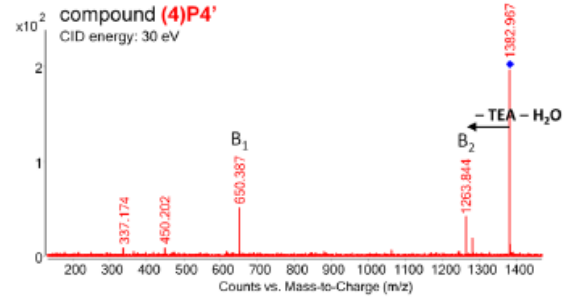
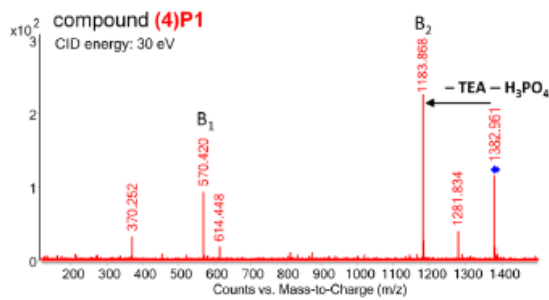
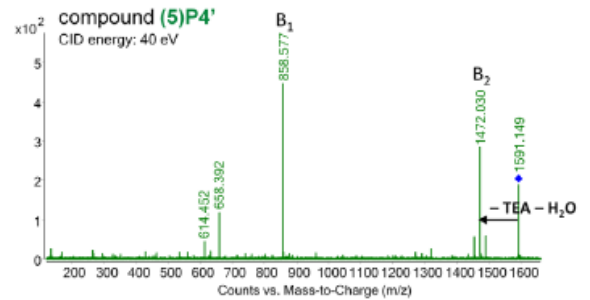
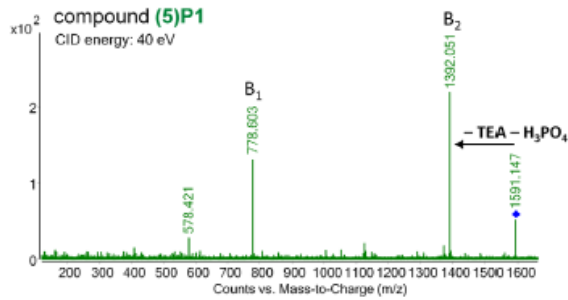
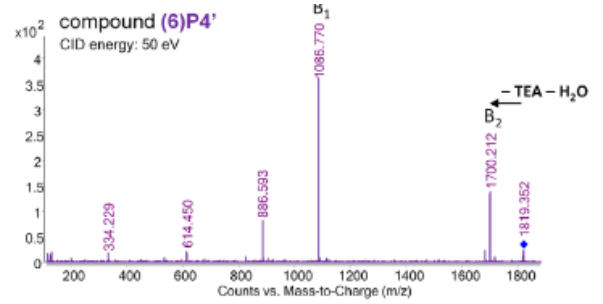
A pozitív ionmódú tandem tömegspektrumokban két különböző B_1 ioncsúcs jelent meg az azonos B_2 típusú ioncsúcs mellett 1264 m/z értéknél, amely bizonyítékot szolgáltat két tetra-acilált $C4'$ -monofoszforilált lipid A izomer ($P4'$ és $P4'^*$ vegyületek) jelenlétére, különböző acilálási mintázatokkal.

A negatív-ionizációs módban rögzített tandem tömegspektrumok (**12. ábra**) értékes információkat nyújtanak a lipid A acilálási mintázatairól. A deprotonált monofoszforilált lipid A prekursorainak $[M-H]^-$ fragmentációja során az észterkötött zsírsavak (mind elsődleges, mind másodlagos) lehasadnak. A fragmentációs folyamatokat szabályozó egyetlen foszfát csoport pozíciója miatt a zsírsav-veszteségek egymást követően ($C4'$ -foszforiláció esetén) vagy versengőbben ($C1$ -foszforiláció esetén) történhetnek. Annak ellenére, hogy a különböző pozícióban foszforilált izomer szerkezetek között eltérések vannak az észterkötés-hasadások preferenciájában, rendkívül hasonló tandem tömegspektrumok keletkeznek, amelyek azonos m/z értékekkel rendelkeznek, különböző relatív intenzitásokkal. A NACE-ESI-MS/MS módszer nagy szelektivitást és érzékenységet kínál, lehetővé téve a foszforilációs izomerek CID fragmentációs folyamatainak pontos meghatározását és összehasonlítását.

C1 monofoszforilált lipid A



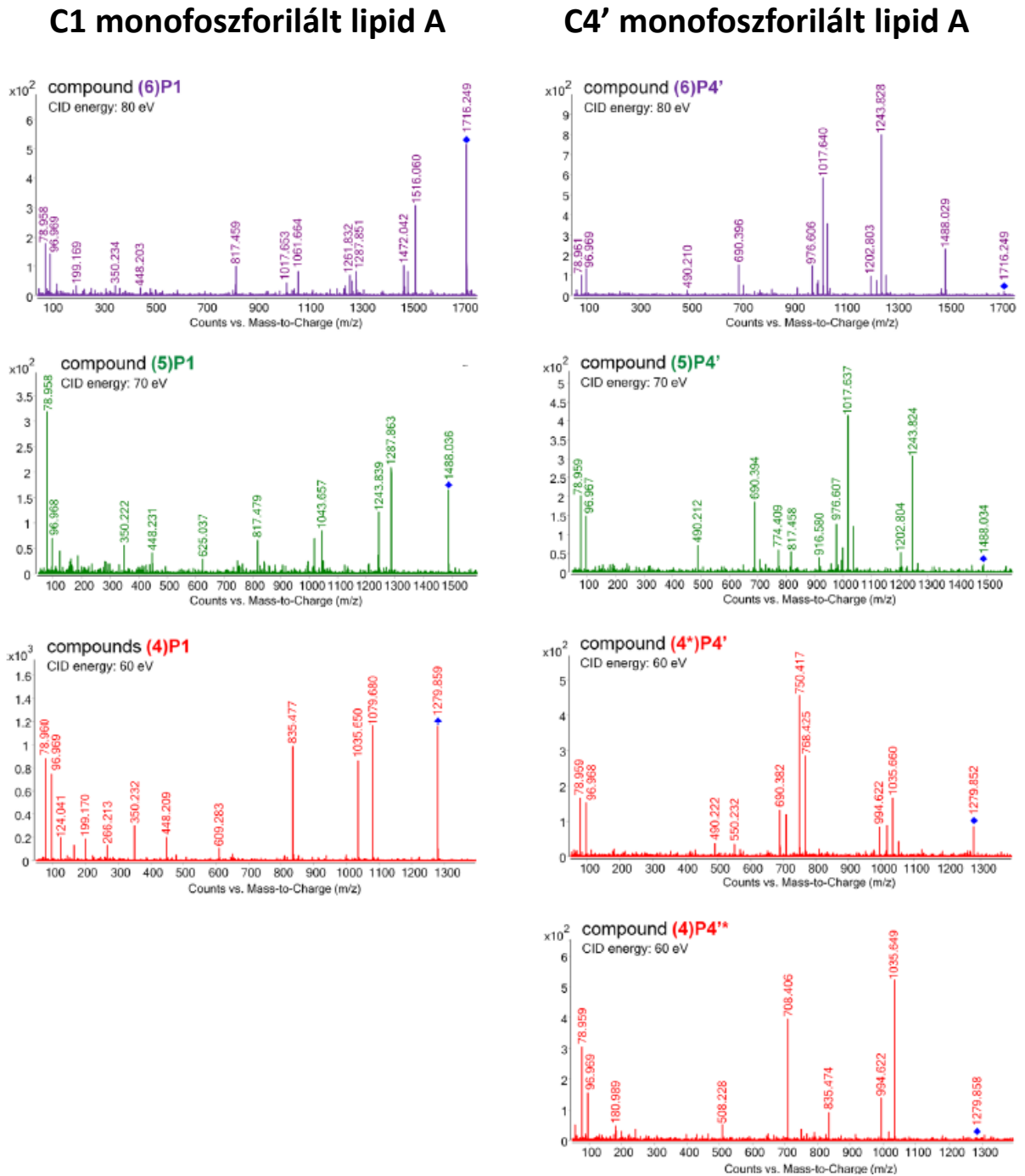
C4' monofoszforilált lipid A



11. Ábra A NACE által elválasztott C1 és C4' foszforilációs és két C4' tetraacilezett izomer pozitív ion módú ESI-QTOF MS/MS-ével kapott CID tömegspektrumok. A zárójelben lévő számok a zsír-acillánok számát mutatják a lipid A molekulában. P1, C1-monofoszforilált lipid A; P4' és P4**, a C4'-monofoszforilált lipid A acilezési izomerjei; non P, nem foszforilált lipid A. [166]

Érdeemes megjegyezni, hogy az izomerek mindegyik párosának fragmentációjához ugyanaz az ütközési energia került alkalmazásra, azonban különbség volt a deprotonált formák disszociációs arányában (pl. a prekursor ion intenzitása/összes ion intenzitása),

a C4'-monofoszforilált prekursorok esetében magasabb arányt mutatva. Ez a jelenség azt sugallja, hogy a deprotonált C1-foszforilált lipid A molekulák nagyobb stabilitást mutatnak a C4' izomerekhez képest.



12. Ábra A C1 és C4' foszforilációs izomerek és két C4' tetracilezett izomer NACE által elválasztott CID tömegspektrumai negatív ion módú ESI-QTOF MS/MS segítségével. A zárójelben lévő számok a zsír-acilláncok számát mutatják a lipid A molekulában. P1, C1-monofoszforilált lipid A; P4' és P4'*, a C4'-monofoszforilált lipid A acilezési izomerjei; non P, nem foszforilált lipid A. [166]

VII. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

1. A módszerfejlesztésekhez kapcsolódó kihívások és problémák a CZE-MS és CIEF-MS kapcsolások során

CE-QTOF-MS kapcsolat közvetlenül az ESI használatával még nem volt alkalmazva szerves savak elemzésére bor mintákban. Ez a módszer ígéretes megközelítést kínál a vörösborok hat szerves savának minőségi és mennyiségi monitorozására. Ezek a savak a tejsav, a borostyánkősav, az almasav, a borkősav, a shikiminsav és a citromsav. Az elemzés előtt a bor minták hígítás és szűrés útján lettek előkészítve. Az optimalizált kísérleti feltételek alkalmazásával az egész elemzést kevesebb mint 4 perc alatt meg lehetett valósítani. Fontos megjegyezni, hogy a szerves savak migrációs ideje nem változott a mérések között, illetve a standard és a borminta esetén sem (RSD < 3%). Az alkalmazott elválasztási körülmények mellett a szerves savak deprotonálódásuk miatt negatív töltéssel rendelkeznek. [126, 132] A megfelelő háttéreléktrólit kiválasztása kiemelt fontosságú annak érdekében, hogy ezeket az anionokat el lehessen választani és kvantifikálni. A háttéreléktrólitnak több szempontot kell teljesítenie: (1) meggátolni vagy visszafordítani az elektroosmotikus áramlást, (2) a csúcsalak torzulás minimalizálása érdekében a háttéreléktrólit mozgékonyága nem térhet el számottevően a minta mozgékonyágától, (3) direkt UV detektálás esetén minimális moláris abszorpciós képességgel kell rendelkeznie. [126, 132] Amennyiben az MS kerül alkalmazásra a minták detektálására, érdemes kerülni a nem illékony pufferek (pl. foszfát vagy borát pufferek) használatát, mivel azok szennyeződéseként vihetnek be az elektropray kamrába és az MS analizátorba, valamint gátolhatják a minták ionizációját, ami csökkent érzékenységhöz vezethet. Ezek miatt a CE-MS analízisek során előnyben részesülnek az illékony pufferek. A pufferek pH-jának befolyása közvetlenül nem került tesztelésre, de irodalmi adatok alapján figyelembe lett véve. [133]

A minták adszorpciójának és vesztésének elkerülése érdekében a kapilláris belső felülete megfelelő fedéssel került bevonásra. A fedésnek homogén belső felületet kell létrehoznia, teljesen elzárva az adszorpció helyeket, és biztosítani a magas elméleti tányérszám elérését. Kapcsolt módban a fedőanyagának kompatibilisnek kell lennie az MS-sel, és biztosítani kell a minták elválasztásának reprodukálhatóságát. [134]

A kapilláris belső felületének fedőanyagaként hexadimetrin-bromid (polibrén) volt alkalmazva. A polibrén magas fedő stabilitást biztosított és pozitív töltésű kapilláris felületet alakított ki, amely fordított (anódos) EOF-t indukált. Ez a bevonat lehetővé tette az ismételhető elválasztásokat, a minták hatékony ionizációját és a negatív töltésű minták detektálását. Emellett a polibrén felületbevonat kompatibilis volt az MS alkalmazással és a mintamátrix komponenseivel. A magas felületi töltése miatt a polibrén nagy anódos EOF-t indukált, ami reprodukálható migrációs időket eredményezett a szerves savak esetében, ezáltal könnyen azonosíthatóak voltak a jellegzetes ionjaik alapján az MS-ben. A köpenyfolyadék kiválasztása jelentősen befolyásolta az érzékenységet a CE-ESI/QTOF-MS vizsgálat során. Általában az MS elemzésben egy kis mennyiségű illékony savat, például hangya- vagy ecetsavat adnak hozzá a mozgófázishoz a minták ionizációjának elősegítése érdekében.

A szerves savak elválasztására fejlesztett módszerünket összevettem Acunha és munkatársai [33] munkájával, melyben anionos metabolitokat választottak el vörösbor és narancslé mintákban. Méréseik során kationos kopolimer fedést alkalmaztak (poli-(N,N,N',N'-tetraetildietiléntriámin, N-(2-hidroxipropil)-metakrilamid 50:50 moláris arányban) 50 μm belső átmérőjű kapillárisokban. A fedés elkészítése az általuk végzett szintézis, majd az azt követő kapilláris fedés miatt több, mint 24 órát vett igénybe. A futtatásaik 12 percig tartottak, 1 M hangyasav (pH=2,4) háttélektrolit, +20 kV és -20 kV feszültségkülönbség alkalmazásával érték el a legjobb mérési körülményeket. 142 különböző metabolitot tudtak azonosítani vörösborban, melyek közt megtalálható volt a borkősav, citromsav, almasav és borostyánkősav. Méréseik során CE-ESI-TOF-MS-t alkalmaztak. Szemben az eddig felsoroltakkal, az általunk fejlesztett módszer hat különböző szerves sav (tejsav, borostyánkősav, almasav, borkősav, shikiminsav és a citromsav) azonosítása mellett a szerves savak koncentrációinak meghatározására is alkalmas vörösbor mintából. Az 50 μm -es kapilláris fedéseként mi polibrént alkalmaztunk. A fedés elkészítése a fedési lépés során mindössze 15 perces polibrénes mosást igényelt. A futtatásaink 4 percesek voltak, háttélektrolitként 50 mM ammónium-acetát puffer (pH=6,0) került alkalmazásra -20 kV feszültségkülönbség mellett. Méréseink során CE-ESI-QTOF-MS műszert alkalmaztunk. Összeségében sikerült

egy gyorsabb, egyszerűbb és több szerves sav azonosítására és koncentrációik meghatározására képes módszert fejlesztenünk.

A fehérjék analízisére irányuló CIEF vizsgálat egy széleskörű kutatási téma, amelyet a gyors és hatékony analitikai módszer iránti igény hajt. Ez a módszer az amfoter anyagok jellemző paramétere, az izoelektromos pont alapján működik. Annak ellenére, hogy számos módszert fejlesztettek ki, a CIEF integrálása az MS-sel továbbra is egy jelentős kihívás marad a natív fehérjeanalízis terén. A két technika kombinációja számos megoldást és stratégiát eredményezett. [37] A legújabb tanulmányok azonban rávilágítanak olyan kritikus kérdésekre, amelyeket kezelni kell, ideértve a kapilláris felületén bekövetkező fehérjeadszorpciót, a pH gradiens mobilizációját és az amfolit komponensek esetleges interferenciáját az MS-sel. [135] Az értekezésben a CIEF kísérletekhez szekvenciális injektálási protokoll került alkalmazásra, szűk és széles pH tartományú amfolitokkal.

i. A kapillárisok

A fehérjék CE analízise során a makromolekulák és a kapilláris fal közötti kölcsönhatás csúcshévesedéshez és csökkent elválasztási hatékonysághoz vezethet. A tartósan fedett kapillárisok használata segíthet megelőzni vagy csökkenteni ezt a kölcsönhatást a fehérjék és a kapilláris fala között. A különböző fedett kapillárisok közül (például lineáris poliakrilamid [136], kétrétegű sziloxándiol-poliakrilamid [137], és polivinil-alkohol [138]), amelyeket fehérjék CIEF-MS elválasztására alkalmaznak, a PAA kapillárisok gyakorlati alkalmazhatósága került bemutatásra. Ezekben a PAA kapillárisokban nem alakul ki EOF, ami a pH gradiens mobilizációjának alkalmazását teszi szükségessé (vagyis a fókuszált zónák detektor felé való elmozdítását). Ezt nyomással vagy az ESI ionforrás szívóhatásának kihasználásával lehet elérni a kapillárisban. A megfelelő mobilizációt a köpenyfolyadék összetétele is segítheti, biztosítva az elektrokinetikus mobilizációt egy adott időszak után a pH változása miatt. [139]

A szekvenciális injektálási protokoll során a kapillárist kezdetben katolittal, egy bázikus oldattal töltik fel, mivel az elektroforetikus migráció az anód oldaltól a katód oldal felé történik. A PAA bevonat stabilitásának fenntartása érdekében az elektrolit oldatok pH-jának 9-nél alacsonyabbnak kell lennie. Mivel az MS kapcsolat miatt az illékony

elektrolitok használata szükséges, a kívánt pH-t az ammónium-hidroxid hangyasavval történő titrálásával állítjuk a megfelelő értékre. A statikus bevonat használata előnyösebb, mint a dinamikus bevonatoké, mivel kiküszöböli az MS-detektálást befolyásoló adalékok (pl. metilcellulóz) szükségességét.

ii. Az amfolitok

A vizsgált fehérjék megjelenése a pH gradiensen belül vagy kívül függ például az amfolitok (széles vagy szűk pH tartomány) és az elektrolit oldatok összetételétől. A kísérletek, amelyeket polivinil-alkohol vagy poliakrilamid bevonatú kapillárisokban végeztek, kimutatták, hogy az amfolitok mennyisége és az injektálás hossza befolyásolja a kapillárisban kialakuló pH gradiens hosszát. [41]

Bár igazolták, hogy a CIEF elvégezhető amfolitok jelenléte nélkül, ami csökkenti a háttér interferenciát a többszörösen töltött fehérjék m/z tartományában, a komplex keverékek hatékony felbontása CIEF esetén valóban igényli az amfolitok jelenlétét. [140] A széles pH-tartományú amfolit oldatok kb. 4000-6000 izomert tartalmaznak [141-145], míg a szűk pH-tartományú amfolit oldatok, amelyeket a széles pH-tartományúakból állítanak elő, kevesebb komponensből állnak. Kimutatásra került, hogy a széles pH-tartományú amfolitok alkalmazhatók CIEF-elválasztásban „szendvics injektálás” alkalmazása mellett, azonban a kialakuló izoelektromos mintázat a választott pH-tartománytól és a minták pI értékeitől függ. A négy fehérje komponens felbontása eltérő. Például a mioglobint (pI 6.8) és a β -laktoglobulin A (pI 5.3) elválasztható egymástól és a két bázikus fehérjétől rövid migrációs távolságon belül, függetlenül attól, hogy széles vagy szűk pH-tartományú amfolitok kerülnek-e alkalmazásra (lásd a **4. A ábrát** vagy **4. B ábrát**). Azonban, a viszonylag rövid migrációs távolság és a fókuszlási lépést követő nyomással történő mobilizáció miatt a két bázikus fehérje nem válik el egymástól ezekben a kísérletekben. Fontos megjegyezni, hogy van különbség a pH 3.5-10 és a pH 7-9 amfolitok használata között. A két bázikus fehérje a katodit és a pH-gradiens között helyezkedik el éles fronttal a **4. B ábrán**, míg egy rövid amfolit zóna látható ezen bázikus fehérjék előtt a **4. A ábrán**. Ez a különbség abból adódik, hogy az amfolit oldatok sem kizárólag csak az amfolit komponensekből állnak (pontosan a megadott pI értékekkel) a pH tartomány széleinél. A pH 7-9 amfolitoldat esetében ezeknek az „első” komponenseknek a pI -értékei jóval

pH=10 alatt vannak, ami arra utal, hogy a két bázikus fehérje éles csúccsal jelenik meg az amfolitzóna szélén.

iii. A szekvenciális injektálás

Az amfolit oldatok mennyisége és koncentrációja kulcsfontosságú szerepet játszik a megfelelő felbontás elérésében. A végső pH gradiens hossza az alkalmazott amfolitok mennyiségétől függ. Ez a jelenség egyértelműen látható a **4. ábrán**, ahol különböző injektálási elrendezések lettek alkalmazva, de az amfolitok mennyisége állandó maradt. Megfigyelhető ugyanaz a végső pH gradiens (gradiens hosszúság), amikor két zóna lett injektálva: 1% amfolit oldattal („40/6/40” injektálási protokoll) vagy 0,5% amfolit oldattal („80/6/80” injektálási protokoll). Mindkét eset összeségében ugyanazt az amfolit mennyiséget tartalmazta. Ez a jelenség független az amfolit pH-tartományától és az amfolit zónák számától. [40]

A **4. B ábrában** ugyanannyi Ampholine pH 7-9 amfolit került alkalmazásra három különböző protokollal („80/6/80”, „160/6/0” és „0/6/160” sorrendben), ami azonos pH gradienst eredményezett. Amikor csak az amfolitok fele került injektálásra „fél szendvics” elrendezésben, eredményként egy rövidebb (fele olyan hosszúságú) pH gradiens keletkezett (lásd az **5. B ábrát** és az **5. C ábrát**). Mindazonáltal, a négy fehérje elválasztása így is elérhető.

iv. A fehérjék izoelektromos pontja összevetve az alkalmazott pH gradienssel

A fehérje komponensek elhelyezkedése a pH gradiensen belül kulcsfontosságú kérdés a CIEF-ban. Széles pH-tartományú amfolit oldat esetén, várható, hogy a 3,5 és 10 közötti pI értékkel rendelkező komponensek migrálnak a pH gradiensen belül. Azonban a kísérletek során a lizozim (pI 11,35) is megfigyelhető a pH gradiensben a β -laktoglobulin A-val (pI 5,3), a mioglobinnal (pI 6,8) és a citokróm c-vel (pI 10,25) együtt (**4. A ábra**). A lizozim elhelyezkedése, migrációja két tényezőnek tulajdonítható. Először is, az amfolit oldat megadott pH tartománya magában foglalja a pI értékeket pH 10-ig terjedően, ami arra utal, hogy a megadott pH korlátot meghaladó pI értékkel rendelkező komponensek kizárhatóak a gradiensből. Azonban fontos megjegyezni, hogy az amfolit oldatok nem csak az adott pH tartományban lévő amfolitokból állnak. Az adott pH tartományon kívül eső pI értékkel rendelkező amfolitok szintén jelen vannak, ami kismértékű elválasztódást

okoz ezeken a területeken, bár mennyiségük nem pontosan ismert, és valószínűleg fokozatosan csökken. Másodsor, az amfolit komponensek mennyisége a pH gradiens szélein lényegesen alacsonyabb a központi részhez képest, ami gyenge elválasztódást eredményez. Ez a hatás hangsúlyosabb azokban a kísérletekben, ahol pH 7-9 vagy pH 4-6 tartományú amfolitok kerültek alkalmazásra (**4. B ábra**, **5. és 6. ábra**). Az két bázikus fehérje kizárása a pH gradiensből ezekben az esetekben egyértelműen megfigyelhető.

Korábbi tanulmányokban az elektrolit összetételének hatását is vizsgálták szekvenciális injektálási protokollal az IEF-re. [146] A cél az volt, hogy azokat a kísérleti feltételeket azonosítsák, amelyek lehetővé teszik a mintakomponensek számára, hogy elhagyják a pH gradienst, alacsony amfolitkoncentráció mellett vagy amfolitok hiányában. Azok a komponensek, amelyek a pH gradienstől eltérő pI értékkel rendelkeznek, a gradiens szélein fognak vándorolni. Emellett a vándorlásukat befolyásolja a mobilitásuk is, amelyet az izotachoretikus eloszlás határoz meg, végső soron a csúcsok sorrendjének kialakulását eredményezve. [147]

v. Összegzés

Módszerünkkel, melynek során kezeletlen kapillárisban egy gyors fedési eljárás során (15 perces mosás) polibrént alkalmaztunk, sikerült hat különböző szerves savat (tejsav, borostyánkősav, almasav, borkősav, shikiminsav és a citromsav) azonosítani és emellett a szerves savak koncentrációit meghatározni vörösbor mintából. Nyolcvan cm-es kapilláris hossz mellett, háttélektrolitként 50 mM ammónium-acetát puffert ($pH=6,0$) alkalmaztunk, mellyel a legjobb elválasztásokat kaptuk.

PAA bevonatú kapillárisban szekvenciális injektálási protokollt alkalmazva sikerült cIEF során a 4 fehérjét tartalmazó minta (lizozim, pI : 11,35; citokróm c, pI : 10,25; mioglobin, pI : 6,8; β -laktoglobulin A, pI : 5,3) elválasztása. Méréseink során különböző injektálási protokollok mellett különböző amfolit koncentrációkat alkalmaztunk. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kialakuló pH gradiens hossza az injektált amfolit zóna hosszától és a koncentrációjától függ. MS kapcsolás során a mérési idők lerövidültek a porlasztógáz szívó hatása miatt. Szendvics és félszendvics elrendezések esetén is sikeres volt az elválasztás. Rövidebben injektált amfolit zónával is elértünk elválasztást, azonban

a kialakuló amfolit zóna ekkor lerövidült. A minta komponensek pI-jén kívül eső amfolit alkalmazásakor elértük a minta komponensek amfolit zónából való kilépését.

2. A módszerfejlesztésekhez kapcsolódó kihívások és problémák a NACE-ESI-MS/MS kapcsolások során

A NACE ígéretes eredményeket mutatott a foszforilációs izomerek alapvonalis elválasztásában, valamint elfogadható elválasztást az acilációs izomereknél lipid A esetén. Azonban a natív lipid A teljes jellemzése továbbra is jelentős analitikai kihívás marad heterogenitása miatt. A biológiai kivonatokból származó lipid A készítmények, még egyetlen bakteriális törzsből származóak is, rendkívül heterogének. [148-151]

Ez az öröklött mikroheterogenitás a lipid A-ban a bioszintézis hiányos volta vagy a genetikai szabályozás miatt jelentkezhet, amely környezeti változásokra adott válaszként lehetővé teszi a baktériumok túlélését. [152-155] Az utóbbi években növekvő érdeklődés övezi a természetes lipid A variánsok pontos meghatározását, amelyek különböző gyulladáshatóanyag-potenciállal bírnak egy bakteriális mintában. A kisebb molekuláris változások felismerése és azonosítása, valamint azonos molekulatömegű szerkezeti izomerek jelenlétének megértése létfontosságú az ezekkel a molekulákkal szembeni általános immunválaszok megértéséhez.

i. A nemvizes közeg háttérelktrolitjának kiválasztása

NACE kísérletek során a metanol gyakran használt szerves oldószer acetonnitrillel keverve, a viszkozitás csökkentése és a minták látszólagos mobilitásának javítása érdekében. [156] A metanol viszonylag magas viszkozitással rendelkezik (0,55 cP), ami gátolhatja a minták mozgását, de amikor alacsonyabb viszkozitású ACN-nel (0,34 cP) keverik, a viszkozitás csökken. Azonban, ami a lipid A molekulákat illeti, az ACN használata nem megfelelő, mivel ez csökkenti ezeknek az amfifil molekuláknak az oldhatóságát. A bakteriális foszfolipidok oldhatósági követelményeinek kezelésére egy olyan oldószerrendszer került alkalmazásra, amely metanolt kevert diklór-metánnal.

A DCM nem jellemző oldószer a NACE kísérletekben a kis dielektromos állandója ($\epsilon = 8,93$) miatt, de a lipid A elemzésére jó választásnak bizonyult, mert hatékony oldószer a lipid A számára, és viszonylag alacsony viszkozitással rendelkezik (0,41 cP), ami segít a

nemvizes elegy általános viszkozitásának csökkentésében. A DCM arányának hatása a lipid A szerkezeti izomerek elválasztási hatékonyságára már kifejtésre került az értekezésben 42-45 oldalon (**8. Ábra**).

Az elektrolit ionos komponenseinek kiválasztásakor különböző tényezők lettek figyelembe véve, ideértve a sav disszociációs állandót, az illékonyt és az ionizációs hatékonyságot. A fő szempont az volt, hogy elektroforetikus elválasztás történjen egy enyhén lúgos háttélelektrolitban (az ún. látszólagos pH-n nemvizes oldatokban), ezáltal a lipid A foszfát csoportjainak deprotonálódása elő legyen segítve. Figyelembe vettük ezen kívül azt is, hogy a magasabb pH-értékek a lipid A komponensek észterkötéseinek hidrolíziséhez vezethetnek. [157]

Egy korábbi tanulmányban a lipid A CE-MS elválasztásánál részben vizes elektrolitrendszerben, trimetilamin és ecetsav egyenlő moláris mennyiségű elegye került kiválasztásra elektrolit adalékanyagként. Az így létrejövő trietil-amónium-acetát egy illékony só, amely a nemvizes oldószerrel keverve a keletkező háttélelektrolitban kb. pH 8-as látszólagos pH-t tart fenn. Fontos megjegyezni, hogy míg a trimetilamin „memória hatást” okozhat LC-MS rendszerekben, az ammónium-hidroxid használata a trimetilamin helyett nem volt megfelelő, mivel alacsony jelintenzitásokat eredményezett a lipid A esetében. [158]

ii. A NACE-ESI-MS kapcsolás paraméterei triaxiális porlasztást alkalmazva

A lipid A CE-MS elemzése során több paraméter került optimalizálásra annak érdekében, hogy stabil porlasztás és a legnagyobb jelintenzitás kerüljön elérésre minden lipid A ion esetében. Ezek a paraméterek magukban foglalják a kapilláris végének pozícióját, a köpenyfolyadék összetételét és áramlási sebességét, a CE és az ESI feszültségeket, a porlasztógáz áramlási sebességét, a szárító gáz nyomását és hőmérsékletét, valamint a Jet stream köpenygázát.

A jó porlasztás kialakulásának elősegítése érdekében kedvező a kis felületi feszültségű és könnyen elpárologtatható szerves oldószerek használata. [159] Ezen felül az ESI porlasztási stabilitása növelhető egy illékony, semleges só jelenlétével az alap adalékanyagok mellett. [160] Tesztelésre került tiszta metanol, amely trietilamin (TEA) és ecetsav egyenlő moláris koncentrációival lett módosítva. Az elektrolit tartalom

csökkentése a köpenyfolyadékban növelte a jelintenzitásokat, mivel a trietil-amónium-acetát alacsonyabb mennyiségével csökkent az elektropray jel elnyomó hatása. [161] Azonban a legalacsonyabb adaléktartalom használata áramingadozásokhoz vezetett. Ezért az ennél magasabb sókoncentráció (0,06% TEA és 0,02% ecetsav) került kiválasztásra, amely megfelelő áramerősséget biztosított és kb. háromszorosára növelte a jelintenzitásokat. A köpenyfolyadékot 5 µL/perc áramlási sebességgel használtuk a magas detektálási érzékenység érdekében mind az ESI negatív, mind a pozitív ion módjában.

CE-MS kapcsoláskor a szárító gáz által szívóhatás keletkezik (stabil porlasztás elérése érdekében 15 psi nyomásra van szükség) az ESI ionforrásban a kapilláris végénél. [162] Ez a szívóhatás jelentősen befolyásolja a folyadék hidrodinamikai sebességét a kapilláris belsejében. Jelen értekezésben egy platina ESI porlasztótű került alkalmazásra a szokásos rozsdamentes acéltű helyett annak érdekében, hogy a tú korrózióját megakadályozzuk a fordított CE polaritási módban. [163] A platinatű használata azonban jelentős csökkenést eredményezett a CE kapillárisból kilépő oldat áramlási sebességében. Ennek oka lehet a platinatű fizikai méreteiben való enyhe különbség, ami befolyásolhatja a szárítógáz által kialakuló lamináris áramlást. A CE injektálási folyamat során szükség volt a szárító gáz nyomásának jelentős csökkentésére, hogy a szívóhatás miatt ne jusson levegő zóna a kapillárisba az inlet oldalon, ezzel zavarva az áramlást.

iii. Összegzés

A lipid A minták elemzéséhez a S. sonnei esetében az elválasztás közegül szolgáló oldószer tiszta metanol volt, amelyhez 0,36:0,12 térfogatarányban (v/v) TEA:AcOH került hozzáadásra. A mérések rövid (55 cm), kezeletlen kapillárisban és a lehető legmagasabb feszültségkülönbség (30 kV) alkalmazása mellett történtek. Ezenkívül a feszültségkülönbség fenntartása mellett 10 perc után külső nyomást (30 mbar) is alkalmaztunk annak érdekében, hogy a nem-foszforilált vegyületek is elérjék az MS-t. Négy csúcs csoport került megkülönböztetésre a 25 perces elválasztási idő alatt, amelyek a nem foszforilált, C4'-monofoszforilált, C1-monofoszforilált és biszfoszforilált lipid A-t képviselték.

A metanol fokozatos cseréje DCM-ra jelentős hatással volt a tetra-acilációs izomerek szétválasztására, különösen akkor, ha a DCM koncentrációja meghaladta a háttélelektrolitban a 40%-ot. A polaritás váltás különösen hasznos volt azoknak a komponenseknek a detektálására, amelyek vagy a minta zóna kezdeténél, vagy a végénél vándoroltak. Azonban fordított polaritás esetén konstans 3 mbar külső nyomás alkalmazása is szükséges volt. Összeségében, ha a különböző foszforiláltóságú komponensek elválasztása a cél, akkor a háttélelektrolit DCM tartalmának a csökkentése szükséges. Azonban az acilációs izomerek elválasztásához a háttélelektrolit DCM tartalmának növelése szükséges fordított polaritás alkalmazása mellett.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Három különböző CE-ESI-MS módszer került kidolgozásra biológiailag fontos minták elválasztására, melynek során sikerült a tömegspektrometriás detektálás előnyeit összekapcsolni az elektroforetikus elválasztások hatékonyságával. Vizes közegben optimalizáltuk a szerves savak és fehérjék elválasztásának körülményeit, majd a nem vízoldható lipid A komponensekre egy nem vizes közegű elválasztást dolgoztunk ki.

Először bemutattuk a borok minőségi jellemzésére használható 6 féle szerves sav: a tejsav, a borostyánkősav, az almasav, a borkősav, a shikiminsav és a citromsav elválasztását bormintában. A kísérletek során vizsgálatra került az ammónium-acetát és az ammónium-formiát, mint háttélektrolit, változtattuk az ammónium-acetát ionerősségét, pH-ját, a kapilláris hosszát és az alkalmazott potenciálkülönbséget.

A fehérjék (lizozim, citokróm c, mioglobin, β -laktoglobulin A) elválasztását szintén vizes közegben, szekvenciális injektálási protokoll segítségével izoelektromos fókuszálással és MS detektálással valósítottunk meg. Kísérleteink során változtattuk a különböző pH tartományú amfolit fajtákat és koncentrációikat, „szendvics” és „félszendvics” injektálási típusokat, valamint az injektált zónák hosszát.

A *S. sonnei*-ből izolált bakteriális foszfolipidok elválasztása nemvizes közegben történt NACE-ESI-MS segítségével. A mérések során négy csúcs csoport került megkülönböztetésre a 25 perces elválasztási idő alatt, amelyek a nem-, C4'-monofoszforilált, C1-monofoszforilált és biszfoszforilált lipid A-t képviselték. Változtatásra került a háttélektrolit oldat oldószer-összetétele és koncentrációja abból a célból, hogy mit okoz a kiválasztott lipid A komponensek migrációs idejében, elválasztási hatékonyságában és a felbontásban. A metanol fokozatos cseréje DCM-ra jelentős hatással volt a tetra-acilációs izomerek kritikus párjainak szétválasztására. A TEA és AcOH elektrolit adalékok mól- és térfogatarányainak változtatását is tanulmányoztuk mind normál, mind fordított CE polaritási módban. Végül MS/MS fragmentációs mérésekkel meghatároztuk a Lipid A komponensek foszforilációs helyeit és az aciláltsági profilját.

IX. MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

- Violeta Ivanova-Petropulos, Zaneta Naceva, Viktor Sándor, Lilla Makszin, Laura Nagy, **Balázs Berkics**, Trajce Stafilov, Ferenc Kilár, Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS, ELECTROPHORESIS, 2018, 39(13), pp. 1597-1605 <https://doi.org/10.1002/elps.201700492>
- Csilla Páger, Nikoleta Biherczová, Roland Ligetvári, **Balázs Viktor Berkics**, Tamás Pongrácz, Viktor Sándor, Anita Bufa, Viktória Poór, Andrea Vojs Staňová, Ferenc Kilár, Advanced online mass spectrometry detection of proteins separated by capillary isoelectric focusing after sequential injection, JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, 2017, 40(24), pp. 4825-4834, <https://doi.org/10.1002/jssc.201700695>
- Viktor Sándor*, **Balázs Viktor Berkics***, Anikó Kilár, Béla Kocsis, Ferenc Kilár, Ágnes Dörnyei, NACE–ESI-MS/MS method for separation and characterization of phosphorylation and acylation isomers of lipid A, ELECTROPHORESIS, 2020, 41(13-14), pp. 1178-1188, <https://doi.org/10.1002/elps.201900251>

* **Megosztott első szerzőség Dr. Sándor Viktorral**

2. Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

- **Berkics Balázs Viktor**; Pongrácz Tamás; Poór Viktória; Sándor Viktor; Csóka Balázs; Fenyvesiné Páger Csilla; Kilár Ferenc, Nitrofenol festékek és fehérjék elválasztása kapilláris izoelektromos fókuszálással, izoelektromos fókuszálás kapcsolása tömegspektrométerrel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2014, Egerszalók, Magyarország 2014.10.12. - 2014.10.14.
- Fenyvesiné Páger Csilla; Biherczova Nikoleta ; Ligetvári Roland; **Berkics Balázs Viktor**; Sándor Viktor; Kilár Ferenc, Kapilláris izoelektromos fókuszálás alkalmazása tömegspektrometriás detektálással fehérjekeverék elválasztására, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016, Kecskemét, Magyarország 2016.11.09. - 2016.11.11.

- Violeta Ivanova - Petropulos ; Zaneta Naceva ; Viktor Sándor; **Balázs Berkics**; Trajce Stafilov; Ferenc Kilár, Determination of Organic Acids in Wines Using Capillary Zone Electrophoresis - Electrospray Ionization / Quadrupole - Time - of - Flight - Mass Spectrometry (CZE - ESI/QTOF - MS), 16th CEEPUS Symposium and Summer School on Bioanalysis, Warsaw, Lengyelország 2016.07.06. - 2016.07.15.
- Sándor Viktor; Kilár Anikó; **Berkics Balázs**; Kocsis Béla; Kilár Ferenc;; Dörnyei Ágnes, Comparison of LC-MS and CE MS for the analysis of immunostimulant bacterial membrane glycolipids, 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Magyarország 2019.09.11. - 2019.09.13.

X. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] S. Hjertén, Free zone electrophoresis, *Chromatographic Reviews* 9(2) (1967) 122-219. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-5907\(67\)80003-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-5907(67)80003-6).
- [2] C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, Chapter 4 - Capillary electrophoresis-mass spectrometry: History, general principles, theoretical aspects, and state-of-the-art applications, in: P.Q. Tranchida, L. Mondello (Eds.), *Hyphenations of Capillary Chromatography with Mass Spectrometry*, Elsevier2020, pp. 413-447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809638-3.00011-9>.
- [3] R. Weinberger, Nonaqueous capillary electrophoresis, *American Laboratory* 38 (2006) 49-50.
- [4] W. Zhou, B. Zhang, Y. Liu, C. Wang, W. Sun, W. Li, Z. Chen, Advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry for cell analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 117 (2019) 316-330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.011>.
- [5] Q. Chen, J. Zhang, W. Zhang, Z. Chen, Analysis of active alkaloids in the Menispermaceae family by nonaqueous capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry, *Journal of Separation Science* 36(2) (2013) 341-349. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200678>.
- [6] Z. Takáts, J.M. Wiseman, B. Gologan, R.G. Cooks, Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization, *Science* 306(5695) (2004) 471-3. <https://doi.org/10.1126/science.1104404>.
- [7] X. Tang, J. Liu, W. Dong, P. Li, L. Li, C. Lin, Y. Zheng, J. Hou, D. Li, The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 (2013) 820695. <https://doi.org/10.1155/2013/820695>.
- [8] A. Robles, M. Fabjanowicz, T. Chmiel, J. Płotka-Wasyłka, Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 120 (2019) 115630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>.
- [9] A. Castiñeira, R.M. Peña, C. Herrero, S. García-Martín, Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection, *Journal of Food Composition and Analysis* 15(3) (2002) 319-331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1056>.
- [10] V.I. Esteves, S.S.F. Lima, D.L.D. Lima, A.C. Duarte, Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine, *Analytica Chimica Acta* 513(1) (2004) 163-167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.036>.
- [11] R.G. Peres, E.P. Moraes, G.A. Micke, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya, Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *Food Control* 20(6) (2009) 548-552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.004>.
- [12] I. Mato, S. Suárez-Luque, J.F. Huidobro, Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection, *Food Chemistry* 102(1) (2007) 104-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.002>.
- [13] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Handbook of Enology, Handbook of Enology* 2 (2006) 1-441. <https://doi.org/10.1002/0470010398>.
- [14] C. Mardones, A. Hitschfeld, A. Contreras, K. Lepe, L. Gutiérrez, D. von Baer, Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines, *Journal of Chromatography A* 1085(2) (2005) 285-292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.022>.
- [15] M. Daglia, A. Papetti, P. Grisoli, C. Aceti, C. Dacarro, G. Gazzani, Antibacterial Activity of Red and White Wine against Oral Streptococci, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13) (2007) 5038-5042. <https://doi.org/10.1021/jf070352q>.
- [16] A.V.S. Perumalla, N.S. Hettiarachchy, Green tea and grape seed extracts — Potential applications in food safety and quality, *Food Research International* 44(4) (2011) 827-839. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.022>.

- [17] D. Tusseau, C. Benoit, Routine high-performance liquid chromatographic determination of carboxylic acids in wines and champagne, *Journal of Chromatography A* 395 (1987) 323-333. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94121-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94121-4).
- [18] A. Schneider, V. Gerbi, M. Redoglia, A Rapid HPLC Method for Separation and Determination of Major Organic Acids in Grape Musts and Wines, *American Journal of Enology and Viticulture* 38(2) (1987) 151.
- [19] J.-M. Park, J.-A. Shin, J.H. Lee, K.-T. Lee, Development of a quantitative method for organic acid in wine and beer using high performance liquid chromatography, *Food science and biotechnology* 26(2) (2017) 349-355. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0047-9>.
- [20] A. Escobal, J. Gonzalez, C. Iriondo, C. Laborra, Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bizkaia, *Food Chemistry* 58(4) (1997) 381-384. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00032-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00032-5).
- [21] E.F. López, E.F. Gómez, Simultaneous Determination of the Major Organic Acids, Sugars, Glycerol, and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wines, *Journal of Chromatographic Science* 34(5) (1996) 254-257. <https://doi.org/10.1093/chromsci/34.5.254>.
- [22] Z. Yan, Z. Xingde, N. Weijun, Simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in beer and wine by ion chromatography, *Microchimica Acta* 127(3) (1997) 189-194. <https://doi.org/10.1007/BF01242721>.
- [23] S.-I. Ohira, K. Kuhara, A. Shigetomi, T. Yamasaki, Y. Kodama, P.K. Dasgupta, K. Toda, On-line electro-dialytic matrix isolation for chromatographic determination of organic acids in wine, *Journal of Chromatography A* 1372 (2014) 18-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.077>.
- [24] A. Castiñeira, R.M. Peña, C. Herrero, S. García-Martín, Simultaneous Determination of Organic Acids in Wine Samples by Capillary Electrophoresis and UV Detection: Optimization with Five Different Background Electrolytes, *Journal of High Resolution Chromatography* 23(11) (2000) 647-652. [https://doi.org/10.1002/1521-4168\(20001101\)23:11<647::AID-JHRC647>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4168(20001101)23:11<647::AID-JHRC647>3.0.CO;2-Z).
- [25] L. Saavedra, C. Barbas, Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines, *ELECTROPHORESIS* 24(12-13) (2003) 2235-2243. <https://doi.org/10.1002/elps.200305415>.
- [26] I. Mato, S. Suárez-Luque, J.F. Huidobro, A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines, *Food Research International* 38(10) (2005) 1175-1188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>.
- [27] F.J.V. Gomez, R.P. Monasterio, V.C.S. Vargas, M.F. Silva, Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS* 33(15) (2012) 2240-2252. <https://doi.org/10.1002/elps.201100595>.
- [28] C.W. Klampfl, Determination of organic acids by CE and CEC methods, *ELECTROPHORESIS* 28(19) (2007) 3362-3378. <https://doi.org/10.1002/elps.200700159>.
- [29] M. Castro-Puyana, V. García-Cañas, C. Simó, A. Cifuentes, Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *ELECTROPHORESIS* 33(1) (2012) 147-167. <https://doi.org/10.1002/elps.201100385>.
- [30] V. García-Cañas, C. Simó, M. Castro-Puyana, A. Cifuentes, Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *ELECTROPHORESIS* 35(1) (2014) 147-169. <https://doi.org/10.1002/elps.201300315>.
- [31] T. Acunha, C. Ibáñez, V. García-Cañas, C. Simó, A. Cifuentes, Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *ELECTROPHORESIS* 37(1) (2016) 111-141. <https://doi.org/10.1002/elps.201500291>.
- [32] G. Álvarez, L. Montero, L. Llorens, M. Castro-Puyana, A. Cifuentes, Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics, *ELECTROPHORESIS* 39(1) (2018) 136-159. <https://doi.org/10.1002/elps.201700321>.
- [33] T. Acunha, C. Simó, C. Ibáñez, A. Gallardo, A. Cifuentes, Anionic metabolite profiling by capillary electrophoresis–mass spectrometry using a noncovalent polymeric coating. *Orange*

- juice and wine as case studies, *Journal of Chromatography A* 1428 (2016) 326-335. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.001>.
- [34] A. Stolz, K. Jooß, O. Höcker, J. Römer, J. Schlecht, C. Neusüß, Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications, *ELECTROPHORESIS* 40(1) (2019) 79-112. <https://doi.org/10.1002/elps.201800331>.
- [35] A. Týčová, V. Ledvina, K. Klepárník, Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications, *ELECTROPHORESIS* 38(1) (2017) 115-134. <https://doi.org/10.1002/elps.201600366>.
- [36] S. Hjertén, M.-d. Zhu, Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *Journal of Chromatography A* 346 (1985) 265-270. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90512-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90512-0).
- [37] J. Hühner, M. Lämmerhofer, C. Neusüß, Capillary isoelectric focusing-mass spectrometry: Coupling strategies and applications, *ELECTROPHORESIS* 36(21-22) (2015) 2670-2686. <https://doi.org/10.1002/elps.201500185>.
- [38] Y. Shen, S.J. Berger, G.A. Anderson, R.D. Smith, High-Efficiency Capillary Isoelectric Focusing of Peptides, *Analytical Chemistry* 72(9) (2000) 2154-2159. <https://doi.org/10.1021/ac991367t>.
- [39] F. Kilár, Á. Végvári, A. Mód, New set-up for capillary isoelectric focusing in uncoated capillaries 1 Paper presented at the 10th International Symposium on High-Performance Capillary Electrophoresis, Kyoto, 8–11 July 1997.1, *Journal of Chromatography A* 813(2) (1998) 349-360. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00377-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00377-X).
- [40] C. Páger, Á. Dörnyei, F. Kilár, Sequential injection setup for capillary isoelectric focusing combined with MS detection, *ELECTROPHORESIS* 32(14) (2011) 1875-1884. <https://doi.org/10.1002/elps.201100012>.
- [41] A. Takácsi-Nagy, F. Kilár, C. Páger, R.A. Mosher, W. Thormann, Sampling strategies for capillary isoelectric focusing with electroosmotic zone mobilization assessed by high-resolution dynamic computer simulation, *ELECTROPHORESIS* 33(6) (2012) 970-980. <https://doi.org/10.1002/elps.201100525>.
- [42] W. Thormann, F. Kilár, High-resolution dynamic computer simulation analysis of the behavior of sample components with pI values outside the pH gradient established by carrier ampholyte CIEF, *ELECTROPHORESIS* 34(5) (2013) 716-724. <https://doi.org/10.1002/elps.201200499>.
- [43] L. Hajba, A. Guttman, Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 90 (2017) 38-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.02.013>.
- [44] R.M. McCormick, Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries, *Analytical Chemistry* 60(21) (1988) 2322-2328. <https://doi.org/10.1021/ac00172a003>.
- [45] J.S. Green, J.W. Jorgenson, Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali metal salts to the buffers, *Journal of Chromatography A* 478 (1989) 63-70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9673\(89\)90006-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9673(89)90006-X).
- [46] D. Corradini, L. Bevilacqua, I. Nicoletti, Separation of basic proteins in bare fused-silica capillaries with diethylentriamine phosphate buffer as the background electrolyte solution, *Chromatographia* 62(SUPPL. 13) (2005) S43-S50. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0579-7>.
- [47] H. Stutz, Protein attachment onto silica surfaces - A survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE, *Electrophoresis* 30(12) (2009) 2032-2061. <https://doi.org/10.1002/elps.200900015>.
- [48] C.A. Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 1184(1-2) (2008) 81-105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>.
- [49] V. Dolník, Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007, *Electrophoresis* 29(1) (2008) 143-156. <https://doi.org/10.1002/elps.200700584>.

- [50] V. Dolník, Capillary electrophoresis of proteins 2003-2005, *Electrophoresis* 27(1) (2006) 126-141. <https://doi.org/10.1002/elps.200500567>.
- [51] E.A.S. Doherty, R.J. Meagher, M.N. Albarghouthi, A.E. Barron, Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis, *Electrophoresis* 24(1-2) (2003) 34-54. <https://doi.org/10.1002/elps.200390029>.
- [52] J. Zhang, C. Horváth, Capillary electrophoresis of proteins in dextran-coated columns, *Electrophoresis* 24(1-2) (2003) 115-120. <https://doi.org/10.1002/elps.200390002>.
- [53] H. Liu, R. Shi, W. Wan, R. Yang, Y. Wang, A well-defined diblock copolymer of poly-(ethylene oxide)-block-poly (4-vinylpyridine) for separation of basic proteins by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 29(13) (2008) 2812-2819. <https://doi.org/10.1002/elps.200700691>.
- [54] A.J. Wang, J. Witos, L. D'Ulivo, K. Vainikka, M.L. Riekkola, Noncovalent poly(1-vinylpyrrolidone)-based copolymer coating for the separation of basic proteins and lipoproteins by CE, *Electrophoresis* 30(22) (2009) 3939-3946. <https://doi.org/10.1002/elps.200900395>.
- [55] K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Nakajima, T. Toyo'oka, K. Imai, N. Utsunomiya-Tate, Cationic starch derivatives as dynamic coating additives for protein analysis in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2006, pp. 127-132.
- [56] M. Kato, E. Imamura, K. Sakai-Kato, T. Nakajima, T. Toyo'oka, Cationic amylopectin derivatives as additives for analysis of proteins in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 27(10) (2006) 1895-1899. <https://doi.org/10.1002/elps.200500429>.
- [57] Y. He, N.A. Lacher, W. Hou, Q. Wang, C. Isele, J. Starkey, M. Ruesch, Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column, *Analytical Chemistry* 82(8) (2010) 3222-3230. <https://doi.org/10.1021/ac9028856>.
- [58] P.G. Righetti, C. Gelfi, B. Verzola, L. Castelletti, The state of the art of dynamic coatings, *Electrophoresis* 22(4) (2001) 603-611. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200102\)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200102)22:4<603::AID-ELPS603>3.0.CO;2-N).
- [59] J. Znalezniona, J. Petr, R. Knob, V. Maier, J. Ševčík, Dynamic coating agents in CE, *Chromatographia*, 2008, pp. S5-S12.
- [60] P. Sun, D.W. Armstrong, Ionic liquids in analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta* 661(1) (2010) 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.007>.
- [61] J.S. Creamer, N.J. Oborny, S.M. Lunte, Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis, *Analytical Methods* 6(15) (2014) 5427-5449. <https://doi.org/10.1039/c4ay00447g>.
- [62] C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhrer, G.W. Somsen, Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(1) (2010) 297-314. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3193-y>.
- [63] C.Y. Liu, Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 22(4) (2001) 612-628. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200102\)22:4<612::AID-ELPS612>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200102)22:4<612::AID-ELPS612>3.0.CO;2-N).
- [64] C.S. Robb, Applications of physically adsorbed polymer coatings in capillary electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 30(5-7) (2007) 729-759. <https://doi.org/10.1080/10826070701191029>.
- [65] B. Beutler, E.T. Rietschel, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nature Reviews Immunology* 3(2) (2003) 169-176. <https://doi.org/10.1038/nri1004>.
- [66] E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.D. Grimmecke, S. Kusumoto, et al., The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity, *Immunobiology* 187(3-5) (1993) 169-90. [https://doi.org/10.1016/s0171-2985\(11\)80338-4](https://doi.org/10.1016/s0171-2985(11)80338-4).
- [67] U. Zähringer, B. Lindner, Y.A. Knirel, W.M. van den Akker, R. Hiestand, H. Heine, C. Dehio, Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T, *J Biol Chem* 279(20) (2004) 21046-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313370200>.

- [68] S. Munford Robert, Sensing Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides: a Human Disease Determinant?, *Infection and Immunity* 76(2) (2008) 454-465. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-07>.
- [69] A. Molinaro, O. Holst, F. Di Lorenzo, M. Callaghan, A. Nurisso, G. D'Errico, A. Zamyatina, F. Peri, R. Berisio, R. Jerala, J. Jiménez-Barbero, A. Silipo, S. Martín-Santamaría, Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity, *Chemistry* 21(2) (2015) 500-19. <https://doi.org/10.1002/chem.201403923>.
- [70] B.S. Park, D.H. Song, H.M. Kim, B.S. Choi, H. Lee, J.O. Lee, The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature* 458(7242) (2009) 1191-5. <https://doi.org/10.1038/nature07830>.
- [71] C. Alexander, U. Zaehring, Chemical Structure of Lipid A-The Primary Immunomodulatory Center of Bacterial Lipopolysaccharides, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 14 (2002) 69-86. <https://doi.org/10.4052/tigg.14.69>.
- [72] R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity, *Nature Reviews Immunology* 1(2) (2001) 135-145. <https://doi.org/10.1038/35100529>.
- [73] A.J. Ulmer, E. Rietschel, U. Zaehring, H. Heine, Lipopolysaccharide: Structure, Bioactivity, Receptors, and Signal Transduction, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 14 (2002) 53-68. <https://doi.org/10.4052/tigg.14.53>.
- [74] O. Holst, A.J. Ulmer, H. Brade, H.-D. Flad, E.T. Rietschel, Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 16(2) (1996) 83-104. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00126.x>.
- [75] M. Liu, C.M. John, G.A. Jarvis, Phosphoryl moieties of lipid A from *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae* lipooligosaccharides play an important role in activation of both MyD88- and TRIF-dependent TLR4-MD-2 signaling pathways, *J Immunol* 185(11) (2010) 6974-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000953>.
- [76] C.M. John, M. Liu, G.A. Jarvis, Natural Phosphoryl and Acyl Variants of Lipid A from *Neisseria meningitidis* Strain 89I Differentially Induce Tumor Necrosis Factor- α in Human Monocytes, *Journal of Biological Chemistry* 284(32) (2009) 21515-21525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004887>.
- [77] M.S. Trent, C.M. Stead, A.X. Tran, J.V. Hankins, Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis, *J Endotoxin Res* 12(4) (2006) 205-23. <https://doi.org/10.1179/096805106x118825>.
- [78] C. Alexander, E.T. Rietschel, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J Endotoxin Res* 7(3) (2001) 167-202.
- [79] S.R. Coats, J.W. Jones, C.T. Do, P.H. Braham, B.W. Bainbridge, T.T. To, D.R. Goodlett, R.K. Ernst, R.P. Darveau, Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities, *Cell Microbiol* 11(11) (2009) 1587-99. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01349.x>.
- [80] R. Coats Stephen, B. Berezow Alex, T. To Thao, S. Jain, W. Bainbridge Brian, P. Banani Karim, P. Darveau Richard, The Lipid A Phosphate Position Determines Differential Host Toll-Like Receptor 4 Responses to Phylogenetically Related Symbiotic and Pathogenic Bacteria, *Infection and Immunity* 79(1) (2011) 203-210. <https://doi.org/10.1128/IAI.00937-10>.
- [81] H. Loppnow, H. Brade, I. Dürrbaum, C.A. Dinarello, S. Kusumoto, E.T. Rietschel, H.D. Flad, IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures, *The Journal of Immunology* 142(9) (1989) 3229-3238. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.142.9.3229>.
- [82] E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova, et al., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *Faseb j* 8(2) (1994) 217-25. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119492>.
- [83] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, I.R. Poxton, Structure and function of lipopolysaccharides, *Microbes Infect* 4(8) (2002) 837-51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01604-0).

- [84] F. Peri, V. Calabrese, Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update, *J Med Chem* 57(9) (2014) 3612-22. <https://doi.org/10.1021/jm401006s>.
- [85] C.R. Casella, T.C. Mitchell, Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant, *Cell Mol Life Sci* 65(20) (2008) 3231-40. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8228-6>.
- [86] B.D. Needham, S.M. Carroll, D.K. Giles, G. Georgiou, M. Whiteley, M.S. Trent, Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(4) (2013) 1464-1469. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218080110>.
- [87] Y. Han, Y. Li, J. Chen, Y. Tan, F. Guan, X. Wang, Construction of monophosphoryl lipid A producing *Escherichia coli* mutants and comparison of immuno-stimulatory activities of their lipopolysaccharides, *Mar Drugs* 11(2) (2013) 363-76. <https://doi.org/10.3390/md11020363>.
- [88] A. Kilár, Á. Dörnyei, B. Kocsis, Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on- and off-line separation techniques, *Mass Spectrometry Reviews* 32(2) (2013) 90-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mas.21352>.
- [89] J.H. Banoub, A.E. Aneed, A.M. Cohen, N. Joly, Structural investigation of bacterial lipopolysaccharides by mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* 29(4) (2010) 606-650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mas.20258>.
- [90] M.M. Corsaro, F.D. Piaz, R. Lanzetta, M. Parrilli, Lipid A structure of *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125: use of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of fatty acid distribution, *J Mass Spectrom* 37(5) (2002) 481-8. <https://doi.org/10.1002/jms.304>.
- [91] A. Kussak, A. Weintraub, Quadrupole ion-trap mass spectrometry to locate fatty acids on lipid A from Gram-negative bacteria, *Anal Biochem* 307(1) (2002) 131-7. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00004-0).
- [92] I. Mikhail, H.H. Yildirim, E.C. Lindahl, E.K. Schweda, Structural characterization of lipid A from nontypeable and type f *Haemophilus influenzae*: variability of fatty acid substitution, *Anal Biochem* 340(2) (2005) 303-16. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.02.020>.
- [93] Z. Wang, J. Li, E. Altman, Structural characterization of the lipid A region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide, *Carbohydr Res* 341(17) (2006) 2816-25. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.09.020>.
- [94] B. Schilling, M.K. McLendon, N.J. Phillips, M.A. Apicella, B.W. Gibson, Characterization of lipid A acylation patterns in *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, and *Francisella philomiragia* using multiple-stage mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization on an intermediate vacuum source linear ion trap, *Anal Chem* 79(3) (2007) 1034-42. <https://doi.org/10.1021/ac061654e>.
- [95] J.W. Jones, S.A. Shaffer, R.K. Ernst, D.R. Goodlett, F. Turecek, Determination of pyrophosphorylated forms of lipid A in Gram-negative bacteria using a multivariate mass spectrometric approach, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35) (2008) 12742-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800445105>.
- [96] Y.S. Ting, S.A. Shaffer, J.W. Jones, W.V. Ng, R.K. Ernst, D.R. Goodlett, Automated lipid A structure assignment from hierarchical tandem mass spectrometry data, *J Am Soc Mass Spectrom* 22(5) (2011) 856-66. <https://doi.org/10.1007/s13361-010-0055-y>.
- [97] L.J. Morrison, W.R. Parker, D.D. Holden, J.C. Henderson, J.M. Boll, M.S. Trent, J.S. Brodbelt, UVliPiD: A UVPD-Based Hierarchical Approach for De Novo Characterization of Lipid A Structures, *Anal Chem* 88(3) (2016) 1812-20. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04098>.
- [98] N. Qureshi, K. Takayama, D. Heller, C. Fenselau, Position of ester groups in the lipid A backbone of lipopolysaccharides obtained from *Salmonella typhimurium*, *J Biol Chem* 258(21) (1983) 12947-51.
- [99] J.C. Henderson, J.P. O'Brien, J.S. Brodbelt, M.S. Trent, Isolation and chemical characterization of lipid A from gram-negative bacteria, *J Vis Exp* (79) (2013) e50623. <https://doi.org/10.3791/50623>.

- [100] H. Therisod, V. Labas, M. Caroff, Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry, *Anal Chem* 73(16) (2001) 3804-7. <https://doi.org/10.1021/ac010313s>.
- [101] K. Vorauer-Uhl, D. Jeschek, G. Lhota, A. Wagner, S. Strobach, H. Katinger, Simultaneous Quantification of Complex Phospholipid Compositions Containing Monophosphoryl Lipid-A by RP-HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*® 32 (2009) 2203-2215. <https://doi.org/10.1080/10826070903163180>.
- [102] S. Ittig, B. Lindner, M. Stenta, P. Manfredi, E. Zdorovenko, Y.A. Knirel, M. dal Peraro, G.R. Cornelis, U. Zähringer, The lipopolysaccharide from *Campylobacter jejuni* reveals an unexpected role of the core-oligosaccharide in MD-2 binding, *PLoS Pathog* 8(5) (2012) e1002667. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002667>.
- [103] S. Bobbala, A. McDowell, S. Hook, Quantitation of the immunological adjuvants, monophosphoryl lipid A and Quil A in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 975 (2015) 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.006>.
- [104] K. Vékey, Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography, *J Chromatogr A* 921(2) (2001) 227-36. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00825-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00825-1).
- [105] S. Hamdy, A. Haddadi, V. Somayaji, D. Ruan, J. Samuel, Pharmaceutical analysis of synthetic lipid A-based vaccine adjuvants in poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle formulations, *J Pharm Biomed Anal* 44(4) (2007) 914-23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.010>.
- [106] J.P. O'Brien, B.D. Needham, J.C. Henderson, E.M. Nowicki, M.S. Trent, J.S. Brodbelt, 193 nm ultraviolet photodissociation mass spectrometry for the structural elucidation of lipid A compounds in complex mixtures, *Anal Chem* 86(4) (2014) 2138-45. <https://doi.org/10.1021/ac403796n>.
- [107] G. Hübner, B. Lindner, Separation of R-form lipopolysaccharide and lipid A by CE–Fourier-transform ion cyclotron resonance MS, *ELECTROPHORESIS* 30(10) (2009) 1808-1816. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200800754>.
- [108] A. Varga, S. Nilsson, Nonaqueous capillary electrophoresis for analysis of the ethanol consumption biomarker phosphatidylethanol, *Electrophoresis* 29(8) (2008) 1667-71. <https://doi.org/10.1002/elps.200700548>.
- [109] M. Jussila, S. Palonen, S.P. Porras, M.L. Riekkola, Compensation of the siphoning effect in nonaqueous capillary electrophoresis by vial lifting, *Electrophoresis* 21(3) (2000) 586-92. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2683\(20000201\)21:3<586::aid-elps586>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2683(20000201)21:3<586::aid-elps586>3.0.co;2-m).
- [110] G.K. Scriba, Nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1159(1-2) (2007) 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.005>.
- [111] H. Teng, B.-Q. Yuan, T.-Y. You, Recent Advances in Application of Nonaqueous Capillary Electrophoresis, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 38(11) (2010) 1670-1677. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(09\)60078-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1872-2040(09)60078-5).
- [112] E. Kenndler, A critical overview of non-aqueous capillary electrophoresis. Part I: mobility and separation selectivity, *J Chromatogr A* 1335 (2014) 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.010>.
- [113] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, J.W. Gorrod, S. Naylor, Investigation of the in vitro metabolism of the H2-antagonist mifentidine by on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using non-aqueous separation conditions, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 657(2) (1994) 373-381. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00142-1](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00142-1).
- [114] Q. Yang, L.M. Benson, K. L. Johnson, S. Naylor, Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: On-line-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 38(2) (1999) 103-121. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(98\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(98)00032-3).

- [115] A.M. Gómez-Caravaca, A. Carrasco-Pancorbo, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, NACE-ESI-TOF MS to reveal phenolic compounds from olive oil: Introducing enriched olive oil directly inside capillary, *Electrophoresis* 30(17) (2009) 3099-3109. <https://doi.org/10.1002/elps.200800798>.
- [116] S. Naylor, A.J. Tomlinson, L.M. Benson, J.W. Gorrod, Capillary electrophoresis and Capillary Electrophoresis-mass spectrometry in drug and metabolite analysis, *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19(3) (1994) 235-240. <https://doi.org/10.1007/BF03188926>.
- [117] L. Geiser, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, Potential of formamide and N-methylformamide in nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry: Application to the analysis of β -blockers, *Journal of Chromatography A*, 2002, pp. 389-398.
- [118] F. Steiner, M. Hassel, Influence of solvent properties on separation and detection performance in non-aqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry of basic analytes, *Journal of Chromatography A* 1068(1) (2005) 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.043>.
- [119] V. Kašička, Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides, *Electrophoresis* 24(22-23) (2003) 4013-4046. <https://doi.org/10.1002/elps.200305660>.
- [120] V. Kašička, Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides, *Electrophoresis* 27(1) (2006) 142-175. <https://doi.org/10.1002/elps.200500527>.
- [121] M. Unger, M. Dreyer, S. Specker, S. Laug, M. Pelzing, C. Neusüß, U. Holzgrabe, G. Bringmann, Analytical characterisation of crude extracts from an african *Ancistrocladus* species using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled to ion trap mass spectrometry, *Phytochemical Analysis* 15(1) (2004) 21-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.737>.
- [122] C. Huhn, C. Neusüß, M. Pelzing, U. Pyell, J. Mannhardt, M. Pütz, Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: A case study, *Electrophoresis* 26(7-8) (2005) 1389-1397. <https://doi.org/10.1002/elps.200410163>.
- [123] K. Raith, R. Wolf, J. Wagner, R.H.H. Neubert, Separation of phospholipids by nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1998, pp. 185-188.
- [124] W. Otto, L. Otto, B. Fritz, Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser, *Zeitschrift für Naturforschung B* 7(3) (1952) 148-155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/znb-1952-0303>.
- [125] H. Sawada, C. Nogami, Capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry using uncoated fused-silica capillaries and alkaline buffer solution for the analysis of small carboxylic acids, *Analytica Chimica Acta* 507(2) (2004) 191-198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.047>.
- [126] J. Regueiro, A. Vallverdú-Queralt, J. Simal-Gándara, R. Estruch, R. Lamuela-Raventós, Development of a LC–ESI-MS/MS Approach for the Rapid Quantification of Main Wine Organic Acids in Human Urine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(27) (2013) 6763-6768. <https://doi.org/10.1021/jf401839g>.
- [127] F. Kilár, S. Hjertén, Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high performance isoelectric focusing in capillaries, *ELECTROPHORESIS* 10(1) (1989) 23-29. <https://doi.org/10.1002/elps.1150100107>.
- [128] V. Sándor, Á. Dörnyei, L. Makszin, F. Kilár, Z. Péterfi, B. Kocsis, A. Kilár, Characterization of complex, heterogeneous lipid A samples using HPLC–MS/MS technique I. Overall analysis with respect to acylation, phosphorylation and isobaric distribution, *Journal of Mass Spectrometry* 51(11) (2016) 1043-1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.3839>.
- [129] V. Sándor, A. Kilár, F. Kilár, B. Kocsis, Á. Dörnyei, Characterization of complex, heterogeneous lipid A samples using HPLC-MS/MS technique III. Positive-ion mode tandem mass

- spectrometry to reveal phosphorylation and acylation patterns of lipid A, *Journal of Mass Spectrometry* 53(2) (2018) 146-161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.4046>.
- [130] G. Madalinski, F. Fournier, F.-L. Wind, C. Afonso, J.-C. Tabet, Gram-negative bacterial lipid A analysis by negative electrospray ion trap mass spectrometry: Stepwise dissociations of deprotonated species under low energy CID conditions, *International Journal of Mass Spectrometry* 249-250 (2006) 77-92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.12.049>.
- [131] A. Kilár, Á. Dörnyei, V. Sándor, F. Kilár, B. Kocsis, Phosphoglycolipid profiling of bacterial endotoxins, *Hung. J. Ind. Chem* 46 (2018) 7-11.
- [132] H. Sawada, C. Nogami, Capillary electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry using uncoated fused-silica capillaries and alkaline buffer solution for the analysis of small carboxylic acids, *Analytica Chimica Acta* 507 (2004) 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.047>.
- [133] B. Li, L. Yongku, X. Wang, F. Wang, X. Wang, Y. Wang, X. Meng, Simultaneous separation and determination of organic acids in blueberry juices by capillary electrophoresis- electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of food science and technology* 52(8) (2015) 5228-5235. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1611-4>.
- [134] L. Pei, C.A. Lucy, Insight into the stability of poly(diallyldimethylammoniumchloride) and polybrene poly cationic coatings in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 1365 (2014) 226-233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.013>.
- [135] J. Hühner, K. Jooß, C. Neusüß, Interference-free mass spectrometric detection of capillary isoelectric focused proteins, including charge variants of a model monoclonal antibody, *Electrophoresis* 38(6) (2017) 914-921. <https://doi.org/10.1002/elps.201600457>.
- [136] Y. Kuroda, H. Yukinaga, M. Kitano, T. Noguchi, M. Nemati, A. Shibukawa, T. Nakagawa, K. Matsuzaki, On-line capillary isoelectric focusing–mass spectrometry for quantitative analysis of peptides and proteins, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37(3) (2005) 423-428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.11.025>.
- [137] H.F. Storms, R. van der Heijden, U.R. Tjaden, J. van der Greef, Capillary isoelectric focusing–mass spectrometry for shotgun approach in proteomics, *Electrophoresis* 25(20) (2004) 3461-7. <https://doi.org/10.1002/elps.200406087>.
- [138] N.J. Clarke, S. Naylor, Capillary isoelectric focusing–mass spectrometry: analysis of protein mixtures from human body fluids, *Biomedical Chromatography* 16(4) (2002) 287-297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmc.159>.
- [139] G. Zhu, L. Sun, N.J. Dovichi, Simplified capillary isoelectric focusing with chemical mobilization for intact protein analysis, *Journal of Separation Science* 40(4) (2017) 948-953. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601051>.
- [140] G. Zhu, L. Sun, P. Yang, N.J. Dovichi, On-line amino acid-based capillary isoelectric focusing–ESI-MS/MS for protein digests analysis, *Analytica Chimica Acta* 750 (2012) 207-211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.026>.
- [141] R. Sebastiano, C. Simó, M.E. Mendieta, P. Antonioli, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre, P.G. Righetti, Mass distribution and focusing properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing: I. Novel and unexpected results, *ELECTROPHORESIS* 27(20) (2006) 3919-3934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200600170>.
- [142] C. Simó, M.E. Mendieta, P. Antonioli, R. Sebastiano, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre, P.G. Righetti, Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF II: pH 4–6 intervals, *ELECTROPHORESIS* 27(23) (2006) 4849-4858. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200600344>.
- [143] C. Simó, M. Mendieta, P. Antonioli, R. Sebastiano, A. Citterio, A. Cifuentes, P. Righetti, Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF. III: pH 2.5–4 intervals, *Electrophoresis* 28 (2007) 715-23. <https://doi.org/10.1002/elps.200600499>.

- [144] C. Simó, A. Citterio, P.G. Righetti, Mass distribution, polydispersity and focusing properties of carrier ampholytes for IEF. IV: pH 6-8 intervals, *Electrophoresis* 28(10) (2007) 1488-94. <https://doi.org/10.1002/elps.200600853>.
- [145] C. Simó, A. Citterio, P.G. Righetti, Mass distribution, polydispersity, and focusing properties of carrier ampholytes for IEF. Part V: pH 9–11 interval, *ELECTROPHORESIS* 28(18) (2007) 3156-3162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200700123>.
- [146] C. Páger, A. Vargová, A. Takácsi-Nagy, Á. Dörnyei, F. Kilár, Effect of electrolyte pH on CIEF with narrow pH range ampholytes, *ELECTROPHORESIS* 33(22) (2012) 3269-3275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.201200175>.
- [147] A. Takácsi-Nagy, F. Kilár, W. Thormann, Modeling of formation and prevention of a pure water zone in capillary isoelectric focusing with narrow pH range carrier ampholytes, *Electrophoresis* 38(5) (2017) 677-688. <https://doi.org/10.1002/elps.201600314>.
- [148] D.R. Dixon, R.P. Darveau, Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure, *J Dent Res* 84(7) (2005) 584-95. <https://doi.org/10.1177/154405910508400702>.
- [149] S.A. Shaffer, M.D. Harvey, D.R. Goodlett, R.K. Ernst, Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of *Francisella tularensis* subspecies *novicida* lipid a characterized by tandem mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18(6) (2007) 1080-1092. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.03.008>.
- [150] U. Seydel, B. Lindner, H.-W. Wollenweber, E.T. Rietschel, Structural studies on the lipid A component of enterobacterial lipopolysaccharides by laser desorption mass spectrometry, *European Journal of Biochemistry* 145(3) (1984) 505-509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08585.x>.
- [151] M. Caroff, D. Karibian, J.M. Cavaillon, N. Haeffner-Cavaillon, Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides, *Microbes Infect* 4(9) (2002) 915-26. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01612-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01612-x).
- [152] K. Kawahara, H. Tsukano, H. Watanabe, B. Lindner, M. Matsuura, Modification of the Structure and Activity of Lipid A in *Yersinia pestis* Lipopolysaccharide by Growth Temperature, *Infection and Immunity* 70(8) (2002) 4092-4098. <https://doi.org/10.1128/iai.70.8.4092-4098.2002>.
- [153] R.K. Ernst, E.C. Yi, L. Guo, K.B. Lim, J.L. Burns, M. Hackett, S.I. Miller, Specific Lipopolysaccharide Found in Cystic Fibrosis Airway *Pseudomonas aeruginosa*, *Science* 286(5444) (1999) 1561-1565. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1561>.
- [154] E.M. Nowicki, J.P. O'Brien, J.S. Brodbelt, M.S. Trent, Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* LpxT reveals dual positional lipid A kinase activity and co-ordinated control of outer membrane modification, *Molecular Microbiology* 94(3) (2014) 728-741. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.12796>.
- [155] Y. Li, D.A. Powell, S.A. Shaffer, D.A. Rasko, M.R. Pelletier, J.D. Leszyk, A.J. Scott, A. Masoudi, D.R. Goodlett, X. Wang, C.R.H. Raetz, R.K. Ernst, LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(22) (2012) 8716-8721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202908109>.
- [156] S.P. Porras, E. Kenndler, Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion, *ELECTROPHORESIS* 26(17) (2005) 3203-3220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200500311>.
- [157] Y. Wang, R.B. Cole, Acid and base hydrolysis of lipid A from *Enterobacter agglomerans* as monitored by electrospray ionization mass spectrometry: Pertinence to detoxification mechanisms, *Journal of Mass Spectrometry* 31(2) (1996) 138-149. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<138::AID-JMS263>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<138::AID-JMS263>3.0.CO;2-Y).
- [158] H. Rütters, T. Möhring, J. Rullkötter, J. Griep-Raming, J.O. Metzger, The persistent memory effect of triethylamine in the analysis of phospholipids by liquid chromatography/mass

- spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14(2) (2000) 122-123. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000130\)14:2<122::AID-RCM844>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000130)14:2<122::AID-RCM844>3.0.CO;2-R).
- [159] M.-L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valkó, Non-aqueous capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 892(1) (2000) 155-170. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00108-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00108-4).
- [160] F. Gao, Z. Zhang, X. Fu, W. Li, T. Wang, H. Liu, Analysis of phospholipids by NACE with on-line ESI-MS, *ELECTROPHORESIS* 28(9) (2007) 1418-1425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200600533>.
- [161] M. Holčápek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Církva, Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates, *Journal of Mass Spectrometry* 39(1) (2004) 43-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.551>.
- [162] M. Mokaddem, P. Gareil, J.-E. Belgaied, A. Varenne, A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect, *ELECTROPHORESIS* 29(10) (2008) 1957-1964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200700880>.
- [163] T. Soga, K. Igarashi, C. Ito, K. Mizobuchi, H.-P. Zimmermann, M. Tomita, Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 81(15) (2009) 6165-6174. <https://doi.org/10.1021/ac900675k>.
- [164] V. Ivanova-Petropulos, Z. Naceva, V. Sándor, L. Makszin, L. Nagy, B.s Berkics, T. Stafilov, F. Kilár, Fast determination of lactic, succinic, malic, tartaric, shikimic and citric acids in red Vranec wines by CZE-ESI-QTOF-MS, *ELECTROPHORESIS*, 2018, 39(13), pp. 1597-1605 <https://doi.org/10.1002/elps.201700492>
- [165] C. Páger, N. Biherczová, R. Ligetvári, B. V. Berkics, T. Pongrácz, V. Sándor, A. Bufa, V. Poór, A. Vojs Staňová, F. Kilár, Advanced online mass spectrometry detection of proteins separated by capillary isoelectric focusing after sequential injection, *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE*, 2017, 40(24), pp. 4825-4834, <https://doi.org/10.1002/jssc.201700695>
- [166] V. Sándor, B. V. Berkics, A. Kilár, B. Kocsis, F. Kilár, Á. Dörnyei, NACE-ESI-MS/MS method for separation and characterization of phosphorylation and acylation isomers of lipid A, *ELECTROPHORESIS*, 2020, 41(13-14), pp. 1178-1188, <https://doi.org/10.1002/elps.201900251>

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Kilar Ferencnek és Fenyvesiné Dr. Páger Csillának a témavezetést, támogatást, irányítást és útmutatást a munka során.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sándor Viktornak, Dr. Kilar Anikónak, Dr. Dörnyei Ágnesnek és Violeta Ivanova-Petropulosnak a laboratóriumi munkámhoz és a közlemények elkészüléséhez nyújtott segítségükért és irányításukért.

Köszönöm Dr. Kocsis Béla Tanár Úrnak a mikrobiológiai minták előkészítésében nyújtott segítségét, a mindig bátorító és kedves szavait.

Külön köszönet a Bioanalitika Intézet és az Analitikai és Környezatkémiai Tanszék munkatársainak.

Végül, ez a doktori értekezés nem valósulhatott volna meg feleségem, családom és legjobb barátaim támogatása és kitartó segítsége nélkül.