(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 60 2004 005 843 T2** 2007.08.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 612 550 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 005 843.2**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 015 701.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **03.07.2004**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.01.2006**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.04.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.08.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 27/447*** (2006.01)
***B01D 15/08*** (2006.01)

(73) Patentinhaber:
**Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE**

(74) Vertreter:
**Weickmann & Weickmann, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR**

(72) Erfinder:
**Curcio, Mario, 6048 Horw, CH**

(54) Bezeichnung: **Vorkonzentrierende Verbindungstelle für die Kupplung von flüssiger Chromatographie und Kapillarelektrophorese**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

Gebiet der Erfindung:

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anordnung und ein Verfahren zur zweidimensionalen Trennung eines komplexen Gemisches von beispielsweise Peptiden durch Flüssigchromatographie. Die Erfindung betrifft insbesondere Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RPLC) mit anschließender Kapillarelektrophorese (CE), wobei direkt in ein Massenspektrometer eingesprüht wird.

Hintergrund der Erfindung:

**[0002]** Zweidimensionale Flüssigchromatographie-/Massenspektrometrieverfahren (LC/MS) beginnen in der Proteomforschung und bei Proteomanwendungen eine Schlüsselrolle zu spielen, da herausgefunden wurde, dass 2D LC einige der Beschränkungen, welche für 2D Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) kritisch sind, ausräumt, wobei hierzu in [Lit. 1] eine gute Zusammenfassung gegeben wird. Die Hauptvorteile sind Automatisierung, kürzere Analysezeit, höhere Sensitivität und erhöhte Reproduzierbarkeit. Verdünnte Proben können auf einer Säule konzentriert werden und es ist eine Kopplung mit verschiedenen Detektionssystemen möglich, wie beispielsweise UV, LIF und insbesondere MS, wobei dies zu schnellerer Identifizierung und Quantifizierung führt.

**[0003]** Eine Analyse auf Peptidebene ist aus mehreren Gründen vorteilhaft, aber hauptsächlich deshalb, weil Peptide zunächst in einer größeren Vielfalt an Lösungsmitteln stärker löslich sind und leichter zu trennen sind als die Ausgangsproteine. Es gibt beim Arbeiten mit Peptiden jedoch einen Nachteil, welcher in der steigenden Zahl an zu lösenden Spezies liegt, wodurch eine höhere Auflösung während der Trennung erforderlich ist und wodurch die Verwendung von zur Verfügung stehenden Vorfraktionierungstechniken wichtiger wird.

**[0004]** Die grundlegende Idee eines prozessgekoppelten 2D-LC-Systems ist es, in der ersten Dimension eine langsame Trennung zu bekommen sowie eine schnelle Trennung in der zweiten Dimension. Um die Erfordernisse hinsichtlich hoher Auflösung in der zweiten Dimension ohne Verringerung der Probennahmerate oder Verlangsamung in der ersten Dimension zu erfüllen, müssen wenigstens zwei Säulen der zweiten Dimension parallel eluiert werden. Der am häufigsten beschriebene, aber auch am häufigsten angewendete und kommerzialisierte 2D-LC-Ansatz ist Ionenaustauschchromatographie (IEX) mit anschließender RPLC. Die beiden Techniken sind vollständig orthogonal, wobei die erste auf einem Ladungstrennungsmechanismus (Salzeluierungsschritte) basiert und die zweite auf Hydrophobizität (stufenweise Elution mit organischem Lösungsmittel) basiert. IEX ist mit MS nicht kompatibel, weshalb es als erste Dimension verwendet wird. Fraktionen aus der IEX werden gefangen und auf einer oder zwei parallelen Anreicherungssäulen gewaschen und anschließend einer zweiten Trennung durch RPLC unterzogen (eine oder zwei parallele Säulen), welche direkt mit MS gekoppelt werden kann, typischerweise durch einen ESI-Verbindungsbereich. Eine Beschränkung dieses Ansatzes stellt die noch immer insgesamt lange Analysezeit dar. Theoretisch ist eine der Kombinationen, welche die meisten Vorteile bildet, eine LC mit anschließender Kapillarzonenelektrophorese (CZE), wobei aber bis jetzt für diese spezielle Kopplung nichts kommerzialisiert wurde und in der Literatur hierzu wenig gefunden werden kann. Diese beiden Techniken sind ebenfalls orthogonal und untereinander und mit Massenspektrometrie kompatibel. Beide stellen eine hohe Auflösung bereit, wobei die Gesamthöchstwert-Kapazität gesteigert wird und sie können zusammen schneller sein als eine beliebige andere 2D-Kombination. Die Rate, mit der CZE-Trennungen durchgeführt werden können, ermöglicht eine kontinuierliche Probennahme aus dem Ausfluss aus der ersten Säule in die zweite, wobei die 2D-Analyse in der Zeit vervollständigt wird, welcher es bedarf, um die erste Dimension zu vervollständigen, wobei es sich um die Zeit handelt, welcher es bedarf, um eine RPLC-Trennung auszuführen. Das entscheidende Problem, welches die Entwicklung dieser Strategie in einer rückschauenden Betrachtung verlangsamte, ist wahrscheinlich die Verbindung zwischen den zwei Trennungstechniken. Interessante Ideen, welche nicht immer für diese spezifische Kopplung gedacht waren, stellen mehr oder weniger wirkungsvolle Lösungen dar. Es werden in der Patentliteratur wenige alternative Verfahren beschrieben, wie beispielsweise diejenige, welche auf einem mechanischen Ventil basiert (US 5 240 577 A) und denjenigen, welche auf einem Flussausguss-(US 5 496 460 A) oder einem optischen Ausgusskonzept (US 5 269 900 A) basieren. Wie im US-Patent 6 192 768 B1 beschrieben, könnte auch ein anderes Konzept verwendet werden, welches auf Dispergieren, durch eines von mehreren Mitteln, von Tröpfchen mit definierten Volumen aus einem kontinuierlichen Fluss in beispielsweise eine Kapillare zur CE beruht. Andere Konzepte, z.B. basierend auf der Kontrolle von EOF (elektroosmotischer Fluss), werden in US 6 475 363 B1 beschrieben. Aber in allen Fällen, neben individuellen Beschränkungen, bleibt noch immer ein gemeinsamer Nachteil, der darin besteht, dass der Ausfluss zu Abfall befördert wird, wobei das Risiko besteht, Information zu verlieren und selbstverständlich die Sensitivität nicht verbessert wird.

**[0005]** Es ist deshalb eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Lösung vorzuschlagen, diese Einschränkung an der Verbindungsbereichstufe zwi-

schen der ersten Trennung und dem nachfolgenden Trennungsschritt auszuräumen, ohne dass die Nachteile auftreten, welche in Beziehung mit den vorgeschlagenen Ideen beschrieben werden.

**[0006]** Es ist insbesondere eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Verbindung zwischen der RPLC-Trennung und der anschließenden CE-Trennung vorzuschlagen.

**[0007]** Die Erfindung schlägt eine Anordnung bzw. ein Verfahren gemäß der Formulierung von Anspruch 1 bzw. Anspruch 10 vor.

**[0008]** Diese Erfindung offenbart hauptsächlich ein Verfahren zum Sammeln des Ausflusses aus der ersten Säule in die zweite, so dass genügend Zeit gegeben ist zur Kapillarzonenelektrophoresetrennung einer injizierten Injektion ohne Kontaminierung aus dem kontinuierlichen Fluss. Fraktionen, welche aus der ersten Säule eluieren, werden vor der nächsten Injektion zwischen einer zweiten Trennung und einer anderen Trennung in einem kurzen Segment konzentriert, das durch zwei Elektroden definiert ist. Dies führt nicht nur zu einem Erhalt der vollständigen Information, welche in der Trennung der ersten Dimension enthalten ist, sondern auch zu einer stark erhöhten Sensitivität und Auflösung in der zweiten Dimension. Vorkonzentration mit einer Säule bei Kapillarelektrophorese ist nicht neu [Lit. 10–11], aber diese bekannten Verfahren erfordern entweder diskontinuierliche Puffersysteme, z.B. zur Isotachophorese und Feldamplifizierung, oder die Verwendung von adsorbierenden oder bindenden Materialien, wobei dies im Allgemeinen auch eine Veränderung hinsichtlich der Mobilphase oder des Desorptionspuffers bedarf. Kürzlich wurde in US 6 428 666 B1 auch ein elektrokinetisches Einfangen beschrieben, wobei Proteine auf Silicapartikeln unter einem angelegten elektrischen Feld eingefangen werden und durch Druck in Abwesenheit eines elektrischen Felds eluiert werden. In jüngster Zeit wurde parallel und unabhängig von dieser Erfindung eine fluidische Elektroeinfangvorrichtung entwickelt und veröffentlicht [Lit. 12–13], welche auf dem Gleichgewicht zwischen hydrodynamischen und elektrischen Kräften basiert. Jedoch war diese Vorrichtung zur einstufigen Probenaufreinigung von Peptiden und Proteinen vor beispielsweise matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder zur Vorkonzentrierung vor einer eindimensionalen nicht gekoppelten Analyse durch Kapillarelektrophorese gedacht und in der Tat hilft sie nur, das Prinzip, auf welchem der Verbindungsbereich der vorliegenden Erfindung beruht, zu verbessern.

**[0009]** Im Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung wird der Fluss nie angehalten, sondern konstant gehalten bei einer Rate, bei der die erste Trennung, wie beispielsweise eine RPLC durchgeführt wird (z.B. 100 nl/mim), unabhängig vom EOF-Wert während der Trennung des zweiten Schritts, wie beispielsweise der CE, oder unabhängig von wie auch immer bedingten Druckabfällen innerhalb des Systems z.B. Verstopfungen oder Blasen. Dies kann Dank jüngster Fortschritte in der Nanopumpentechnologie, welche kommerziell verfügbar gemacht wurde, z.B. durch Agilent Technologies und Dionex LC Packings, möglich gemacht werden. Eine Folge davon ist, dass ein stabiles Elektrospray zur MS-Analyse ebenfalls sichergestellt werden kann.

**[0010]** Deshalb bezieht sich die vorliegende Erfindung insbesondere auf die Kombination von Nano-RPLC anstelle von Mikro-RPLC mit CZE. Mikro-RPLC basiert üblicherweise auf Säulen mit einem Innendurchmesser im Bereich von 0,3 bis 3 mm und weist typische Flussraten im Bereich von 1 bis 500 µl/min auf, während Nano-RPLC auf Säulen mit einem Innendurchmesser im Bereich von 75 bis 100 µm und typischen Flussraten von 0,1 bis 1 µl/min (100 bis 1000 nl/min) basiert. Als Konsequenz sind die Flussraten, welche für LC verwendet werden (< 200 nl/min), kompatibel mit der Trennungsgeschwindigkeit von CZE, welche nun perfekt prozessgekoppelt mit der ersten Säule ist und der Reihe nach mit MS über einen ESI-Verbindungsbereich gekoppelt ist. Mit anderen Worten, der vollständige Ausfluss aus der RPLC fließt geradewegs durch CZE-Kanal ohne Ventile oder Todvolumen, nichts wird zum Abfall befördert und es tritt keine Verdünnung auf.

**[0011]** Ein Pufferwechsel vor der CZE-Analyse ist nicht notwendig, da Bedingungen vorgefunden werden können, welche sowohl mit RPLC und CZE-Trennungen als auch mit Massenspektrometrie kompatibel sind. Dies wurde durch einige Experimente bewiesen, wobei die Auflösung, welche durch CZE für ein Gemisch aus Peptiden (tryptischer Verdau von IgG, welcher 30 Peptide ergab) in einem Puffer, welcher aus 20% Acetonitril (ACN)/0,4% Triethylamin (TEA)/0,3% Trifluoressigsäure (TFA) (Fig. 1c) bestand, erhalten wurde, vergleichbar war, mit der Auflösung, welche in optimalen, gut beschriebenen Puffersystemen erreicht wurde, welche aufgrund ihres hohen Salzgehalts und des Vorliegens von Additiven, wie beispielsweise Harnstoff, mit MS und RPLC nicht kompatibel waren (Fig. 1a und 1b). Puffer **1**, entsprechend Fig. 1a, besteht aus Iminodiessigsäure (IDA) 50 mM, Hydroxyethylcellulose (HEC) 0,5% 7M Harnstoff. Puffer **2** besteht aus 50 mM IDA/10% Trifluorethanol (TFE)/0,5% HEC. Der Graph gemäß Fig. 1 c zeigt eine Trennung in der zweiten Dimension, welche sich aus der vorliegenden Erfindung ergeben konnte.

**[0012]** Dem bei Verwendung interner Elektroden auftretendem Problem hinsichtlich Elektrolyse und Blasenbildung kann durch Einbau von Salzbrückenelektroden oder Membranen anstatt, wie in [Lit. 12–13]

beschrieben, vorgebeugt werden. Als Teil dieser Erfindung werden zwei Mikroelektroden zur Vorkonzentration verwendet, welche gemäß einem möglichen Beispiel aus Mikrokanälen bestehen, welche mittels einer sehr engen Öffnung im Größenbereich von z.B. 2–3 μm mit dem CE-Kanal in Kontakt stehen und beispielsweise mit einem Nafion®-Polymer oder einem anderen ionenselektiven Material gefüllt sind. Nafion® ist im Wesentlichen Teflon®, welches mit Sulfonsäuregruppen durchsetzt ist, mit einer sehr hohen Affinität für Wasser. Jede Sulfonsäure kann bis zu 13 Wassermoleküle binden, wobei es sie als Hydratationswasser anzieht. Zwischenverbindungen zwischen den Sulfonsäuregruppen führen zu einem sehr schnellen Transfer von Wasser durch das Nafion®, deshalb auch von Protonen. Eine der Hauptanwendungen von Nafion® ist in der Tat eine Verwendung als Protonenaustauschmembran in Polymerelektroden-Brennstoffzellen. Letztendlich können andere kleine positive Ionen hindurchtreten, aber nicht Analyten mit der Größe eines Peptids. Dies ermöglicht es, dass Peptide, welche an einem chromatographischen Höchstwert coeluieren, innerhalb einer kurzen Zone konzentriert werden können, welche von zweien dieser Elektroden umfasst ist, durch Anlegen einer Spannung dazwischen, wobei die Polarität, welche zur Ladung der Peptide umgekehrt ist (positiv in diesem Fall), ausreichend stark ist, um die Zugkraft der hydrodynamischen Strömung zu erreichen. Die Injektion zur CE wird durchgeführt durch Abschalten der Potenzialdifferenz zwischen den zwei Elektroden und dadurch, dass man es zulässt, dass der verdichtete Probenpfropfen durch den Fluss für die Zeit transportiert wird, welche notwendig ist, die zweite Elektrode zu passieren und aus der Konzentrationszone auszutreten. Die Spannung, welche zur Trennung zwischen der zweiten Elektrode und der Kathode angelegt ist, ist immer an, während diejenige Spannung zwischen den zwei Konzentrationselektroden nur während der Injektion abgeschaltet ist.

**[0013]** Die Erfindung wird beispielsweise unter Bezugnahme auf Fig. 2 ausführlicher beschrieben, wo eine schematische Darstellung der Erfindung gezeigt ist.

**[0014]** Nach einer ersten Trennungsvorrichtung, wie beispielsweise einer RPLC-Säule, werden die getrennten Proben bzw. Fraktionen in eine Zwischenzone **11** eingeführt, welche in einer weiterführenden weiteren Trennungsvorrichtung **3** endet, wie beispielsweise einem CE-Trennungskanal. Nach dem Verlassen des Trennungskanals **3** werden die Proben weitergeleitet und injiziert oder eingesprüht in eine massenspektrometrische Vorrichtung **5**.

**[0015]** Die Zwischenzone **11** umfasst zwei in einem Abstand angeordnete Elektroden E1 und E2 in welchem dazwischen eine so genannte Vorkonzentrationszone **13** definiert ist.

**[0016]** Fraktionen, welche die RPLC-Säule **1** verlassen, werden zuerst vorkonzentriert in der Vorkonzentrationszone **13** durch Halten der zwei Elektroden E1 und E2 bei einer Potenzialdifferenz in einer solchen Art und Weise, dass Analyten in den Fraktionen die Elektrode E2 nicht passieren können. Nach einer bestimmten Zeit bzw. einer Vorkonzentrationszeit werden die Elektroden abgeschaltet oder die Polarität wird umgekehrt geschalten, so dass die vorkonzentrierte Analytfraktion die Elektrode E2 passieren kann und in die zweite Trennungsvorrichtung **3** eintreten kann, wobei es sich beispielsweise um einen CE-Trennungskanal handelt. Durch Einführen einer Vor-Vorkonzentrationszone, welche durch Elektroden $E_0$ und $E_1$ definiert ist, ist es ferner möglich, den Eintritt von weiteren Komponenten, welche die RPLC-Vorrichtung verlassen, in die Vorkonzentrationszone **13** zu stoppen, bevor die Injektion in die CE-Zone **3** abgeschlossen ist.

**[0017]** Selbstverständlich zeigt Fig. 2 nur ein Beispiel einer Ausführung gemäß der vorliegenden Erfindung. Es ist selbstverständlich möglich, weitere Elektroden anzuordnen, um weitere Zonen zur Vorkonzentration zu definieren.

**[0018]** Der große Vorteil der erfindungsgemäßen Anordnung ist es, dass der Fluss als solcher nicht unterbrochen wird und dass der Fluss beliebiger Lösungsmittel oder Transportflüssigkeiten konstant bleiben soll. Darüber hinaus wird kein Ausfluss zum Abfall befördert, wobei ein Risiko für Informationsverlust besteht.

**[0019]** Um eine Vorstellung von den Abmessungen und den Werten der erfindungsgemäßen Verfahren zu geben, können die folgenden Berechnungen im Sinne eines Beispiels für die Werte von Flussraten, Spannungen und Analysezeiten gemacht werden:
Für eine RPLC kann eine C18-Säule, welche 15 cm Länge × 75 μm ID (Innendurchmesser) aufweist, verwendet werden und es wird eine Flussrate zur stufenweisen Elution von 100 ml/mn angelegt. Der CE-Kanal, wohin der RPLC-Ausfluss fließt, kann einen ID von 50 μm aufweisen und die effektive Länge, bei welcher die Elektrophorese geschieht, beträgt 5 cm. Die Vorkonzentrationszone vor der CE-Trennung ist 1 mm lang.

**[0020]** In diesem System beträgt die lineare Flussgeschwindigkeit ($v_f$) 0,085 cm/s. Die elektrophoretische Mobilität (μ) von Peptiden, welche aus Trennungen im oben beschriebenen Puffersystem berechnet ist, liegt typischerweise im Bereich von $1,0 \times 10^{-4}$ $cm^2$ $sec^{-1}$ $V^{-1}$ bis $1,6 \times 10^{-4}$ $cm^2$ $sec^{-1}$ $V^{-1}$. Aus der Gleichung $v_e = \mu E$, wobei $v_e$ die elektrophoretische Geschwindigkeit ist und E das elektrische Feld ist, würde ein elektrisches Feld von 2 KV/cm, dass heißt 10 KV über 5 cm eine $v_e$ im Bereich zwischen 0,2 cm/s und 0,36 cm/s ergeben. So dass die Gesamtge-

schwindigkeit ($v_{tot}$), wobei es sich um die Summe von $v_f$ und $v_e$ handelt, im Bereich zwischen 0,285 cm/sec und 0,445 cm/sec liegen würde, das heißt eine Detektionszeit zwischen 10 s für den ersten Höchstwert und 18 s für den letzten Höchstwert, während für einen chromatographischen Höchstwert ein Schätzwert von 30 s sinnvoll ist. Dies bedeutet, dass genügend Zeit zur Verfügung steht, eine Elektrophorese durchzuführen, während der nächste chromatographische Höchstwert vor der nächsten Injektion konzentriert wird. Wärmeerzeugung und Auflösungsverlust durch den Joule-Effekt aufgrund hoher Spannung ist aufgrund der niedrigen Ionenstärke des Flüssigsystems, den kleinen Abmessungen des Kanals und der Flussrate, welche über die ganze Zeit frische Flüssigkeit zuführt, kein großes Problem.

**[0021]** Der Wert des einfangenden elektrischen Felds muss größer sein als das Verhältnis zwischen $v_f$ und der niedrigsten Peptidmobilität, das heißt größer als 850 V/cm, das heißt größer als 85 V über 1 mm. Die Zeit, während der dieses elektrische Feld null sein sollte, um eine Injektion zu ermöglichen, beträgt dann 1,2 s.

**[0022]** Es kann ein sehr hoher Konzentrierungsfaktor erreicht werden.

**[0023]** In einer anderen Version dieses Verbindungsbereichs ist die Konzentrationszone, welche noch immer 1 mm × 50 µm groß ist, mit Kationenaustauschmaterial befüllt und es tritt in dieser Zone Probenfokussierung (sample stacking) in Abwesenheit eines elektrischen Felds auf. Probendesorption wird anschließend durch Anlegen ausreichender Spannung mit einer Polarität in der gleichen Richtung wie der Flussrichtung erreicht. Eine Abschätzung des erforderlichen elektrischen Felds wird in diesem Fall nicht gemacht, da es von der verwendeten abbschließenden stationären Phase abhängig ist, wobei aber der niedrige pH-Wert und das Vorliegen von ionenpaarenden Mitteln, wie beispielsweise TFA, den Wert dieses Felds erniedrigen sollten. Sowohl das oben beschriebene Beispiel als auch die in **Fig. 2** gezeigte schematische Darstellung werden zur weiteren Erklärung der vorliegenden Erfindung verwendet, welche selbstverständlich in keiner Weise auf das Beispiel und die in **Fig. 2** gezeigte Darstellung beschränkt ist.

## Literaturliste

### Referenzangaben

[1]. Sarka Beranova-Giogianni. Proton analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. Trends in Anal. Chem. 2003, 22, 273–81.
[2]. Opiteck et al. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and protein mapping. Anal. Bioch. 1998, 258, 349–61.
[3]. Opiteck et al. Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. Anal. Chem. 1997, 69, 1518–24.
[4]. Washburn et al. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nature Biotech. 2001, 19, 242–47.
[5]. Wolters et al. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal. Chem. 2001, 73, 5683–90.
[6]. Wagner et al. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. Anal. Chem. 2002, 74, 809–820.
[7]. Moore et al. Rapid comprehensive two-dimensional separations of peptides via RPLC-optically gated capillary zone electrophoresis. Anal. Chem. 1995, 67, 3448–55.
[8]. Lewis et al. Comprehensive on-line RPLC-CZE-MS of peptides. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1997, 8, 495–500.
[9]. Han et al. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. Nature Biotech. 2001, 19, 946–51.
[10]. Damon et al. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. Electrophoresis 2000, 21, 2768–79.
[11]. Miguel Valcárel et al. Coupling continuous separation techniques to capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, 924 (2001) 3–30.
[12]. Astorga-Wells et al. A microfluidic electrocapture device in sample preparation for protein analysis by MALDI mass spectrometry. Anal. Chem. October 1, 2003, 75, 5213–19.
[13]. Astorga-Wells et al. Fluidic preconcentrator device for capillary electrophoresis of proteins. Anal. Chem. October 1, 2003, 75, 5207–12.

## Patentansprüche

1. Anordnung zur zwei-dimensionalen Trennung eines komplexen Analytgemischs umfassend eine Nano-Umkehrphasenflüssigchromatographie (Nano-RPLC)-Säule als eine erste Trennungsvorrichtung zur Trennung in einer ersten Dimension; einer Kapillarzonenelektrophorese (CZE)-Kanal als eine zweite Trennungsvorrichtung zur Trennung in einer zweiten Dimension; und einen Verbindungsbereich zwischen der ersten Trennungsvorrichtung und der zweiten Trennungsvorrichtung, welcher dadurch charakterisiert ist, dass der Verbindungsbereich eine Konzentrationszone umfasst welche zwei oder mehr Elektroden zur Konzentrierung der einzelnen Probenfraktionen oder Probenkomponenten umfasst, welche die erste Trennungsvorrichtung verlassen bevor die Probenfraktionen oder Probenkomponenten in die zweite Trennungsvorrichtung eingeführt werden.

2. Anordnung gemäß Anspruch 1, dadurch ge-

kennzeichnet, dass die Elektroden aus Mikrokanälen bestehen, welche mit einem Nafion-Polymer oder einem anderen Ionenselektiven Material gefüllt sind.

3. Anordnung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrokanäle mit dem CZE-Kanal mittels einer sehr engen Öffnung im Größenbereich von 2–3 μm in Kontakt stehen.

4. Anordnung gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Verbindungsbereich wenigstens eine weitere Konzentrationszone umfasst.

5. Zwei-dimensionales Nano-Umkehrphasenflüssigchromatographie (Nano-RPLC)/Kapillarzonenelektrophorese (CZE)-Verfahren umfassend: Trennen eines komplexen Analytgemischs in der Nano-RPLC mit nachfolgender CZE, dadurch gekennzeichnet, dass im Verbindungsbereich zwischen der Nano-RPLC und der CZE die Fraktionen, welche die Nano-RPLC verlassen, in einer Konzentrationszone umfassend zwei oder mehr Elektroden konzentriert werden, bevor sie in die CZE eingeführt werden.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der vollständige Ausfluss aus der Nano-RPLC in die CZE mit einer konstanten Flussrate einfließt.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden aus Mikrokanälen bestehen, welche mit einem Nafion-Polymer oder einem anderen Ionenselektiven Material gefüllt sind.

8. Verfahren nach Anspruch 5, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Fraktionen durch Anlegen wenigstens eines elektrischen Felds konzentriert werden und dass die konzentrierten Fraktionen in Abwesenheit oder unter Umkehren des wenigstens einen elektrischen Felds in die CZE eingeführt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Fraktionen, welche die Nano-RPLC verlassen, durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden mit einer Polarität, welche umgekehrt zur Ladung der Komponenten der Fraktion ist, konzentriert werden, wobei die Spannung ausreichend stark ist, um eine Zugkraft auf die hydrodynamische Strömung zu erreichen und dadurch, dass das Einführen der Fraktion in die CZE durch Abstellen der Potenzialdifferenz zwischen den Elektroden ausgeführt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 5, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentrationszone ferner ein Ionenaustauschmaterial umfasst und dass Probenfokussierung von Probenmaterial, welches die Nano-RPLC verlässt, in Abwesenheit eines elektrischen Felds auftritt und dass Probendesorption in die CZE durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden mit einer Polarität in gleicher Richtung wie die Flussrichtung erreicht wird.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die einzelnen Komponenten der durch CZE getrennten Fraktion in ein Massenspektrometer eingesprüht werden.

12. Verfahren nach einem der vorausgehenden Ansprüche 5 bis 11 zur zweidimensionalen Trennung in der Proteomik.

13. Verwendung einer Anordnung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, zur zweidimensionalen Trennung eines Peptidgemischs.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

**Anhängende Zeichnungen**

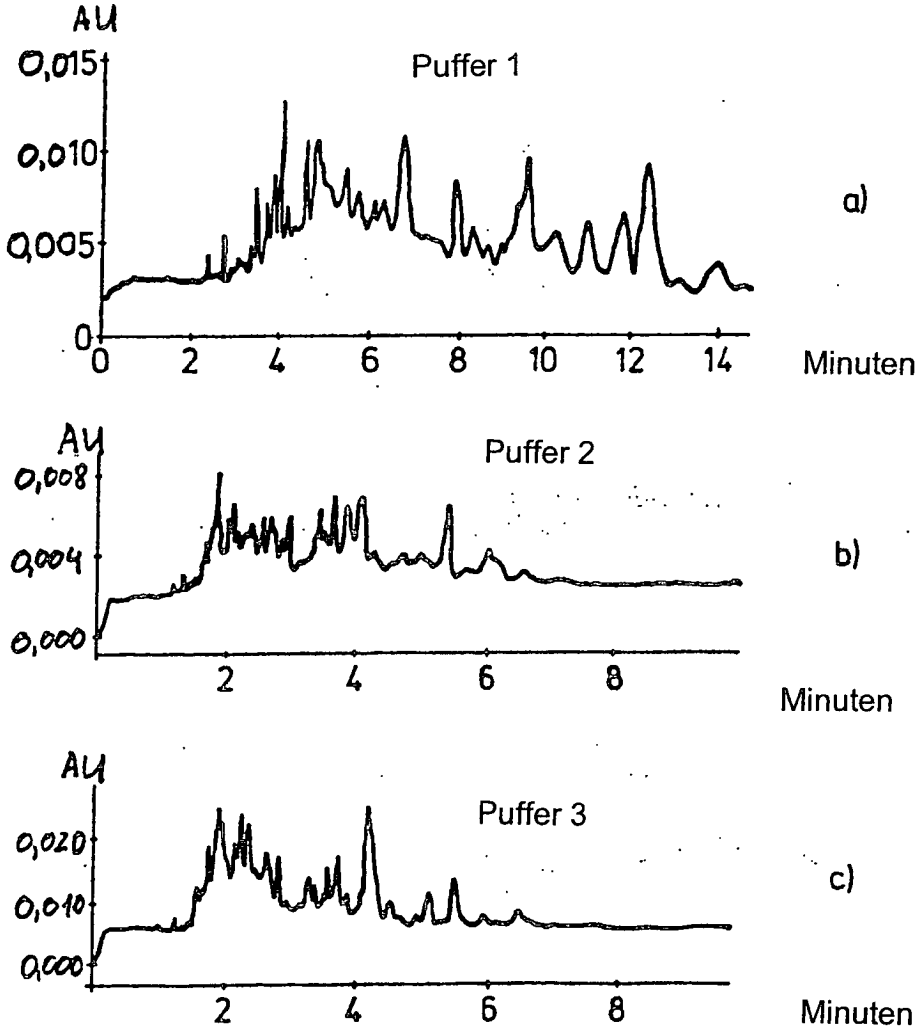



FIG.1

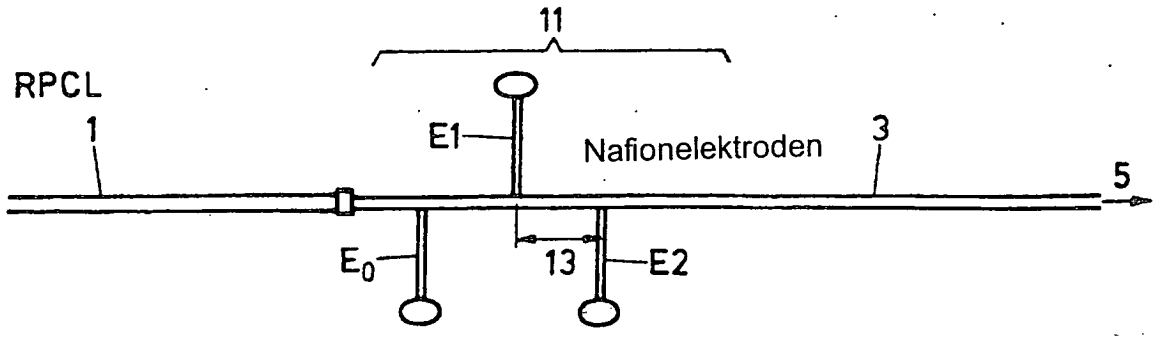



FIG.2