

LEHRBUCH

Manfred H. Gey

Instrumentelle Analytik und Bioanalytik

Biosubstanzen, Trennmethoden,
Strukturanalytik, Applikationen

3. Auflage



Springer Spektrum

Springer-Lehrbuch

Manfred H. Gey

Instrumentelle Analytik und Bioanalytik

Biosubstanzen, Trennmethoden,
Strukturanalytik, Applikationen

3. Auflage

Prof. Dr. rer. nat. habil. Manfred H. Gey
Hochschule Zittau/Görlitz
02763 Zittau
Deutschland
Büro: Mäuseburg-Center,
Marschnerstrasse 22, D-02763 Zittau,
www.papa-gey.de,
papa-gey@gmx.de

ISSN 0937-7433
Springer-Lehrbuch
ISBN 978-3-662-46254-6 ISBN 978-3-662-46255-3 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-46255-3

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998, 2008, 2015
Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags.
Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorkfrei gebleichtem Papier

Springer Berlin Heidelberg ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media
(www.springer.com)

In Liebe und als Dank
für Sigi, Anni, Tobi
und Orko

Freiheit ist ein Gut,
das durch Gebrauch wächst,
durch Nichtgebrauch dahinschwindet.

Carl Friedrich von Weizsäcker

Vorwort

Unter „Instrumenteller Bioanalytik“ versteht man ein umfassendes und vielseitiges Arsenal analytischer Methoden zur Analyse und Charakterisierung niedermolekularer Biosubstanzen und vor allem von Biopolymeren in komplexen biologischen Matrices innerhalb der Biochemie und Pharmazie, Chemie und Umweltchemie, Biologie und Genetik, Biomedizin und Immunologie, Biotechnologie und Toxikologie.

Das Buch soll Studenten, Diplomanden und Doktoranden dieser Fachrichtungen sowie spezialisierten Laboranten und Technikern zur erfolgreichen Lösung bioanalytischer Fragestellungen dienen.

Im Mittelpunkt des Buches stehen theoretische und methodische Grundlagen über leistungsfähige Trennmethoden, Strukturanalytik und Kombinationen zwischen beiden. Das instrumentelle Methodenspektrum reicht von der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Biochromatographie (BioLC), der klassischen Elektrophorese und Kapillarelektrophorese (CE) bis zur UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie, Massenspektrometrie (MS, MALDI-MS, MALDI-PSD), Kernresonanzspektroskopie (NMR) und verschiedenen Kopplungsvarianten der Chromatographie mit der Strukturanalytik (LC-MS).

Über jede einzelne dieser Methoden existieren ausführliche Monographien. Zusammenfassende Darstellungen zur Funktionsweise und integrierten Anwendung mehrerer bioanalytischer Methoden sind z.Z wenig bekannt. Das Buch soll zur Schließung dieser Lücke beitragen.

In den vergangenen Jahrzehnten entwickelten sich hochqualifizierte Methodenspezialisten, die oft nur eine Technik (z.B. HPLC, Elektrophorese, GC, MS oder NMR) perfekt beherrschten und ausübten. Heutzutage sind der integrierte Einsatz und die Beherrschung mehrerer analytischer Methoden gefragt und unbedingt notwendig.

HPLC und CE sind ein gutes Beispiel für den kombinierten und sich ergänzenden Methodeneinsatz. Mit Hilfe der HPLC können ca. 80% aller Substanzen analysiert werden. Dies betrifft kleine Ionen oder Moleküle, polare und unpolare Substanzen sowie hochmolekulare Biomoleküle wie Proteine oder Glycoproteine. Die Kapillarelektrophorese wird als komplementäre Analysenmethode zur HPLC angesehen. Was mit der HPLC nicht zu trennen ist, gelingt oft mit der CE oder umgekehrt. Als Trennmethoden sind sie jedoch bei der Identifizierung unbekannter biologischer Substanzen nur dann erfolgreich, wenn entsprechende Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen.

Da dies nicht immer der Fall ist, sind neben präparativen Trenntechniken zunehmend moderne Kopplungstechniken in Kombination mit strukturanalytischen Methoden (LC-MS) erforderlich.

Ein besonderes Innovationspotential geht z.Z. von der Massenspektrometrie mit schonenden Ionisierungstechniken aus. Insbesondere die neuen Electrospray- und MALDI-Techniken sind in der Lage, sowohl niedere als auch hochmolekulare Biosubstanzen in ihren Strukturen bis fast in alle Einzelbausteine zu identifizieren.

Das Buch beinhaltet weiterhin ausgewählte Applikationen u.a. aus den Bereichen Metallothioneine (Phytochelatine), Nucleobasen und Nucleoside, Kohlenhydrate, organische Säuren und Fettsäuren, die zu den kleineren Biosubstanzen gehören.

Phospholipide und Neutrallipide, Nucleotide (DNA-Fragmente), Oligosaccharide (Glycanketten von Glycoproteinen) und thermostabile Enzyme vertreten die Biopolymere.

Es werden auch Methoden der Probenvorbereitung und -konzentrierung wie Dialyse, Zentrifugation, Lyophilisation, Extraktion, Filtration, Fällung oder Batch-Adsorption einbezogen.

Natürlich verfügen viele Universitäten, Hoch- und Fachschulen sowie kleinere Institutionen und Firmen (noch) nicht über ein komplettes instrumentalanalytisches Methodenspektrum (HPLC, CE, GC, MS, MALDI-MS, NMR, GC-MS, LC-MS). Die Frage nach „ungeliebten“ zentralen analytischen Laboratorien könnte deshalb im Vergleich zur etablierten dezentralen Analytik in den Forschungsinstitutionen in Zukunft wieder verstärkt in den Vordergrund der Diskussion rücken.

Ziel dieses Buches ist es demzufolge auch, die Forscher und Anwender zu verstärkten interdisziplinären Kooperationen auf analytischen Gebieten (Bioanalytik, Umweltanalytik) zu motivieren. Die anschaulich und verständlich hier dargestellte Methodenvielfalt soll einen Ansatzpunkte dafür bieten.

Für ein vertieftes Studium von einzelnen (bio)analytischen Methoden ist es ratsam, die angegebene weiterführende Spezialliteratur hinzuzuziehen. Dies betrifft insbesondere die Kenntnisse auf dem Gebiet der NMR und MS sowie über Struktur und Funktion von Biomolekülen, die in den einführenden Abschnitten nur kurz behandelt werden.

Das Buch resultiert aus meiner Forschungs- und Lehrtätigkeit auf dem Gebiet der Bioanalytik, die ich in den vergangenen Jahren im Institut für Biotechnologie Leipzig der Akademie der Wissenschaften der ehemaligen DDR (1986-1991), dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (1991-1995) und dem Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1996-1997) durchgeführt habe.

Meine Überzeugung ist, daß in Zukunft die Bioanalytik in Forschung und Lehre einen höheren Stellenwert erhält und ein neues innovatives „Wissenschaftsgebiet“ darstellen wird.

Fast alle Graphiken und Abbildungen sowie der gesamte Text wurden von mir selbst erstellt und in den Computer „hinein getippt“. Für die Chromatogramme und Spektren erfolgte zur anschaulicher Präsentation eine zusätzliche Bearbeitung.

Nach anfänglicher Frustration habe ich die Bearbeitung des Buches mit dem Computer und entsprechenden Programmen schätzen gelernt und kann mir heute die analytische Forschungs- und Lehrtätigkeit ohne diese „Werkzeuge“ nicht mehr vorstellen. Es sind 26 MB Datenmaterial zusammengekommen, die jederzeit ergänzt und erweitert werden können. Auf Grund der Vielfalt der Methoden und Spezialgebiete werden Verbesserungen ständig notwendig sein. Für entsprechende Anregungen und Hinweise wäre ich sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich vielen Fachkollegen/-innen, die meinen Weg als „Bio-Analytiker“ begleitet und gefördert haben, einen herzlichen Dank für die zahlreichen positiven Diskussionen, Hilfen und Ratschläge aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt der Lektorin Frau Dr. Angelika Schulz vom Vie weg-Verlag für Ihr Engagement und Ihre Geduld während der Erstellung des Buches.

Leipzig am 3. Juni 1998

Manfred H. Gey

Vorwort zur 2. Auflage

Der aktualisierte Titel „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“ reflektiert die deutlich erweiterten Inhalte des neuen Buches und ein noch umfangreicheres Methodenspektrum. Das betrifft die analytischen Trenntechniken HPLC, TLC und GC sowie spektroskopische Methoden wie die Infrarotspektroskopie (IR) und die Atomspektroskopie (AAS, OES, ICP-MS). Auch das Arsenal der Präanalytik (SPME, SPE u.a.) ist aktualisiert und ausführlicher dargestellt.

Innerhalb der Kopplung von instrumentellen Methoden untereinander (LC-NMR, GC-FTIR) oder von bioanalytischen Techniken (2-D-Elektrophorese) sind rasante Entwicklungen und neue Innovationen zu verzeichnen. Die Kopplungs-techniken („hyphenated techniques“) beinhalten auch Kombinationen zwischen Methoden der Probenvorbereitung und der Chromatographie (SPE-LC, SPME-GC) sowie von Säulenschalttechniken wie LC-LC oder GC-GC. Die unterschiedlichsten Kopplungen und die Kombinationen innerhalb der LC-MS (LC-ESI-MS, LC-APCI-MS, LC-APPI-MS) werden ausführlich und anhand von Applikationsbeispielen vorgestellt.

Neu innerhalb der Bioanalytik ist auch das hoch innovative Forschungsgebiet der Proteomanalytik (Proteomics), für das eine erste Einführung präsentiert wird. Die Grundlagen und Applikationen bereits bekannter Immunoassays und von Biosensoren tragen außerdem zur Erweiterung der Bioanalytik bei.

Für eine möglichst schnelle und verständliche Erklärung (bio)analytischer Methoden sowie für die Darstellung repräsentativer Applikationen wurden zahlreiche neue Zeichnungen bzw. Abbildungen erstellt. Sie sollen den Einstieg von Studenten und Mitarbeitern in die Instrumentelle Analytik und Bioanalytik fördern.

Zielgruppen sind neben den Studenten auch wissenschaftliche und technische Mitarbeiter sowie Doktoranden vor allem innerhalb neuer innovativer Gebiete der Biowissenschaften (Bioanalytik/Biochemie, Biotechnologie, Biomedizin, Pharmazie, Lebensmittelchemie, Toxikologie, Alternativ-Energien) aber auch klassischer Gebiete wie Umweltchemie/Technische Chemie oder Chemie und Energie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Peter Enders, Dr. Steffen Pauly und Frau Pamela Frank vom Springer-Verlag für die stetige Motivation, Geduld und das Engagement innerhalb der Realisierung dieser 2. Auflage.

Zittau am 29. Februar 2008

Manfred H. Gey

Vorwort zur 3. Auflage

Die 3. Auflage des Buches „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“ verbindet die bewährten Kapitel der 2. Auflage vor allem mit neuen Applikationen und neuen methodischen Entwicklungen auf dem Gebiet der Hochleistungs-Chromatographie – meist in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS).

Die Ultra fast HPLC (UHPLC) erobert zunehmend die analytischen Laboratorien, wo es auf Schnelligkeit und Kostenoptimierung ankommt. Trennungen in wenigen Minuten oder sogar im Sekundenbereich werden erzielt – oft verbunden mit sehr hohen Drücken bis 1000 bar, die beim Arbeiten mit kleinen Partikeln der stationären Phase $< 2 \mu\text{m}$ die Folge sind.

Schnelle Substanz-Separationen gelingen auch mit CoreShell-Materialien oder Monolithischen Trennsäulen. Für polare Substanzen ist HILIC prädestiniert. Dazu gehören Pharmaka, die mit diesen Säulen in Kombination mit MS/MS sehr effizient und mit hoher Sensitivität in komplexen, umweltrelevanten und biologischen Matrices bestimmbar sind.

Die neuen Applikationen beziehen sich auch auf die Pharmaka-Analytik, wo bei hier bewährte und sich ergänzende Methoden (Reversed-Phase-, Ionenpaar-HPLC, Kapillarelektrophorese, CE) im Fokus stehen.

Innerhalb der Drogenanalytik ist die Nachweisbarkeit im Blut und im Urin zeitlich limitiert. Metaboliten können oft länger erfasst werden. Das betrifft auch den Nachweis von nur geringen Mengen an Cocain und seinen Metaboliten mittels GC-MS in Haaren. Die Spurenanalytik kann vor allem am Beispiel der Dioxine transparent gemacht werden. Dioxingehalte im pg- oder auch fg-Bereich erfordern effektive und reproduzierbare Probenkonzentrierungen, hochauflösende GC-MS-Kopplungen sowie spezielle Labore und sehr gut qualifiziertes Personal. Neben der Analytik sind vor allem auch repräsentative Toxizitätsbetrachtungen zu den einzelnen Dioxin-Kongeneren von enormer Wichtigkeit.

Neu ist auch ein Überblick zur Aminosäureanalytik, bei der flüssigchromatographische Methoden an Ionenaustauschern mit Nachsäulen-Derivatisierung (post column detection) und Derivatisierungen vor der Trennsäule (pre column detection) im Fokus stehen.

Ein weiteres Kapitel zur Zuckeranalytik wurde einbezogen, das sich auch inhaltlich mit der Problematik der Lactose-Intoleranz beschäftigt.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 BIOMOLEKÜLE	9
2.1 Proteine	9
2.1.1 Aminosäurestrukturen	10
2.1.1.1 Zwitterionenform und pH-Abhängigkeit	12
2.1.1.2 pK-Werte und isoelektrischer Punkt	13
2.1.1.3 D- und L-Konfiguration	14
2.1.2 Proteinstrukturen	14
2.1.2.1 Peptidbindung	14
2.1.2.2 Sulfidbindung	15
2.1.2.3 Aminosäuresequenz	15
2.1.2.4 Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quarternärstruktur	18
2.1.2.5 α -Helix und β -Faltblatt	18
2.1.3 Denaturierung und Redenaturierung	20
2.1.4 Glutathion- und Metallothioneinstrukturen	21
2.1.5 Antikörper, Antigene	23
2.2 Nucleinsäuren	25
2.2.1 Strukturen	25
2.2.2 Doppelhelix, Basenpaarung und Replikation	28
2.2.3 Translation und Transkription	31
2.2.4 Die Polymerasekettenreaktion	31
2.3 Glycoproteine	34
2.3.1 Strukturen	34
2.3.1.1 <i>N</i> -glycosidische Bindung	36
2.3.1.2 <i>O</i> -glycosidische Bindung	38
2.3.2 Isolierung von Glycoproteinen aus Membranen	38
2.3.3 Enzymatische Sequenzierung der Glycane	43
2.3.4 Freisetzung der Glycane aus Proteinen	46
2.3.4.1 Enzymatische Isolierung	46
2.3.4.2 Hydrazinolyse	47
2.3.5 Markieren der Glycane	47
2.3.5.1 Fluoreszenzmarkierung mit 2-AB und BAP	48
2.3.5.2 Radioaktive Markierung	49

2.4 Lipide	50
2.4.1 Strukturen	50
2.4.2 Biosyntheseprozesse	54
2.4.2.1 Cholesterin und Squalen	54
2.4.2.2 Ceramid und Cerebrosid	55
2.5 Pharmaka, Vitamine, Farbstoffe	56
2.5.1 Pharmaka	56
2.5.2 Wasserlösliche Vitamine	58
2.5.3 Fettlösliche Vitamine	59
2.5.4 Lebensmittelfarbstoffe/Azofarbstoffe	59
2.6 Literatur	61
3 PRÄANALYTISCHE METHODEN	63
3.1 Einführung	63
3.2 Extraktionstechniken	63
3.2.1 Soxhlet-Extraktion	65
3.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion	66
3.2.3 Mikrowellenunterstützte Extraktion	67
3.2.4 Ultraschallunterstützte Extraktion	68
3.2.5 Überkritische Fluidextraktion	68
3.2.6 Headspace- und Purge-and-Trap-Technik	69
3.2.7 Beschleunigte Lösungsmittelextraktion	71
3.2.8 Festphasenextraktion	72
3.2.8.1 Eigenschaften und Struktur von Silicagelen	72
3.2.8.2 Polymermaterialien	73
3.2.8.3 Prinzip der Festphasenextraktion	74
3.2.8.4 Sorbentien und Trennsysteme in der SPE	78
3.2.8.4.1 SPE mit Normalphasen (Adsorptions-SPE)	78
3.2.8.4.2 SPE mit chemisch gebundenen Phasen	79
3.2.8.4.3 SPE mit Reversed-Phase-Materialien	80
3.2.8.4.4 SPE mit Anionenaustauschern	80
3.2.8.4.5 SPE mit Kationenaustauschern	81
3.2.9 Matrix solid phase dispersion	81
3.2.10 Festphasenmikroextraktion	82
3.2.11 Microextraction by packed sorbents (MEPS)	85
3.2.12 Liquid-phase microextraction (LPME)	87
3.2.12.1 Single-drop microextraction (SDME)	87
3.2.12.2 Hollow-fibre LPME (HF-LPME)	88
3.2.12.3 Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)	89
3.2.13 Stir bar sorptive extraction (SBSE)	90
3.2.14 Disposable pipette extraction (DPX)	91

3.3 Reinigung, Anreicherung von Biomolekülen	92
3.3.1 Lysozymbehandlung	92
3.3.2 Aussalzen	93
3.3.3 Lyophilisation	94
3.3.4 Dialyse	95
3.3.5 Ultrazentrifugation	96
3.3.6 Batch-Adsorption	98
3.3.7 Flüssig-Flüssig-Extraktion – Erhalt der biologischen Aktivität	99
3.3.8 Filtration	100
3.3.8.1 Mikrofiltration	101
3.3.8.2 Ultrafiltration	101
3.3.9 Magnetic beads	102
3.3.10 Restricted access material (RAM)	103
3.3.11 Molecular imprinting polymers (MIP)	104
3.4 Literatur	105
4 CHROMATOGRAPHIE-1: LC – HPLC – UHPLC	107
4.1 Einführung und Systematik	107
4.2 Säulenflüssigchromatographie	108
4.2.1 Grundlagen des Trennprozesses	109
4.2.1.1 Darstellung des Trenneffektes in einer Chromatographiesäule	109
4.2.1.2 Peakverbreiterung in der Säule und Van-Deemter-Gleichung	110
4.2.1.3 Peakverbreiterung außerhalb der Säule	113
4.2.1.4 Kenngrößen und Aussagen des Chromatogramms	113
4.2.2 Apparativ-methodische Grundlagen	117
4.2.2.1 Aufbau einer HPLC-Apparatur	117
4.2.2.1.1 Hochdruckpumpen	118
4.2.2.1.2 Injektionssysteme	120
4.2.2.1.3 Trennsäulen und stationäre Phasen	120
4.2.2.1.4 Säulenfülltechnik	121
4.2.2.1.5 Detektoren mit Mikrodurchflussküvette	123
4.2.2.2 Praktische Probleme der HPLC-Trennungen	124
4.3 Trennsysteme – stationäre Phasen	128
4.3.1 Normalphasenchromatographie	128
4.3.2 Chemisch modifizierte stationäre Phasen	128
4.3.4 Chirale Trennsysteme	131
4.4 Neue Entwicklungen in der Flüssigchromatographie	133
4.4.1 Ultra fast HPLC (UHPLC)	134
4.4.1.1 Pumpen in der UHPLC	134
4.4.1.2 Injektoren in der UHPLC	135

4.4.1.3 Säulen und Trennphasen in der UHPLC	135
4.4.1.4 Detektoren in der UHPLC	138
4.4.2 Core Shell Materialien	139
4.4.3 Monolithische Trennsäulen	140
4.4.4 Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)	140
4.5 Literatur	142
5 CHROMATOGRAPHIE-2: IONEN VS. BIOMOLEKÜLE	145
5.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede	145
5.2 Flüssigchromatographie von Ionen	146
5.2.1 Ionenausschlusschromatographie	146
5.2.2 Ionenaustauschchromatographie	147
5.2.3 Ionenchromatographie	150
5.2.4 Ionenpaarchromatographie	153
5.2.5 Ligandenaustauschchromatographie	154
5.2.6 Anionenaustauschchromatographie (HPAEC-PAD)	156
5.3 Biochromatographie	158
5.3.1 Chromatographie an Hydroxylapatit	160
5.3.2 Größenausschlusschromatographie	161
5.3.3 Ionenaustauschchromatographie	164
5.3.4 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie	165
5.3.5 Affinitätschromatographie	167
5.3.6 Lektinchromatographie	169
5.3.7 Metallchelatchromatographie (IMAC)	170
5.3.8 Kovalente Chromatographie	172
5.3.9 Chromatographie an porösen Glaskugeln	175
5.3.10 Perfusionschromatographie	176
5.4 Literatur	177
6 CHROMATOGRAPHIE-3: LC/HPTLC – GC	179
6.1 Einführung und Systematik	179
6.2 DC und HPTLC	180
6.2.1 Trennsysteme	180
6.2.2 Probenaufgabe, Entwicklung und Visualisierung	181
6.2.3 Auswertung von DC-Chromatogrammen	182
6.2.4 Applikationen	183

6.3 GC und CGC	186
6.3.1 Aufbau eines Gaschromatographen	186
6.3.2 Trägergase	187
6.3.3 Injektionssysteme	187
6.2.4 Trennsäulen und stationäre Phasen	188
6.3.5 Detektoren	190
6.3.5.1 Flammenionisationsdetektor	192
6.3.5.2 Massenspektrometrischer Detektor	193
6.3.5.3 Elektroneneinfangdetektor	193
6.3.5.4 Thermoionischer Detektor	194
6.3.5.5 Wärmeleitfähigkeitsdetektor	196
6.3.5.6 GC-Detektoren im Vergleich	197
6.3.6 Grundlagen des Trennprozesses	198
6.3.7 Optimierung gaschromatographischer Trennungen	199
6.3.8 Applikationen	200
6.4 Literatur	201
7 QUALITÄTSSICHERUNG IN DER ANALYTIK (LC, GC)	203
7.1 Qualitätsbegriff – Was ist Qualität?	203
7.2 Definitionen zur Qualitätssicherung	203
7.3 Fehler, Mittelwert, Standardabweichung	203
7.4 Kenngrößen der Genauigkeit	204
7.5 Kenngrößen der Kalibrierung und Kalibrierfunktion	204
7.6 Rückführbarkeit	205
7.7 Standard-Additionsverfahren	205
7.8 Bereichsgrenzen der Methode	207
7.9 Trennschärfe	207
7.10 Literatur	208
8 ELEKTROPHORESE	209
8.1 Einführung und Historisches	209

8.2 Theorie der Elektrophorese	210
8.3 Slab gel Elektrophorese	211
8.3.1 Trägerfreie versus Slab gel Elektrophorese	211
8.3.2 Zonenelektrophorese	213
8.3.3 Serumweißelektrophorese	214
8.3.4 Disk-Elektrophorese	217
8.3.5 Isotachophorese	219
8.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	220
8.3.7 Isoelektrische Fokussierung	224
8.4 Kapillarelektrophorese	226
8.4.1 Apparative Grundlagen	226
8.4.1.1 Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur	226
8.4.1.2 Injektionstechniken	227
8.4.1.3 Trennkapillaren	228
8.4.1.4 Detektion	229
8.4.2 Trennphänomene	230
8.4.2.1 Elektrophoresprinzip	230
8.4.2.2 Elektroosmotischer Fluss	231
8.4.3 Trennmechanismen	234
8.4.3.1 Kapillarzonenelektrophorese	234
8.4.3.2 Kapillargelelektrophorese	234
8.4.3.3 Kapillar-Isotachophorese	235
8.4.3.4 Isoelektrische Fokussierung in Kapillaren	236
8.4.3.5 Micellare Elektrokinetische Chromatographie	237
8.4.4 CE-Applikationen	240
8.5 Kapillar-Elektrochromatographie	242
8.6 Literatur	243
9 ATOMSPEKTROSKOPIE	245
9.1 Einführung in die Atomspektroskopie	245
9.2 Atomemissionsspektroskopie	247
9.2.1 Flammen-Atomemissionsspektroskopie	247
9.2.2 Induktiv-gekoppeltes Plasma - OES	248
9.3 Atomabsorptionsspektrometrie	250
9.3.1 Aufbau eines AAS-Gerätes	250
9.3.1.1 Funktionsweise einer Hohlkathodenlampe	251
9.3.2 Atomisierung	251
9.3.2.1 Flammen-Absorptionsspektrometrie	251

9.3.2.2 Graphitrohr-Technik	252
9.3.2.3 Hydrid-Technik in der AAS	254
9.3.3 Monochromator und Detektor	254
9.3.4 Änderung der Spektrenverläufe in der AAS	255
9.3.5 Qualitative und quantitative Analyse von Elementen	256
9.4 ICP - MS	258
9.4.1 Prinzipieller Aufbau eines ICP-MS-Gerätes	258
9.4.2 Atomisierung im ICP-MS	259
9.4.3 Interface im ICP-MS	260
9.4.4 Quadrupol als Trennsystem im ICP-MS	261
9.4.5 Detektion	261
9.5 Literatur	262
10 MOLEKÜLSPEKTROSKOPIE	263
10.1 Einführung in die Spektroskopie	263
10.2 UV/VIS-Spektroskopie	264
10.2.1 Welle-Teilchen-Dualismus des Lichtes	265
10.2.2 Spektralbereiche und Spektrenstrukturen	267
10.2.3 Komplementärfarben und Chromophore	269
10.2.4 Verschiebungen der Wellenlängen im Spektrum	272
10.2.5 Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Substanz	274
10.2.6 Lambert-Beer'sches Gesetz	275
10.2.7 Aufbau eines Spektralphotometers	277
10.2.8 Applikationen	279
10.3 Fluoreszenzspektroskopie	281
10.4 Infrarotspektroskopie	283
10.4.1 Historisches	283
10.4.2 Methodische und theoretische Grundlagen	283
10.4.2.1 Infrarotstrahlung im elektromagnetischen Spektrum	284
10.4.2.2 Molekülschwingungen und -rotationen	285
10.4.2.3 Hantelmodell	287
10.4.2.4 Harmonischer/ anharmonischer Oszillatator, Auswahlregeln	288
10.4.2.6 Geräteaufbau und Probenpräparation	290
10.4.3 Fouriertransfirmspektroskopie (FTIR)	292
10.4.4 Ausgewählte Infrarotspektren	294
10.4.4.1 IR-Spektrum von Paraffin	294
10.4.4.2 IR-Spektrum von Aceton	295
10.4.4.3 IR-Spektren von Ascorbinsäure	296
10.4.4.4 IR-Spektren von Folien	298

10.5 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie	300
10.5.1 Magnetfeld, Kernanregung und Kernspin	300
10.5.2 Resonanzbedingung	304
10.5.3 Relaxation	305
10.5.4 Impulsverfahren	306
10.5.5 Chemische Verschiebung	306
10.5.6 Spin-Spin-Kopplung	307
10.5.7 Aufbau eines NMR-Spektrometers	309
10.5.8 Strukturaufklärung	310
10.6 Literatur	313
11 MASSENSPEKTROMETRIE	315
11.1 Aufbau eines Massenspektrometers	315
11.1.1 Einlasssystem	316
11.1.2 Ionenquelle	317
11.1.3 Trennsystem	318
11.1.4 Detektor („Auffänger“)	319
11.1.5 Massenspektrum	319
11.2 Harte Ionisationsarten	320
11.3 Weiche Ionisationen	322
11.3.1 Thermospray Ionisation	322
11.3.2 Chemische Ionisation	322
11.3.3 Fast Atom Bombardement	323
11.3.4 Feldionisation	324
11.3.5 Felddesorption	324
11.3.6 Electrospray	324
11.3.7 Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck	325
11.3.8 Atmosphärendruck Photoionisation	325
11.3.9 Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation	325
11.4 Spektrometertypen	326
11.4.1 Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer	326
11.4.2 Flugzeitmassenspektrometer	327
11.4.3 Quadrupolmassenspektrometer	328
11.4.4 Ionenfallen-Massenspektrometer	328
11.4.5 Tandemmassenspektrometer	329
11.5 Spektrenvergleich: harte vs. weiche Ionisation	330
11.6 Fragmentierungen in der Massenspektrometrie	331

11.7 Laser Desorptions/Ionisations - MS	335
11.7.1 Aufbau von MALDI-TOF-MS-Geräten	336
11.7.2 Probenpräparation	338
11.7.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-MS	340
11.8 Literatur	341
12 KOPPLUNGSTECHNIKEN	343
12.1 Einführung und Systematik	343
12.2 Probenvorbereitung – Trennmethode	345
12.2.1 Head-space – GC und Purge-and-trap – GC	345
12.2.2 SPE – GC und SPE – LC	345
12.2.3 SPME – GC und SPME – LC	347
12.3 Trennmethode – Trennmethode	348
12.3.1 LC – TLC	348
12.3.2 LC – LC (Säulenschalttechnik)	349
12.3.3 GC – GC (Säulenschalttechnik)	352
12.3.4 IEF – SDS-PAGE	353
12.3.5 MS – MS	354
12.4 Trennmethode - Massenspektrometrie	355
12.4.1 Gaschromatographie – Massenspektrometrie	355
12.4.2 Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie	356
12.4.2.1 „Klassische“ LC-MS-Kopplungen	357
12.4.2.1.1 Moving-Belt Interface	357
12.4.2.1.2 μ -LC-Direkteinlass-MS	358
12.4.2.1.3 LC-Thermospray-MS	359
12.4.2.1.4 LC-Fast-Atom-Bombardement-MS	361
12.4.2.1.5 LC-Particle-Beam-MS	361
12.4.2.2 LC – Atmosphärendruck – MS	363
12.4.2.3 LC – Electrospray – MS	365
12.4.2.4 Applikationen der LC – MS – Kopplungen	367
12.4.3 LC – MALDI - TOF – MS	369
12.4.4 CE – MS	370
12.5 Trennmethode – Spektroskopie	371
12.5.1 LC – DAD	371
12.5.2 LC – pcr – VIS	374
12.5.3 CGC – FTIR	375
12.5.4 LC – NMR	377
12.6 Literatur	379

13 OMICS – PROTEOMICS	381
13.1 Einführung in die „OMICs“-Techniken	381
13.2 Das Proteom und seine Beeinflussung	382
13.3 Proteomics vs. „klassische“ Proteinanalytik	383
13.4 Strategien in der Proteom-Analytik	383
13.4.1 Zweidimensionale Elektrophorese	385
13.4.2 MALDI - TOF – MS und Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	386
13.4.3 LC – ESI – MS/MS	390
13.4.4 Ausblick zur Proteomanalytik	393
13.5 Literatur	393
14 SENSITIVE UND SPEZIFISCHE BIOANALYTIK	395
14.1 Biosensoren	395
14.1.1 Einführung	395
14.1.2 Lactatsensor	397
14.1.3 Glucosesensor	398
14.2 Immunoassays	399
14.2.1 Einführung	399
14.2.2 Immunoassay versus Immunosensor	399
14.2.3 Radio-Immunoassay	400
14.2.4 Enzym-Immunoassay	401
14.2.5 Enzymgekoppelter Immunabsorptions-Test	402
14.2.5.1 Kompetitiver ELISA-Test	402
14.2.5.2 Nicht-kompetitiver ELISA-Test	403
14.2.6 HIV-Test	404
14.2.7 Schwangerschafts-Test	405
14.2.8 ELISPOT-Test	406
14.2.9 Drogentest	406
14.1 Literatur	407

15 SPEZIELLE UND ANGEWANDTE BIOANALYTIK	409
15.1 Pharmaka-Analytik mittels HPLC-Methoden	410
15.1.1 Was sind Arzneimittel – was sind Drogen?	410
15.1.2 Saure RP-HPLC von Pharmaka	410
15.1.3 Ionenpaar-HPLC	411
15.1.4 Kapillarelektrophorese	412
15.2 Drogen-Analytik	413
15.2.1 Legale vs. Illegale Drogen	413
15.2.2 Einführung in die Drogenanalytik	413
15.2.3 HPLC-Analytik von Drogen	415
15.2.4 Bestimmung von Cocain (Haar-Analyse)	416
15.2.5 Wissenswertes über Cocain	419
15.3 Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine/Dibenzofurane	420
15.3.1 Vorkommen, Eigenschaften	420
15.3.2 Problematik der Dioxin-Bestimmung	421
15.3.3 Aufarbeitung und GC-MS-Analytik von Dioxinen	422
15.3.4 Toxizität von Dioxinen	425
15.4 Aminosäureanalytik mit Flüssigchromatographie	426
15.4.1 Problematik der Aminosäureanalytik	426
15.4.2 Post column derivatisation	427
15.4.2.1 Derivatisierung mit Ninhydrin	428
15.4.2.2 Derivatisierung mit Fluorescamin	429
15.4.3 Pre colum derivatisation	429
15.4.3.1 <i>Ortho</i> -Phthaldialdehyd	430
15.4.3.2 Phenylisothiocyanat	430
15.4.3.3 Fluorenlymethoxycarbonylchlorid	431
15.4.3.4 Dabsylchlorid	431
15.4.3.5 Dansylchlorid	431
15.4.4 Chromatogramme von Aminosäure-Trennungen	432
15.5 Metallothioneine, Thiolspecies in Zellen	433
15.5.1 Metallothioneine	433
15.5.2 Phytochelatine	435
15.5.3 Glutathion und Thiolspecies	437
15.5.4 Derivatisierung und Detektion von Thiolspecies	439
15.5.4.1 Ellman's-Reagenz	439
15.5.4.2 Sanger's Reagenz	440
15.5.4.3 Substituierte Maleinimide	440
15.5.4.4 Monobrombiman	441
15.5.4.5 o-Phthalaldehyd	441
15.5.4.6 Elektrochemische Detektion	442

15.5.5 HPLC von Thiolen und Disulfiden	443
15.5.5.1 Kovalente Chromatographie	443
15.5.5.2 „Saure“ Reversed-Phase-HPLC	445
15.5.5.3 Electrospray-MS von Glutathion und Metaboliten	447
15.5.5.4 Analyse biologischer Matrices	448
15.5.6 Kapillarelektrophorese von Thiolen und Disulfiden	450
15.5.7 Kapillarelektrophorese von Phytochelatinen	452
15.6 Nucleobasen und Nucleoside in Zellen und Geweben	455
15.6.1 Reversed-Phase- und Ionenpaarchromatographie	456
15.6.2 Kapillarelektrophorese	458
15.7 Zucker in Hydrolysaten und Lebensmitteln	459
15.7.1 Chromatographie an Aminophasen	459
15.7.2 HPAEC-PAD-Technik	463
15.7.3 Kapillarelektrophorese	465
15.8 Zuckeranalytik und Lactoseintoleranz	466
15.8.1 Was ist Lactoseintoleranz	466
15.8.2 Analytik von Glucose, Galactose und Lactose	468
15.8.3 Enzymatischer Abbau von Lactose in Milch	469
15.9 Säuren in biotechnologischen Prozessen	471
15.9.1 Organische Säuren in Fermentationsmedien	471
15.9.1.1 Ionenaustauschchromatographie von organischen Säuren	473
15.9.1.2 Ionenausschlusschromatographie von organischen Säuren	475
15.9.2 Fettsäuren in Hefen und Bakterien	477
15.9.2.1 Modifizierungen und Kapillargaschromatographie	479
15.9.2.2 Kapillargaschromatographie - Massenspektrometrie	482
15.10 Enzyme thermophiler Mikroorganismen	483
15.10.1 Isolierung der Enzymfraktionen	483
15.10.2 Biochromatographie	485
15.11 Nucleotide in Geweben und von DNA-Spalt-produkten	488
15.11.1 Ionenpaarchromatographie	490
15.11.2 Kapillargelelektrophorese von DNA-Fragmenten	491
15.12 Glycan-Strukturen von Glycoproteinen	495
15.12.1 Profilanalysen der Glycane	497
15.12.1.1 Monosaccharid-Mapping mittels HPAEC-PAD	497
15.12.1.2 N-Glycan-Trennungen mit speziellen HPLC-Methoden	498
15.12.2 Strukturanalysen der Glycane	500
15.12.2.1 GC-MS und Methylierungsanalyse	500
15.12.2.2 Fast-Atom-Bombardement	502
15.12.2.3 LC-Electrospray-MS	503

15.12.2.4	MALDI-TOF-MS	503
15.12.2.5	MALDI-PSD-TOF-MS	505
15.12.2.6	¹ H-NMR	509
15.13	Phospholipide in biologischen Extrakten	511
15.13.1	Flüssigchromatographie	511
15.13.2	NMR-Spektroskopie	515
15.14	Literatur	519
Kapitel 15.5		519
Kapitel 15.6		520
Kapitel 15.7		521
Kapitel 15.9		521
Kapitel 15.10		522
Kapitel 15.11		523
Kapitel 15.12		524
Kapitel 15.13		525

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AS	Aminosäure
AC	Affinity Chromatography
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Anion-Exchange Chromatography
AES	Atomemissionsspektroskopie
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMP	Adenosinmonophosphat
ANTS	8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure
APCI	Atmospheric-Pressure Chemical Ionisation
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATZ	Anilinothiazolinon
BAL	Bioaffine Liganden
BAP	2-Amino(6-amidobiotinyl)pyridin
BIN	Barrel in Needle
bp	Basenpaar
CAF	Celluloseacetat-Folie
CC	Covalent Chromatography
CD	Cyclodextrine
Cd-BPs	Cadmium-binding Peptides
CE	Capillary Elektrophoresis
CEC	Capillary Electrochromatography
CF	Continuous Flow
CF-FAB	Continuous-flow Fast-atom-bombardement
CGC	Capillary Gas Chromatography
CGE	Capillary Gel Electrophoresis
CI	Chemische Ionisation
CIEF	Capillary Isoelectric Focussing
CL	Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol)
CSP	Chirale stationäre Phasen

CV-AAS	Cold Vapour-AAS
Cys	Cystein
Cys-Gly	Cystein-Glycin
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
DABS-CL	Dabsylchlorid (4-Dimethylaminoazo-benzol-4'-sulfonylchlorid)
Dansyl-Cl	1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonylchlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DED	Dual Electrochemical Detection
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
Disk	Diskontunierlich
DLI	Direct Liquid Introduction
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
DLPC	Dilinoleylphosphatidylcholin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNFB	2,4-Dinitro-1-fluorbenzen
DNP	Dinitrophenyl
DP	Degree of Polymerisation
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPTU	Diphenylthioharnstoff
DPX	Disposable pipette extraction
DTE	Dithioerythrit
DTNB	5,5'-Dithiobis-[2-nitrobenzoësäure]
DTT	Dithiothreitol
ECD	Electrochemical Detection
ECD	Electron Capture Detector
EI	Electron Impact
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ELSD	Evaporative Light Scattering Detection
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESB	1,1'-[Ethenyldienbis(sulfonyl)]bis-benzen
ESI	Electrospray ionisation
F-AAS	Flammen-AAS
F-AES	Flame-Atom Emission Spectroscopy
FAB	Fast Atom Bombardement
FD	Felddesorption
FFA	Free Fatty Acids

FI	Feldionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
FIR	Fernes Infrarot
FMOC	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSME	Fettsäuremethylester
FTIR	Fourier transform infrared
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNac	N-Acetylgalactosamin
GalNH ₂	Galactosamin
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
GF	Gelfiltration
GF-AAS	Grafitrohr-AAS (Graphitrohr-AAS)
GHz	Gigaherz
GLC	Gas Liquid Chromatography
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcNH ₂	Glucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
GPC	Gelpermeationschromatographie
GSC	Gas Solid Chromatography
GSH	Glutathion (reduziert), γ -Glutamylcysteinylglycin
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidiert)
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hydroxyapatite
HC	Hydroxylapatite Chromatography
HCys	Homocystein
HETP	Height Equivalent to a Theoretical Plate
HF-LPME	Hollow-fibre Liquid-phase Microextraction
HGP	Human Genom Project
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HKL	Hohlkathodenlampe
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPAEC-PAD	High pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
HPCE	High Performance Capillary Elektrophoresis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IC	Ionenchromatographie
ICE	Ion Chromatography Exclusion

ICP	Inductively Coupled Plasma
ICAT	Isotope Coded Affinity Taq
IEC	Ion-Exchange Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IMP	Ion Moderated Partition
IPC	Ionenpaarchromatographie
IR	Infrarot
ISP	Ionenspray
ITP	Isotachophoresis
ITCE	Isotacho Capillary Electrophoresis
JAA	Jod Acetic Acid
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
LC	Liquid Chromatography
LC-FAB-MS	LC-Fast-Atom-Bombardement-MS
LC-TSP-MS	LC-Thermospray-MS
LD	Letale Dosis
LEC	Ligand Exchange Chromatography
LIT	Lactoseintoleranz
LLE	Liquid Liquid Extraction
LOD	Limit of detection
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPME	Liquid-phase microextraction
LSD	Lysergsäurediethylamid
MAGIC	Monodisperse aerosol generator based interface for liquid chromatography
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MALDI-PSD-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Post Source Decay-Time of Flight-Mass Spectrometry
Man	Mannose
MB	Magnetic Beads
mBBr	Monobrombiman
MBI	Moving-Belt-Interface
MC	Micellen
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methyl-amphetamin
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography

MEPS	Microextraction by packed sorbents
MHz	Megaherz
MIP	Molecular imprinting polymers
MNAc	N-Acetyl muraminsäure
MPA	Metaphosphoric Acid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MSD	Mass Selective Detector
MSPD	Matrix solid phase dispersion,
MT	Metallothionein(e)
MW	Molecular Weight
nA	Nano-Amper
NaAc	Natriumacetat
NAM	N-(9-acridinyl)maleinimid
NANA	N-acetylneuraminic acid
NBS ⁻	Thionitrobenzoat-Anion
NEM	N-Ethylmaleinimid
NIR	Nahes Infrarot
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPC	Normalphasenchromatographie
NPM	N-(1-Pyrenyl)maleinimid
NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure (Acid)
NWG	Nachweisgrenze
ODS	Octadecylsilan
OES	Optical Emission Spectroscopy
ONPG	<i>o</i>-Nitrophenol-β-D-galactosid
OPA	<i>Ortho</i>-Phthalodialdehyd
PA	Phosphatidic Acid
pA	Pico-Amper
PAD	Pulsed-Amperometric Detection
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBI	Particle-Beam Interface
PC	Perfusion Chromatography
PC's	Phytochelatin(e)
PC	Phosphatidylcholin
PCB's	Polychlorinated Biphenyles
PCD	Post column derivatisation
PCD	Pre column derivatisation
PCDD	Polychlorierte Dibenz-p-dioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane

PCR	Polymerase Chain Reaction
„pcr“	post column reaction
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phosphatidylethanolamin
PEEK	Polyethylenetherketon
PEG	Polyethyenglycol
PG	Phosphatidylglycerol
pI	Isoelectric point
PI	Phosphatidylisitol
PITC	Phenylisothiocyanat
pl	Picoliter
PLB's	Porous Layer Beads
PLOT-Kapillare	Porous Layer Open Tubular column
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
POP's	Persistant Organic Pollutants
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
PSD	Post source decay
PSH	Protein containing thiol groups
PTC	Phenylthiocarbamoyl-
PTH	Phenylthiohydantoin-
qBBR	Monobromtrimethylammoniumbiman
QM	Qualitätsmanagement
QS	Qualitätssicherung
RAAM	Reagent Array Analysis Method
RAM	Restricted access material
RI	Refractive Index
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonucleic Acid
RP	Reversed-Phase
RPC	RP-Chromatographie
rpm	revolutions per minute
RSH	Low-molecular-weight thiol
SA-CE ⁻	Strongly Acid Cation-exchanger
SB-AE ⁺	Strongly Basic Anion-exchanger
SBA=S-DVB	Strongly Basic Anion-exchanger based on Styrene-Divinylbenzene
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SCOT-Kapillare	Supported Coated Open Tubular column
S-DVB	Styrene-Divinylbenzene
SDME	Single-drop microextraction
SDS	Sodium Dodecylsulfate

SEC	Size-Exclusion Chromatography
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SFC	Supercritical fluid chromatography
SFE	Supercritical fluid extraction
SGE	Scientific Glass Engineering
SLM	Supported Liquid Membrane
SP	Sphingomyelin
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TBA	Tetrabutylammoniumhydroxid
TCA	Trichlor Acetic Acid
TCD	Thermal Conductivity Detector
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylendiamin
TEF	Toxizitätsäquivalentfaktoren
TEQ	Toxic equivalent (Toxizitätsäquivalente)
TFA	Trifluor Acetic Acid
TID	Thermo Ionic Detector
TIC	Total ionic current
TIC	Total ionic chromatogram
TLC	Thin Layer Chromatography
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Tetramethylsilan
TOF	Time of Flight
TSI	Thermospray ionisation
TSP	Thermospray
UV	Ultraviolett
VIS	Visible
WA-CE ⁻	Weakly Acid Cation-exchanger
WB-AE ⁺	Weakly Basic Anion-exchanger
WBA=S-DVB	Weakly Basic Anion-exchanger based on Styrene-Divinylbenzene
WCOT-Kapillare	Wall Coated Open Tubular column
WFR	Wiederfindungsrate
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2-AB	2-Aminobenzamid
2-Py-S-S-2-Py	2,2'-Dipyridyldisulfid
ZNS	Zentralnervensystem

Symbole

A	Peakfläche, Amplitude
A_λ	Absorption
$b_{1/2}$	Peakbreite in halber Höhe (veraltet)
c	Konzentration
c_s (c_{stat})	Konzentration in der stationären Phase
c_m (c_{mob})	Konzentration in der mobilen Phase
D_λ	Durchlässigkeit
d	Schichtdicke
d_p	Partikeldurchmesser
E	Trennimpedanz, Effizienz, Emission,
E	Elektrische Feldstärke
E_λ	Extinktion
e	Elementarladung
F	Flussrate
F_B	Beschleunigende Kraft
F_L	Lorenzkraft
F_R	Reibungskraft
F_s (F_z)	Zentrifugalkraft
f	Reibungskoeffizient
H	theoretische Trennstufen- oder Bodenhöhe
H_0 (B_0)	Magnetfeld
H_{eff}	effektive Magnetfeldstärke
h	Peakhöhe, reduzierte theoretische Trennstufenhöhe, Planck'sches Wirkungsquantum, Stunden
I	Intensität eines Lichtstrahls (geschwächt)
I	Spinquantenzahl oder Kernspin
I_0	Intensität eines Lichtstrahls („Ausgangsintensität“)
I_A	Intensität eines Lichtstrahls (absorbiert)
I_R	Intensität eines Lichtstrahls (reflektiert)

<i>i.D.</i>	innerer Durchmesser
<i>K</i>	Verteilungskoeffizienten, Dissoziationskonstante
<i>K_D</i>	Verteilungskoeffizienten
<i>K_F</i>	Permeabilität
<i>k</i> (<i>k'</i>)	Verteilungs- oder Kapazitätsfaktor
<i>k_R</i>	Reibungskoeffizient
<i>L</i>	Trennsäulenlänge
<i>M</i>	relative Molmasse
<i>M_r (MW)</i>	Molekulargewicht
<i>m</i>	Masse
<i>m_r</i>	relative elektrophoretische Mobilität
<i>N</i>	Trennstufen- oder Bodenzahl
<i>p</i> ⁰	Dampfdruck
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
<i>R_m</i>	relative elektrophoretische Mobilität
<i>R</i> (<i>R_S</i>)	Chromatographische Auflösung
<i>R_{st}</i>	Retentionsfaktor für eine Standardsubstanz
<i>r</i>	Radius, Teilchenradius
<i>s</i>	Sedimentationkoeffizient
<i>T</i>	Tesla, Temperatur
<i>t_{MC}</i>	elektrophoretische Mobilität von Micellen
<i>t_R</i>	Retentionszeit
<i>t₀</i>	Totzeit
<i>U</i>	Spannung
<i>u</i>	lineare Strömungsgeschwindigkeit
<i>V_z</i>	Zwischenkornvolumen
<i>V₀</i>	Totvolumen
<i>V_e</i>	Elutionsvolumen
<i>V_g</i>	Spezifisches Retentionsvolumen
<i>V/V</i>	Volumen pro Volumen
<i>w_b</i>	Peak basisbreite
<i>w_h</i>	Peakbreite in halber Höhe
<i>y</i> ⁰	Aktivitätskoeffizient

z_R	Wanderungstrecke eines Analyten
z_{st}	Wanderungstrecke einer Standardsubstanz
α	Trennungsfaktor, Selektivität
γ	Dichte, gyromagnetisches Verhältnis
δ	chemische Verschiebung
ε_λ	Extinktionskoeffizient
ε_T	Porosität
ζ	Zeta (-Potential)
η	Viskosität
θ	Rotationswinkel
λ	Wellenlänge
λ_{ex}	Extinktionswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
μ	magnetisches Moment (Magnetfeld)
μ	reduzierte Masse
μ_{MC}	elektrophoretische Mobilität der Micellen
μ_{eo}	elektroosmotische Mobilität
v	reduzierte lineare Geschwindigkeit, Frequenz, Sedimentationsgeschwindigkeit
v_i	Wanderungsgeschwindigkeit des Ions
\tilde{v}	Wellenzahl
v_i	Mobilität
ρ	Dichte
σ	Abschirmkonstante, Standardabweichung
σ^2	Peakdispersion
τ	Impulslänge
φ	dimensionsloser Strömungswiderstand
ω	Winkelgeschwindigkeit

1 Einleitung

Die Analytik durchdringt heute alle Lebens- und Arbeitsbereiche und wird meist für spezielle Fachgebiete gesondert ausgewiesen (Analytische Chemie, Umweltanalytik, Bioanalytik, Lebensmittelanalytik, Instrumentelle Analytik u.v.a.). In diesem Buch stehen hauptsächlich instrumentelle Methoden im Mittelpunkt, die zur Lösung analytischer/bioanalytischer Fragestellungen dienen sollen.

Das Gebiet der Instrumentellen Analytik erweitert sich rasant, wenn man die neuen Entwicklungen innerhalb der Miniaturisierung (Laborchips) oder die analytischen Kopplungstechniken verfolgt.

Im Mittelpunkt stehen die Grundlagen und Funktionsweisen der instrumentellen Methoden. Andererseits liegen der methodische Fokus und die Applikationen auf bioanalytischen Fragestellungen. Insofern werden Titel und Inhalt des Buches als „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“ ausgewiesen.

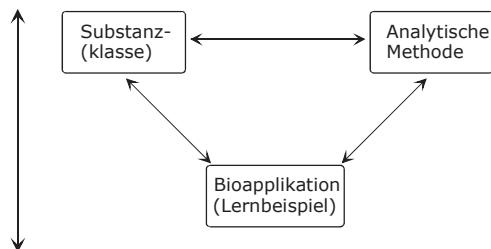
Die Isolierung, Reinigung, qualitative und quantitative Analyse von Proteinen und Enzymen, Glycoproteinen, Oligosacchariden, Nucleinsäuren, Lipiden und anderer biologischer Substanzen ist Gegenstand der Bioanalytik. Das dafür eingesetzte Arsenal an chromatographischen, elektrophoretischen und spektroskopischen Methoden wird in diesem Buch behandelt. Weitere Schwerpunkte sind die Kopplungstechniken und präanalytische Methoden, die für kleine Moleküle und hochmolekulare Biosubstanzen erweitert wurden. Schließlich erfolgen auch kurze Einführungen in die Gebiete Biosensoren, Immunoassays und Proteomics sowie Applikationen zu den kleinen und großen Biosubstanzen.

Ein Hauptanliegen des Buches besteht darin, das analytische Verständnis für eine kombinierte Methodenanwendung zu vertiefen. Voraussetzung ist ein Basiswissen über Prinzipien, Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit einzelner (bio)-analytischer Methoden.

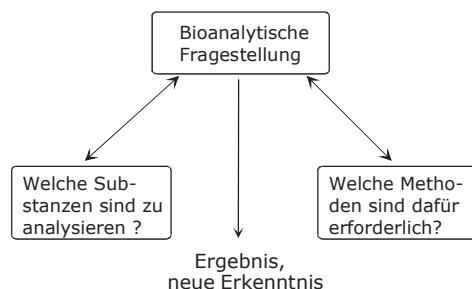
Die Abbildung 1.1 veranschaulicht dieses Konzept und soll als eine Art Leitfaden dienen. Zuerst müssen die theoretischen und praktischen Grundlagen einer Analysenmethode erlernt werden, um sie erfolgreich praktizieren zu können. Dabei soll im ersten Schritt der Methodenanwendung von einer bekannten und bereits methodisch gelösten Analyse ausgegangen werden. Beispielsweise ist es ratsam, vor der chromatographischen Reinigung eines Enzymgemisches die Chromatographiesäule anhand von Proteinstandards zu charakterisieren und zu optimieren.

Das kombinierte Anwenden instrumenteller und bioanalytischer Methoden ist heute in einem biochemischen, biotechnologischen, toxikologischen, lebensmittelchemischen, biomedizinischen oder klinischen Labor allgemeine Praxis.

1. Schritt : Methode erlernen und praktizieren



2. Schritt : Methode ("als Mittel zum Zweck") zur Lösung einer bioanalytischen Fragestellung

**Abb. 1.1** Methode erlernen und praktizieren

Ziel des zweiten Schrittes ist es demzufolge, auf der Grundlage fundierter experimenteller Kenntnisse über mehrere bioanalytische Methoden diese „als Mittel zum Zweck“ zu nutzen und bioanalytische Fragestellungen wie z.B. die Reinigung und Charakterisierung eines unbekannten Enzyms oder Metallothioneins, die Strukturaufklärung von Lipiden und ihrer Fettsäuremoleküle sowie die Charakterisierung eines Glycoproteins hinsichtlich seiner Kohlenhydratseitenketten (Glycane) zu lösen.

In Abhängigkeit der Fragestellung, die z.B. auf Grund der hohen Komplexität der biologischen Matrix und der zu analysierenden Substanzklassen sehr kompliziert sein kann, sind die verschiedenen Methoden auszuwählen, zu optimieren und in ihrer Reihenfolge festzulegen und anzuwenden.

Das neu konzipierte Buch „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“ beinhaltet sowohl herkömmliche Analysenprinzipien, -methoden und -verfahren, Spezialisierungen, Weiter- und Neuentwicklungen in der Analytik als auch praktische und kombinierte Anwendungen zur Lösung (bio)analytischer Fragestellungen und Probleme in der Routine und Forschung.

Das Buch beginnt mit ausgewählten Abschnitten über Struktur und Funktion von Proteinen, Nucleinsäuren, Glycoproteinen und Lipiden einschließlich ihrer entsprechenden Grundbausteine (Aminosäuren/Peptide, Nucleobasen/Nucleoside, Kohlenhydrate/Glycane, Fettsäuren/Kohlenwasserstoffe). Neu hinzugekommen sind Pharmaka, Vitamine und Farbstoffe.

Damit soll dem „Nicht-Biwissenschaftler“ ein erster Einstieg in die einfachen Grundlagen der (analytischen) Biochemie vermittelt werden. Das Lesen und das Studium der weiterführenden Spezialliteratur ist unbedingt notwendig und soll dazu anregen, fundierte und umfangreiche Kenntnisse in den Biowissenschaften zu erwerben und diese innerhalb bioanalytischer Arbeiten zu nutzen.

Das danach anschließende Kapitel über präanalytische Methoden gliedert sich in Extraktions- bzw. Anreicherungstechniken (LLE: *liquid liquid extraction*, ASE: *accelerated solvent extraction*) SFE: *supercritical fluid extraction*, Head-Space, Purge and Trap, SPE: *solid phase extraction*, MSPD: *matrix solid phase dispersion*, SPME: *solid phase micro extraction*), die vor allem für niedermolekulare Analyte eingesetzt werden. Neu sind Methoden wie Microextraction by packed sorbents (MEPS), Liquid-phase microextraction (LPME), Stir bar sorptive extraction (SBSE), Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) oder Disposable pipette extraction (DPX). Ein weiterer Schwerpunkt sind Methoden zur Reinigung und Anreicherung von Biopolymeren (Proteinen). An den Beispielen Lysozymbehandlung, Aussalzen, Lyophilisation, Dialyse, Ultrazentrifugation, Batch-Sorption, Flüssig-flüssig-Extraktion und Filtration werden ihre Prinzipien und Funktionsweisen kurz und anschaulich dargestellt. Erweitert wird das Kapitel durch Erklärungen zum Einsatz von Magnetic beads, Restricted access materials (RAM) und Molecular imprinting polymers (MIP).

Ohne eine exakte Probenvorbereitung und Probenkonzentrierung ist der Einsatz sehr leistungsfähiger und empfindlicher instrumenteller Analysenmethoden meist fehlerhaft, nicht zielführend und oft zwecklos.

Einen besonderen Schwerpunkt bilden die chromatographischen Trennmethoden, wobei ein Hauptaugenmerk auf der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC: *high performance liquid chromatography*) liegt. Sie wurde in den 1960-er Jahren auf der Grundlage der theoretischen und praktischen Kenntnisse aus der klassischen Flüssigchromatographie sowie aus der Gas- und Dünnschichtchromatographie entwickelt. Ab 1970 kamen die ersten kommerziellen HPLC-Geräte auf den Markt. Zu den Pionieren dieser faszinierenden Trennmethode gehören u.a. Giddings, Snyder, Knox, Kirkland, Huber, Engelhardt und Unger. Am Anfang der HPLC-Entwicklung konnten nur niedermolekulare Substanzen analysiert werden, für die die verschiedensten methodischen Varianten und Trennsysteme entwickelt wurden. Dazu gehören die Herstellung chemisch modifizierter Silicagele wie Reversed-Phase-Materialien (RP-Phasen), Amino- oder Diolphasen. Für spezielle Trennungen vor allem in der Pharmaforschung werden chirale Trennsysteme (Cyclodextrine, Pirkle-Phasen) eingesetzt.

Die Chromatographie wurde nun in drei Kapitel eingeteilt:

Der erste Teil umfasst die klassische LC, HPLC sowie die seit ca. 2004 etablierte UHPLC (Ultra fast HPLC). Darin sind auch Grundlagen zu Core Shell Materialien, Monolithischen Trennsäulen und zur Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) enthalten.

Das zweite Chromatographie-Kapitel fokussiert vor allem auf Unterschiede zwischen Ionen (organische/anorganische) und Biomolekülen (Proteinen); zeigt aber auch Gemeinsamkeiten auf. Damit soll die große Spannweite der heutigen Flüssigchromatographie dokumentiert werden.

Die Flüssigchromatographie von organischen und anorganischen Ionen beinhaltet unterschiedliche Trennsysteme wie ICE (*ion chromatography exclusion*), IEC (*ion exchange chromatography*), IC (*ion chromatography*), IPC (*ion pair chromatography*) und HPAEC-PAD (*high pH anion exchange chromatography – pulsed amperometric detection*). Polymerphasen auf Styren-Divinylbenzen-Basis (S-DVB) werden in der HPAEC-PAD, ICE, IC und LEC (*ligand exchange chromatography*) angewandt. Die HPAEC-PAD-Technik ist vor allem prädestiniert für empfindliche Analysen mono- und oligomerer Kohlenhydrate (als Anionen vorliegend) im ppb-Bereich. ICE und IEC dienen u.a. zur Trennung von organischen Säuren, Zuckern, Zuckeralkoholen und von Metaboliten, die insbesondere in Fermentationsmedien oder Nahrungsmitteln vorkommen. Mittels Ionenchromatographie können sowohl anorganische Kationen als auch Anionen getrennt und detektiert werden.

Der zweite Teil im zweiten Chromatographie-Kapitel befasst sich mit der Analyse von hochmolekularen Biomolekülen für die zu Beginn der 1980-er Jahre geeignete hydrophile Silicagele und Polymere ohne denaturierend wirkende Eigenschaften synthetisiert wurden. Durch die Herstellung dieser „Biopolymer-Trennsäulen“ und mit der Einführung der FPLC (*fast protein liquid chromatography*) erfolgte innerhalb der Flüssigchromatographie die Etablierung des Gebietes der Biochromatographie („BioLC“). Diese neuen Varianten, Makromoleküle und insbesondere Proteine schnell und effizient unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität zu trennen und zu reinigen, bewirkten entscheidende Fortschritte innerhalb der Biochemie, Biomedizin, Genetik und Molekularbiologie. Die Biopolymere können mit Hilfe dieser hydrophilen Trennphasen nach ihrer Größe (SEC: *size exclusion chromatography*), Polarität (IEC) oder Hydrophobizität (HIC: *hydrophobic interaction chromatography*) fraktioniert werden. Hoch selektive Trennungen von komplexen Biopolymergemischen gelingen mit Hilfe der Affinitätschromatographie (AC: *affinity chromatography*) bzw. durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Weitere spezielle chromatographische Methoden sind die kovalente Chromatographie (CC: *covalent chromatography*) oder die Perfusionschromatographie. Neu hinzugekommen ist die „Metallchelat-Chromatographie“, die vor allem routinemäßig angewandt wird.

Das dritte Chromatographie-Kapitel beinhaltet die Grundprinzipien der Dünn-schichtchromatographie (TLC: *thin layer chromatography*) und der Kapillargas-chromatographie (CGC: *capillary gas chromatography*).

Innerhalb der CGC werden vor allem Einsatzmöglichkeiten und Funktionsweisen der Detektoren (FID: *flame ionisation detector*, MSD: *mass selective detector*, ECD: *electron capture detector*, TID: *thermo ionic detector*, WLD: Wärmeleitfähigkeitsdetektor) aufgezeichnet und verglichen. Theoretische Grundlagen, Optimierungen und Applikationen ergänzen diesen Abschnitt.

Das Gebiet der Elektrophorese blieb weitestgehend unverändert. Es beinhaltet Separationsmechanismen sowohl für die klassische (*slab gel*) Elektrophorese als auch die Kapillarelektrophorese (CE: *capillary electrophoresis*). Die klassische Elektrophorese, die bereits Ende der 30-er Jahre durch Arbeiten von Arne Tiselius bekannt wurde, gehört zu den weitverbreitetsten Standardmethoden in der Proteinanalytik und -forschung. Im Mittelpunkt stehen die Serumweißelektrophorese (CAF: „Celluloseacetatfolien“-Elektrophorese), SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis*) und die IEF (*isoelectric focussing*).

Gegenüber der Kapillarelektrophorese, die seit Ende der 1980-er Jahre in den Biowissenschaften eine rasche Verbreitung erfährt, werden in diesem Buch Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der Trennprinzipien und -phänomene aufgezeigt.

Ihnen gemeinsam ist die Technik der Zonenelektrophorese. Nach Anlegen einer Spannung beginnen die in einem Puffer gelösten Probemoleküle zu wandern und positionieren sich entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit im Trenngel.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese (*gel electrophoresis*) und Isoelektrischen Fokussierung, die beide auch in der Kapillarelektrophorese zu den Standardmethoden gehören, werden die Biosubstanzen nach ihrer Molekülgröße bzw. nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt.

Die Micellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC: *micellar electrokinetic chromatography*) ist eine Besonderheit innerhalb der CE-Methoden. Hintergrund ist, dass ungeladene (neutrale) Moleküle im elektrischen Feld identische Wanderungszeiten besitzen und im Elektropherogramm als Gesamtpeak erscheinen würden. Sogenannte Micellen (SDS) bilden mit diesen Molekülen in der Kapillare geladene Komplexe, so dass ihre Trennung als Einzelpeaks erfolgt.

Weiterhin werden methodische und apparative Grundlagen der Kapillarelektrophorese wie Injektionstechniken, Charakteristika der Trennkapillaren und Detektionsprinzipien vorgestellt. Neben dem „Elektrophorese-Prinzip“ ist der elektroosmotische Fluss (EOF: *electroosmotic flow*) für die Trennung ein entscheidender Faktor.

Die Atomspektroskopie spielt in der Bioanalytik eine untergeordnete Rolle. Andererseits ist sie in der Instrumentellen Analytik fest etabliert. AAS (*atom absorption spectroscopy*), OES (*optical emission spectroscopy*) und ICP-MS (*inductively coupled plasma-MS*) dienen der Elementanalytik, die für die Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten und in der Umweltanalytik besonders wichtig ist.

Im Kapitel Molekülspektroskopie werden die Grundlagen der UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie beschrieben. Damit können unbekannte Substanzen nur dann annähernd identifiziert werden, wenn chromophore Gruppen in ihrer Struktur vorhanden sind bzw. durch Derivatisierung gekoppelt werden. Nützlich sind Datenbanken für die entsprechenden Substanzklassen, die genaue Spektrenabgleiche ermöglichen. Gute Spektreninformationen liefern auch sogenannte DAD's (*diode array detectors*). Aussagekräftiger ist meist die IR- bzw. FTIR- (*fourier transform infrared*) Spektroskopie, die den Nachweis von funktionellen Gruppen

und unterschiedlichen chemischen Bindungen ermöglicht. Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR: *nuclear magnetic resonance*) und auch z.T. die Massenspektrometrie (MS: *mass spectrometry*) sind die Methoden der Wahl, mit der die Struktur einer unbekannten Substanz aufgeklärt werden kann. Die wichtigsten Grundlagen der NMR wie Resonanz, Relaxation, Spin-Spin-Kopplung und chemischen Verschiebung sowie die Impulsverfahren werden erörtert. Insbesondere die ^1H - und ^{13}C -NMR-Techniken sind für die Aufklärung komplizierter Molekülstrukturen unverzichtbar und werden in ihren Grundprinzipien kurz dargestellt.

Im Kapitel Massenspektrometrie (MS) erfolgt die Gegenüberstellung der Prinzipien von harten (EI: *electron impact*) und weichen Ionisationsarten. Letztere sind auf Grund der geringen Fragmentierungsreaktionen für Molekulargewichtsbestimmungen (MW: *molecular weight*) von Biomolekülen sehr gut geeignet. Es werden die Grundlagen der Chemischen Ionisierung (CI: *chemical ionisation*), der FAB- (*fast atom bombardement*), der Thermospray- (TSI: *thermospray ionisation*) und Electrospray-Technik (ESI: *electrospray ionisation*) beschrieben und diskutiert. Hinzu kommen Feldionisation (FI: *field ionisation*) und Felddesorption (FD: *field desorption*) sowie die in der LC-MS-Kopplung neben Electrospray meist integrierten APCI- (*atmospheric pressure chemical ionisation*) oder APPI-Interface-Module (*atmospheric pressure photoionisation*).

Weiterhin werden die Funktionsweisen verschiedener Spektrometertypen wie Magnetfeld-Sektorfeld-, Flugzeit-, Quadrupol- oder Tandemmassenspektrometer (MS/MS) kurz erläutert. Dazu gehören auch verschiedene Ionenfallen (*ion traps*).

Das Flugzeitmassenspektrometer (TOF: *time of flight*) dient in der MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation – mass spectrometry*), die auf Arbeiten von Karas und Hillenkamp Ende der 1980-er Jahre zurückgeht, als Trennsystem. Moleküle, die mit einer überschüssigen organischen Matrix versetzt wurden, bilden während des Beschusses mit einem Laserstrahl sogenannte Quasimolekülionen, die im Flugzeitmassenspektrometer nach ihrer Molekülgröße getrennt und als Molekülionenpeak registriert werden. Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Technik können in wenigen Minuten sehr präzise und empfindliche Molekulargewichtsbestimmungen von Biomolekülen durchgeführt werden.

Aber auch spezielle Modifikationen wie MALDI-PSD-TOF-MS (PSD: *post source decay*) ermöglichen selektive und kontrollierte Fragmentierungen und eindeutige Identifizierungen definierter Molekülgruppen von Biosubstanzen.

Signifikante methodische Fortschritte verbunden mit erweiterten Applikationsbereichen sind bei den Kopplungstechniken (*coupling or hyphenated techniques*), zu verzeichnen. Die meisten analytischen Methoden können miteinander gekoppelt werden, wobei der Fokus in der Regel auf On-line-Kombination liegt. In diesem Kapitel werden innerhalb von 4 Gruppen die Kopplungen „Probenvorberarbeitung-Trennmethode“ (SPME-GC oder SPE-LC), „Trennmethode-Trennmethode“ (GC-GC, LC-TLC, LC-LC, MS-MS), „Trennmethode-Massenspektrometrie“ (GC-MS, LC-MS, LC-MALDI-MS, CE-MS) und „Trennmethode-Spektroskopie“ (LC-DAD, GC-FTIR, u.a.) vorgestellt und beschrieben.

Die CGC-MS-Kopplung ist fest verankert innerhalb der Instrumentellen und Umweltanalytik, während die On-line-Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-ESI-MS, LC-APCI-MS) sowie MALDI-TOF-MS heute zu den Standardmethoden der Bioanalytik zählen.

Dies sind schon spezielle instrumentelle und bioanalytische Methoden, die in der Anschaffung und im Betreiben neben der NMR auch sehr kostenintensiv sind.

Andererseits gehören diese „Werkzeuge“ heute schon zu den Standardmethoden der modernen Instrumentellen Bioanalytik und sollten stärker in den Fokus der Analytiker und der Studierenden rücken.

Die Themen zur „Angewandten Bioanalytik“ wurden stärker differenziert. Für das prägende Arbeitsgebiet der Bioanalytik „Proteomics“ ist ein Extrakapitel entstanden und die *Biosensoren* und *Immunoassays* sind innerhalb der „Sensitiven und spezifische Bioanalytik“ verankert. Sie wurden vorerst inhaltlich nicht erweitert, um dem stark aktualisierten Kapitel „Spezielle und angewandte Bioanalytik“ mehr Raum zu verschaffen. Als Applikationen, die u.a. aus eigenen analytischen Arbeiten resultieren, blieben dabei die Kapitel „*Metallothioneine, Thiolspecise in Zellen*“, „*Nucleobasen und Nucleoside in Zellen und Geweben*“, „*Zucker in Hydrolysaten und Lebensmitteln*“, „*Säuren in biotechnologischen Prozessen*“, „*Enzyme thermophiler Mikroorganismen*“, „*Nucleotide in Geweben und von DNA-Spaltprodukten*“, „*Glycan-Strukturen von Glycoproteinen*“, „*Phospholipide in biologischen Extraktten*“ im Wesentlichen erhalten.

Neu hinzu kommen Applikationen zur „Pharmaka-Analytik“, die einen Vergleich zwischen HPLC (saure RP-HPLC, Ionenpaar-HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) beinhalten. Innerhalb der „Drogenanalytik“ geht es um die Nachweisbarkeit dieser Species im Blut und Urin sowie um die GC-MS-Analytik von Cocain und seinen Metaboliten (Benzoyllecgonin, Methylecgonin) in Haaren. Bei der Bestimmung von „Polychlorierten Dibenz-p-dioxinen und Dibenzofuranen (PCDD/PCDF)“ wird gezeigt, wie winzig klein Analytmengen im Pico gramm- (pg) oder auch Femtogramm(fg)-Bereich sind und welche Anforderungen daraus an eine Spurenanalytik (Probenaufarbeitung, Kopplung hochauflösenden CGC mit einem hochauflösenden MS) resultieren. Das Kapitel „Aminosäureanalytik“ verdeutlicht wiederum die Problematik der flüssigchromatographischen Trennung von Species, die sich gravierend in ihren Polaritäten unterscheiden. Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Derivatisierung (post column detection) und Anwendung von Studengradienten mit mehreren Puffern ist eine etablierte analytische Technik (Aminosäure-Analysatoren). Die Detektion erfolgt mit Ninhydrin oder auch mit *Ortho*-Phthaldialdehyd (OPA). Ein anderer Ansatz (pre column detection) ist die Überführung der Aminosäuren in relativ einheitlich (unpolare) Derivate, die mittels RP-HPLC schnell getrennt und mit der Fluoreszenzdetektion z.B. als OPA-Derivate sehr empfindlich nachgewiesen werden können.

Schließlich wurde noch ein Kapitel zur Zuckeranalytik aufgenommen, das sich mit der Problematik „Lactoseintoleranz“ beschäftigt.

Du bist auf dem Weg zum Erfolg,
wenn Du begriffen hast, daß Verluste
und Rückschläge nur Umwege sind.

C. W. Wendte

2 Biomoleküle

2.1 Proteine

Die Bezeichnung Protein wurde von Berzelius im Jahre 1836 von dem griechischen Wort proteios („erstrangig“) abgeleitet und soll auf die Wichtigkeit dieser Substanzklasse hinweisen. Die Proteine gehören neben den Nucleinsäuren, Oligosacchariden und Lipiden zu den biologischen Bausteinen des Lebens. Die Proteine sind in ihrem „Bauplan“ relativ einheitlich angeordnet und in allen Organismen enthalten, unabhängig davon, um welche Art, Gestalt oder Form von Lebewesen es sich handelt. Diese Biopolymere wirken entscheidend an der Entwicklung und Steuerung der biologischen Lebensprozesse mit.

Proteine sind hochmolekulare, überwiegend amorphe, optisch aktive Naturstoffe, die aus einzelnen Aminosäuren bestehen. Die Molekülmassen liegen zwischen ca. Zehntausend und einigen Millionen Dalton. Einige wichtige Funktionen der Proteine sind in den folgenden Punkten kurz zusammengestellt. Weitere Informationen sind den Lehrbüchern der Biochemie zu entnehmen.

Enzymatische Katalyse

Proteine sind meist biologisch aktiv und wirken in (bio)chemischen Prozessen als Katalysatoren. Derart spezifische Biokatalysatoren werden als Enzyme bezeichnet. In Anwesenheit eines Enzyms wird die Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion erniedrigt und die Reaktionsgeschwindigkeit wird um ein Vielfaches (z.T. millionenfach) erhöht.

Transport- und Speicherfunktionen

Proteine fungieren in den Organismen als Transportmittel. Zu den bekanntesten Phänomenen gehören der Transport von Sauerstoff in den Erythrocyten durch Hämoglobin und der Transport von Eisen im Blut durch Transferrin. Das Protein Ferritin besitzt eine Speicherfunktion und bindet Eisen als Komplex in der Leber.

Stütz- und Gerüstfunktionen

Faserproteine üben in den Knochen und Geweben Stützfunktionen aus. Wichtigster Vertreter ist das Kollagen, das auch in Sehnen, Knorpeln oder in den Zähnen vorkommt. Charakteristisch sind seine Zugfestigkeit, mechanische Stabilität und die Unlöslichkeit seiner Faserstruktur.

Immunabwehr

Hochspezifische Proteine, die als Antikörper bezeichnet werden, erkennen und binden in den Organismen Fremdstoffe, die sogenannten Antigene. Diese können ebenfalls Proteine, aber auch Viren oder Krebszellen sein, die durch die Immunabwehr der Antikörper unschädlich gemacht werden.

2.1.1 Aminosäurestrukturen

Aminosäuren sind die Ausgangssubstanzen für die Proteinsynthese, dienen als Nährstoffe und sind am Energiestoffwechsel beteiligt.

Die Proteine setzen sich aus 20 verschiedenen α -Aminosäuren zusammen. Ihre Eigenschaften und insbesondere der amphotere Charakter werden durch die basische Aminogruppe (NH_3^+) und die saure Carboxylgruppe (COO^-) geprägt.

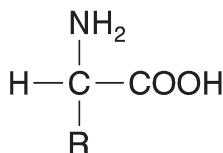


Abb. 2.1 Struktur einer neutralen Aminosäure. R = Seitenkette

Weiterhin sind ein Wasserstoffatom (H) und eine Seitenkette R um das Kohlenstoffatom der Aminosäure gruppiert.

Ist in der Kette R eine weitere Aminogruppe angeordnet, handelt es sich um eine basische Aminosäure. Saure Aminosäuren enthalten dagegen eine weitere Carboxylgruppe in der Seitenkette.

Wie aus den folgenden Strukturabbildungen hervorgeht, dienen für die Aminosäuren die ersten drei Buchstaben ihres Namens als Abkürzung. Ausnahmen bilden Asparagin (Asn), Glutamin (Gln), Isoleucin (Ile) und Tryptophan (Trp). Sie können auch mit einem in der „Sprache“ der Biochemiker üblichen Symbol gekennzeichnet werden.

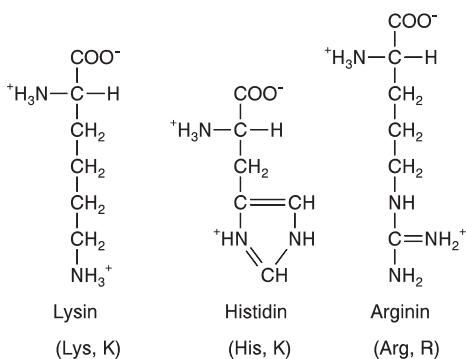
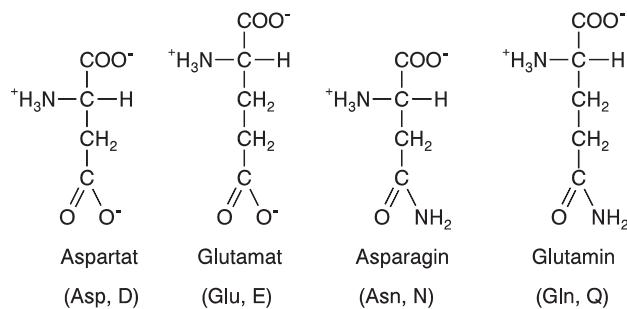
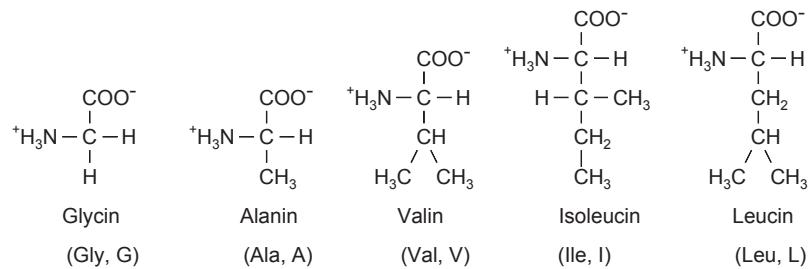


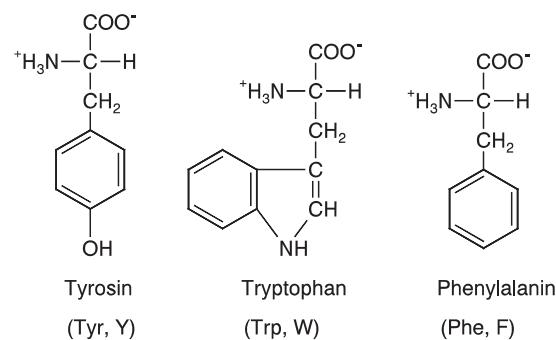
Abb. 2.2 Basische Aminosäuren

**Abb. 2.3** Saure Aminosäuren

Im Fall der neutralen Aminosäuren tragen die funktionellen Gruppen der Kette kaum oder gar nicht zur Dissoziation bei.

**Abb. 2.4** Aliphatische Aminosäuren

Aromatische Aminosäuren enthalten chromophore Gruppen, die ihren Extinktionskoeffizienten und den des Gesamtproteins deutlich erhöhen.

**Abb. 2.5** Aromatische Aminosäuren

Diese Proteine werden deshalb im mittleren UV-Bereich oder durch Fluoreszenz mit erhöhter Empfindlichkeit detektiert.

Aminosäuren mit schwefelhaltigen Seitenketten können zwischen einzelnen Proteinbereichen sulfidische Bindungen ausbilden.

Charakteristisch für Serin und Threonin ist die Hydroxylgruppe in der aliphatischen Seitenkette. Das Prolin gehört auf Grund seiner Iminogruppe zu den sekundären Aminosäuren.

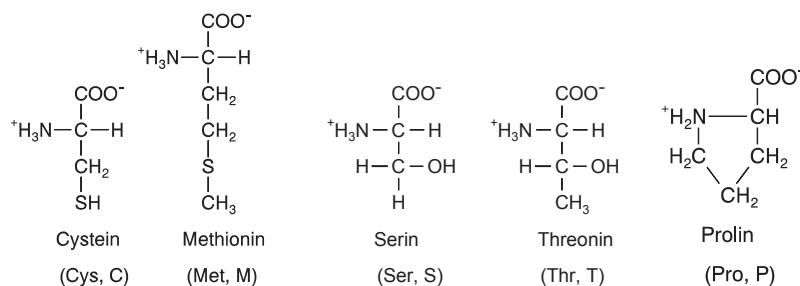


Abb. 2.6 Aminosäuren mit schwefelhaltigen Seitenketten

Abb. 2.7 Aminosäuren bestehend aus aliphatischer Seitenkette mit Hydroxylgruppe

Abb. 2.8 Sekundäre Aminosäure

2.1.1.1 Zwitterionenform und pH-Abhängigkeit

In Abhängigkeit vom pH-Wert liegen die Aminosäuren in nicht ionisierter oder in ionisierte Form vor. Im neutralen pH-Bereich ($\text{pH} = 7$) sind beide funktionellen Gruppen ionisiert und die Aminosäuren treten als Zwitterionen auf. Die NH_3^+ -Gruppe ist protoniert und die COO^- -Gruppe liegt im dissozierten Zustand vor.

Durch Zufuhr von Wasserstoffionen wird die Dissoziation der Carboxylgruppe im sauren Milieu reduziert und die Aminosäure geht im stark sauren Bereich in ihre nichtionisierte Form über, während die Aminogruppe weiterhin protoniert ist.

In stark basischen Lösungen tritt der entgegengesetzte Effekt ein. Die Carboxylgruppe ist ionisiert und die Aminogruppe liegt in neutraler Form vor.

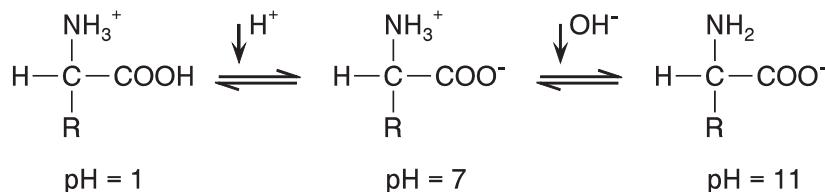


Abb. 2.9 Ladungszustand einer Aminosäure in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die unterschiedlichen Ionisierungsformen von Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert können sowohl für die Aminosäuren als auch für die Proteine zur selektiven chromatographischen und elektrophoretischen Trennung ausgenutzt werden.

2.1.1.2 pK-Werte und isoelektrischer Punkt

Die Amino- und Carboxylgruppe einer Aminosäure können Protonen aufnehmen oder abgeben. Beide fungieren als Säuren (SH) und können entsprechend der Gleichung 2.1 dissoziieren.



Setzt man die entsprechenden Konzentrationen in das Massenwirkungsgesetz ein, erhält man den Ausdruck für die Dissoziationskonstante K .

$$K = \frac{[\text{S}^-][\text{H}^+]}{[\text{SH}]} \quad (2.2)$$

Nach dem Logarithmieren dieser Formel resultiert der folgende Ausdruck:

$$\lg \frac{[\text{S}^-]}{[\text{SH}]} - \lg K = -\lg [\text{H}^+] \quad (2.3)$$

Da der pH-Wert der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration ist (Gleichung 2.4), wird der pK-Wert als negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante definiert (2.5).

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+] \quad (2.4)$$

$$\text{pK} = -\lg K \quad (2.5)$$

Durch Einsetzen von Gleichungen 2.4 und 2.5 in 2.3 resultiert folgender Ausdruck:

$$\text{pH} = \text{pK} + \lg \frac{[\text{S}^-]}{[\text{SH}]} \quad (2.6)$$

Dieser besagt, dass der pH-Wert gleich dem pK-Wert (der Aminosäure) ist, wenn die Säure genau zur Hälfte dissoziiert ist.

Der isoelektrische Punkt (pI oder IEP , P_I) eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung Null beträgt.

2.1.1.3 D- und L-Konfiguration

Die proteinogenen Aminosäuren treten nur in der L-Form auf. Die Abbildung 2.10 zeigt, dass auf Grund der tetraedrischen Anordnung der Gruppen (NH_3^+ -, COO^- , H^+ -Gruppe und Seitenkette R) um das Kohlenstoffatom (α -C-Atom) zwei spiegelbildlich gegenüberstehende Formen entstehen, die als L- und D-Isomer bezeichnet werden. Diese Strukturen verleihen den Aminosäuren ihre optische Aktivität.

Durch die Entwicklung chiraler stationärer Phasen und mobiler Selektoren können strukturell so geringfügig unterschiedliche isomere Verbindungen chromatographisch getrennt und quantifiziert werden.

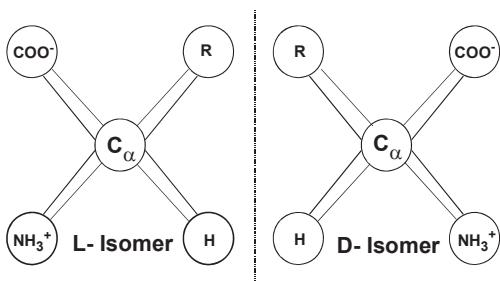


Abb. 2.10 Konfiguration des D- und L-Isomeren einer Aminosäure

2.1.2 Proteinstrukturen

2.1.2.1 Peptidbindung

In Proteinen sind die einzelnen Aminosäuren durch Peptidbindungen miteinander verknüpft. Die α -Carboxylgruppe der Aminosäure 1 reagiert mit der α -Aminogruppe der Aminosäure 2 unter Austritt von Wasser. Beide Aminosäuren bilden ein Dipeptid, drei oder fünf Aminosäuren entsprechend ein Tri- oder Pentapeptid.

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite der Hydrolyse. Für die Synthese einer Peptidbindung ist deshalb ein hoher Energieaufwand notwendig, während ihre Spaltung freiwillig abläuft.

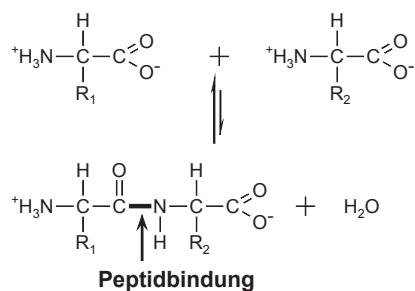


Abb. 2.11 Entstehung der Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren

2.1.2.2 Sulfidbindung

Einige Proteine enthalten Sulfidbindungen bzw. Sulfidbrücken. Diese entstehen aus den Sulfhydrylgruppen (-S-H) der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein durch Oxidation. Das resultierende Disulfid wird als Cystin bezeichnet. Insbesondere extrazelluläre Proteine besitzen diese sulfidischen Querverbindungen.

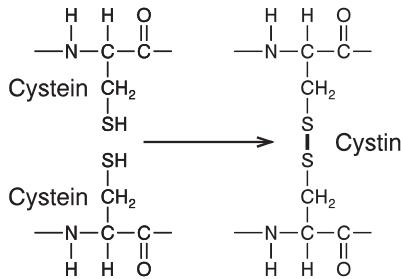


Abb. 2.12 Entstehung der Disulfidbindung

2.1.2.3 Aminosäuresequenz

Die Aminosäuresequenz ist die Aufeinanderfolge der einzelnen Aminosäuren in einem Protein. Sie enthalten nur L-Aminosäuren, die kovalent über Peptidbindungen verknüpft sind. Die Aminosäuresequenz von Rinderinsulin (S. Sanger 1953) ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Das Protein besteht aus einer A- und B-Kette, die über Disulfidbindungen verbunden sind.

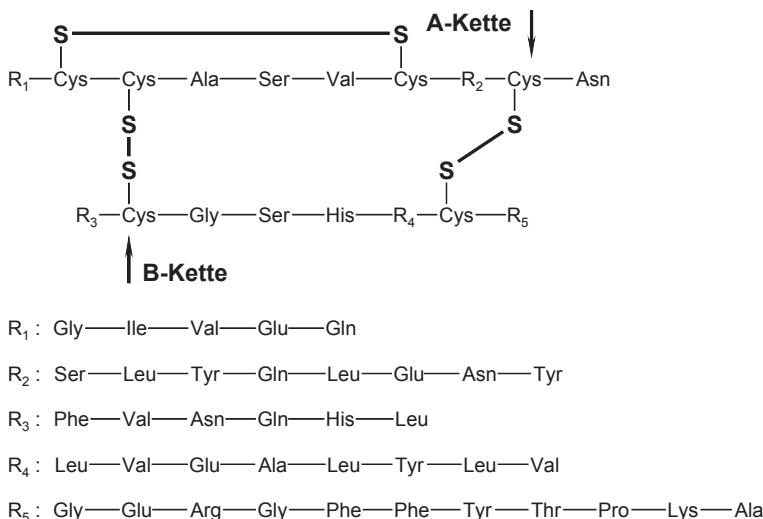
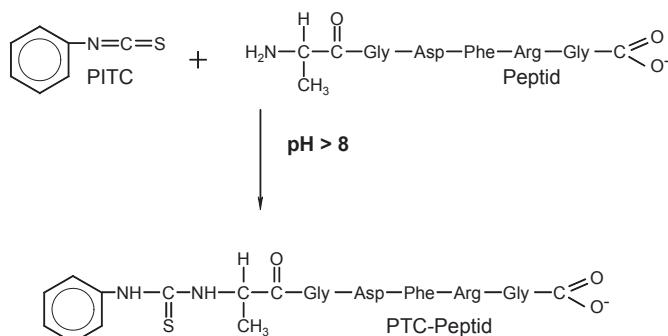


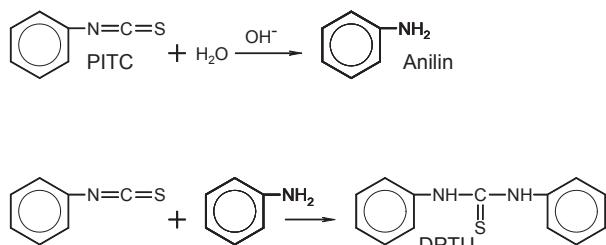
Abb. 2.13 Aminosäuresequenz von Rinderinsulin

**Abb. 2.14** Kopplung mit PITC

Die Sequenzierung eines Proteins oder Peptides kann nach dem von Pehr Edman (1950) entwickelten Aminosäureabbau (*Edman-Abbau*) erfolgen. Dabei reagiert Phenylisothiocyanat (PTC) unter milden basischen Bedingungen mit der *N*-terminalen Aminogruppe des Proteins bei Temperaturen um 50°C unter Bildung des Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Adduktes. Die Zeit beträgt ca. 30 min. Ein Beschleunigung der Reaktion kann durch Erhöhung des pH-Wertes auf 9 erfolgen.

Damit ist jedoch die verstärkte Bildung des Nebenproduktes Diphenylthioharnstoff (DPTU) verbunden, der die HPLC-Analyse von PTH-Aminosäuren beeinträchtigen kann (Abbildung 2.15). Das PTC-Addukt wird in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss mit Trifluoressigsäure versetzt. Dadurch erfolgt der nucleophile Angriff des Schwefels an der Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung, der zur Abspaltung einer Aminosäure als heterocyclisches Anilinothiazolinon-(ATZ)-Derivat führt.

Die reduzierte hydrophobe ATC-Aminosäure wird vom hydrophilen Restprotein durch Extraktion mit einem entsprechend hydrophoben Lösungsmittel (Ethylacetat) abgetrennt. Durch Hinzufügen wässriger Säure wird der heterocyclische Ring der ATC-Aminosäure geöffnet. Diese wird bei erhöhter Temperatur in die stabilere Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure umgelagert. Das bezeichnet man als Konvertierung.

**Abb. 2.15** Nebenproduktbildung

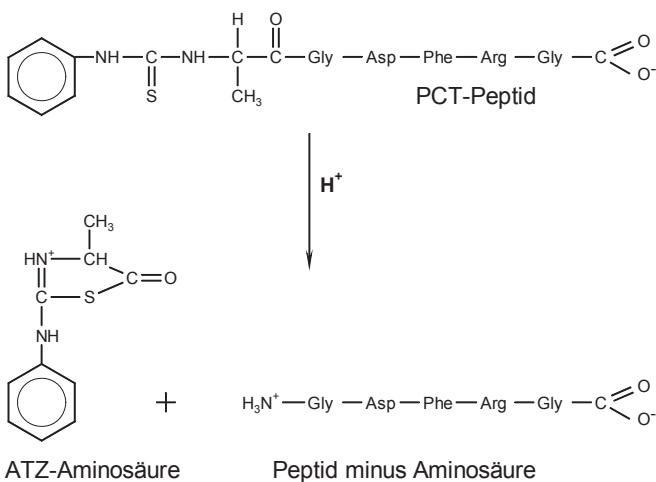


Abb. 2.16 Abspaltung der ersten Aminosäure

Die Analyse der PTH-Aminosäuren erfolgt mittels Hochleistungsflüssigchromatographie an Reversed-Phase-Säulen.

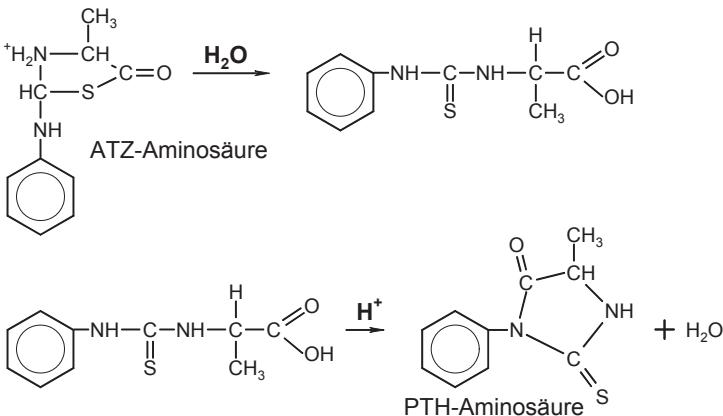
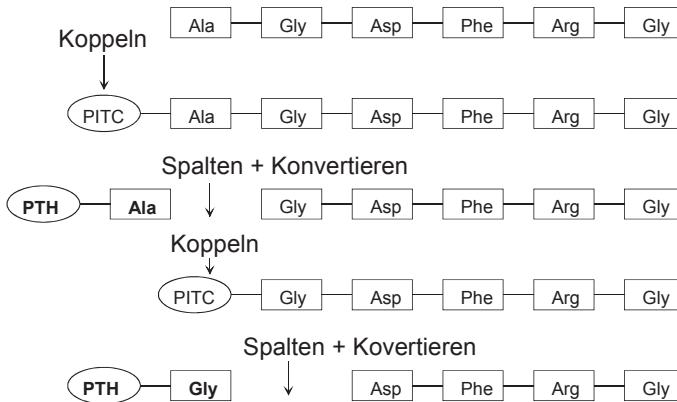


Abb. 2.17 Konvertierung

Das Restprotein wird danach erneut dem Edman-Abbau unterzogen, um die nächste Aminosäure abzuspalten und sie als PTH-Derivat zu analysieren. Dieser sich ständig wiederholende Vorgang ist vereinfacht in Abbildung 2.18 dargestellt.

Mit kommerziellen Sequenzautomaten beträgt die Zeit für den Edman-Abbau einer Polypeptidkette etwa zwei Stunden.

Die größte Bedeutung hat jedoch die DNA-Rekombinationstechnik, mit der die Aminosäuresequenz eines Proteins an Hand der Sequenzanalyse der DNA-Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin ermittelt wird.

**Abb. 2.18** Verlauf des Edman-Abbaus

2.1.2.4 Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quarternärstruktur

Die enzymatische Aktivität und die biologischen Eigenschaften eines Proteins hängen entscheidend von seiner räumlichen und strukturellen Anordnung ab.

Als **Primärstruktur** eines Proteins wird die Aminosäuresequenz, d.h., die „Aneinanderreiheung“ einzelner Aminosäuren in seiner Polypeptidkette(n) bezeichnet. Die **Sekundärstruktur** ist eine räumliche Anordnung der Polypeptidkette. Sie beschreibt die relative Anordnung ihrer monomeren Bausteine und wird neben der Primärstruktur auch durch Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Elementen bestimmt. Charakteristische Strukturelemente sind u.a. Helices und Faltblätter (vgl. Abbildung 2.21 und 2.22).

Die **Tertiärstruktur** ist die vollständige dreidimensionale Ausdehnung der gesamten Polypeptid- bzw. Proteinkette. Bei globulären Proteinen befinden sich die hydrophoben Strukturteile im Inneren des Proteins, während die hydrophilen und/oder geladenen Bereiche dem wässrigen Milieu zugewandt sind. Zur Stabilisierung von Tertiärstrukturen dienen Disulfidbrücken (besonders starke Bindungen), Ionenbindungen sowie relativ schwache Bindungen wie Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen.

Die **Quarternärstruktur** tritt bei Proteinen mit zwei und mehr Polypeptidketten auf und beschreibt die räumliche Anordnung der Untereinheiten, die durch Disulfidbindungen verknüpft sind. Die knäuelartige Struktur wird weiterhin durch nichtkovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und/oder elektrostatische Interaktionen hervorgerufen.

2.1.2.5 α -Helix und β -Faltblatt

Die Ausbildung der Polypeptidstruktur von α -Helix und β -Faltblatt hängt eng mit den beschriebenen Organisationsebenen der Proteinstrukturen zusammen. Grundlegende Ursachen sind vor allem strukturelle Besonderheiten der Peptidbindung.

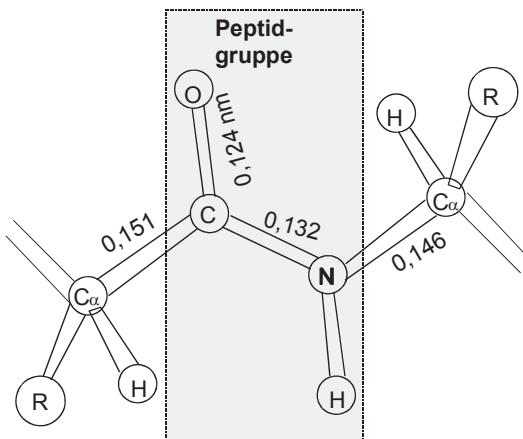


Abb. 2.19 Die starre und planare Peptidgruppe

Die Peptidgruppe zwischen zwei α -C-Atomen in einem Protein ist planar und starr angeordnet. Ursache der Planarität dieser Bindung ist der partielle Doppelbindungscharakter der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung (Abb. 2.20). Die der starren Peptidgruppe benachbarten α -C-Atome besitzen dagegen beträchtliche Rotationsfreiheitsgrade, die maßgeblich die Art der Proteinfaltung bestimmen.

Pauling und Corey (1951) konstruierten Polypeptidmolekül-Modelle unter Einhaltung der ermittelten Bindungslängen und -winkel und fanden, dass sich Polypeptidketten in Strukturen mit regelmäßig sich wiederholenden Elementen falten. Diese Polypeptidstrukturen werden als α -Helix und β -Faltblatt bezeichnet.

In Abbildung 2.21 ist die komplexe Struktur einer α -Helix dargestellt. Sie besitzt eine stabförmige Anordnung, die im Inneren eng aufgewickelte Polypeptidketten enthält. Die Seitenketten sind andererseits schraubenförmig nach außen gerichtet. Der Abstand der Wendel beträgt 0,54 nm. Die Stabilisierung der α -Helix erfolgt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken.

Das Modell der β -Faltblatt-Struktur (Abb. 2.22) zeigt, dass die Faltung der Polypeptidkette nur im Bereich der α -Kohlenstoffatome erfolgt.

Die Seitenketten der Aminosäuren sind nach oben angeordnet. Die zur Stabilisierung der Struktur ausgebildeten Wasserstoffbrücken sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

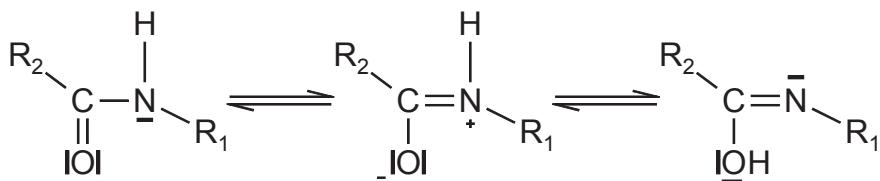
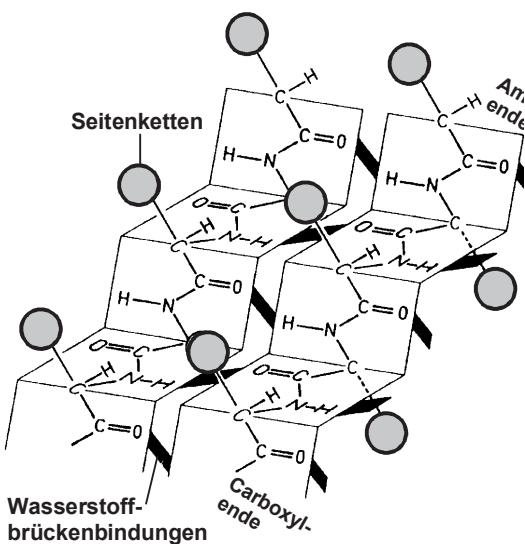
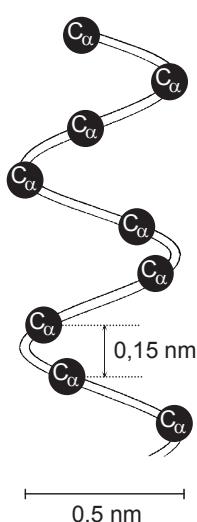


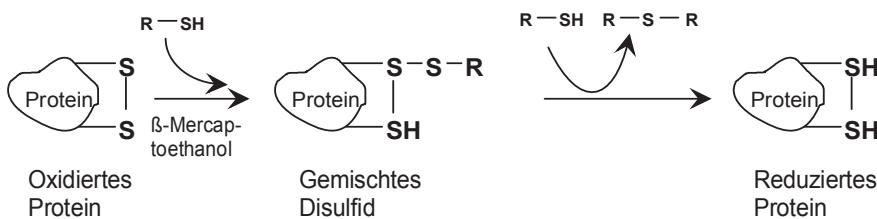
Abb. 2.20 Planarität der Peptidgruppe und partieller Doppelbindungscharakter der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung

**Abb. 2.21** α -Helix-Struktur**Abb. 2.22** Faltblattstruktur (β -Konformation)

2.1.3 Denaturierung und Redenaturierung

Proteine denaturieren bei erhöhter Temperatur, durch hydrophobe Wechselwirkungen oder unter dem Einfluss vieler organischer Lösungsmittel. Am Beispiel der Ribonuclease wird anschaulich demonstriert, dass nach erfolgter Denaturierung die reversible „Zurückfaltung“ des Proteins, die als Redenaturierung bezeichnet wird, möglich ist und unter welchen Bedingungen sie verläuft.

Die Entstehung der Disulfidbindung wurde bereits in Abbildung 2.12 gezeigt. Die Reduktion dieser Bindung in einem Protein kann durch einen Überschuss von β -Mercaptoethanol erfolgen. In einer Zwischenstufe entsteht ein „gemischtes“ Disulfid und danach das reduzierte Protein.

**Abb. 2.23** Reduktion von Disulfidbindungen mit β -Mercaptoethanol

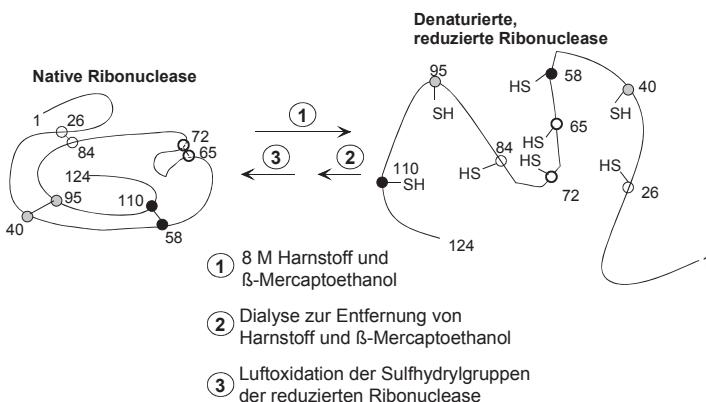


Abb. 2.24 Denaturierung und Redenaturierung von Ribonuclease

Anfinsen (1964) fand, dass die Ribonuclease (bei 37°C, pH=7) nur dann mit β -Mercaptoethanol reduziert wird, wenn das Protein zuvor mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid partiell entknäult wurde. Diese Proteindenaturierung wird in Abbildung 2.24 durch die Hinreaktion (①) ausgewiesen. Das Protein besitzt in diesem Zustand keinerlei enzymatische Aktivität mehr.

Die Redenaturierung erfolgt durch Entfernung von Harnstoff und β -Mercaptoethanol mittels Dialyse und in einem zweiten Schritt durch Luftoxidation der Sulphydrylgruppen, was durch die Rückreaktionen (② und ③) angezeigt wird. So faltet sich das Ribonuclease-Molekül zurück und wird wieder enzymatisch aktiv.

2.1.4 Glutathion- und Metallothioneinstrukturen

Glutathion (GSH) ist ein schwefelhaltiges Tripeptid (γ -Glutamylcysteinylglycin) mit einer Molekülmasse von 304 und wurde bereits 1888 in der Hefe als „Phlothion“ entdeckt. Die Struktur des Peptides geht aus der Abbildung 2.25 hervor. Neben der Glutathionstruktur existieren auch homologe Verbindungen wie Homo-Glutathion (h-GSH) mit der Struktur γ -Glu-Cys- β -Ala oder Hydroxymethyl-Glutathion (hm-GSH, γ -Glu-Cys-Ser).

Die Thiolgruppe (SH-Gruppe) besitzt verschiedene biologische Eigenschaften und Funktionen. Sie ist an Entgiftungsreaktionen und am oxidativen Schutz der Zellen beteiligt (Abschnitt 15.5).

Metallothioneine (MT) gehören zu der Substanzklasse der Metalloproteine. Man unterscheidet zwischen Metallothioneinen 1 und 2 (MT 1, MT 2), die Molekulargewichte von 6–15 kDa besitzen, und Metallothioneinen (MT 3), die niedermolekular sind und auch als Phytochelatine (PC's), Cadystine (Hinweis auf die Cd-chelatierende Wirkung), γ -Glutamylpeptide, $(\gamma EC)_n G$ bzw. $(\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl)_n-Glycine, wobei n=2–11 ist, bezeichnet werden (Abbildung 2.26).

Der Name Phytochelatine weist darauf hin, dass diese schwefelhaltigen Peptide vorrangig in Pflanzen vorkommen und mit Metallionen Chelate bilden (15.5.2).

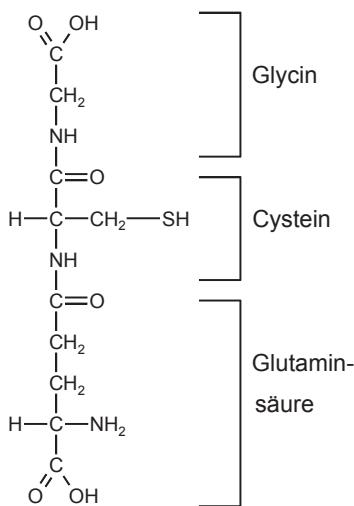


Abb. 2.25 Strukturformel von Glutathion

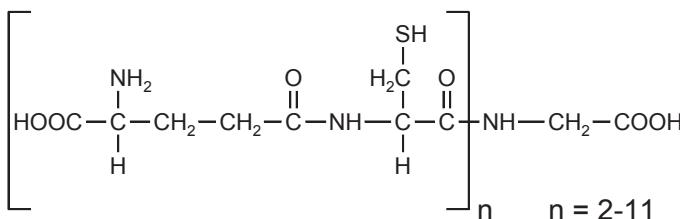


Abb. 2.26 Struktur der Phytochelatin

Als Homophytochelatine (h-PCs) werden schwefelhaltige Peptide mit der Primärstruktur $[{\gamma}\text{-Glu-Cys}]_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ bezeichnet. Weiterhin sind die Hydroxymethyl-Phytochelatine (hm-PCs, $[{\gamma}\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Ser}$), *des*-Phytochelatine ($[{\gamma}\text{-Glu-Cys}]_n$) und Phytochelatine mit der Aminosäurestruktur $[{\gamma}\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Glu}$ bekannt.

MT 1 und MT 2 Metallothioneine sind charakteristische Bestandteile von menschlichen und tierischen Organismen und Zellen sowie von einigen Pilzen. Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur signifikant von den Phytochelatinen.

MT 1 und MT 2 werden durch Gene codiert und besitzen funktionelle Gemeinsamkeiten, während Phytochelatine keine primären Genprodukte sind.

Metallothioneine der Klassen 1 und 2 sind aus einer Polypeptidkette bestehend aus 40 (41) nichtaromatischen Aminosäuren und 20 schwefelhaltigen Cysteinmolekülen, die nicht über Disulfidbrücken verknüpft sind, aufgebaut.

Das Metallothionein wurde 1957 zuerst von Margoshes und Vallee aus der Pferdeniere isoliert. Der Name des Proteins resultiert aus seinem hohen Metallgehalt (2,2% Zn bzw. 5,9% Cd) und den zahlreichen Thiolgruppen (SH-Gruppen) auf Grund des hohen Anteils an Cysteinmolekülen (33%).

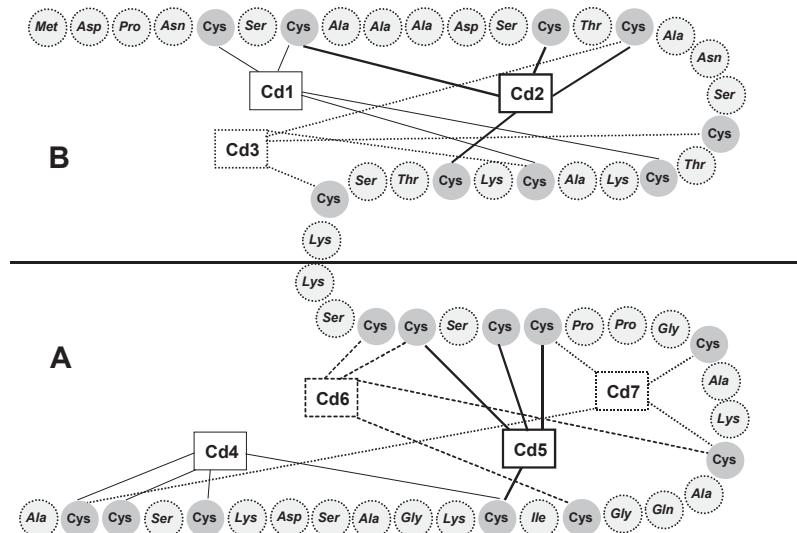


Abb. 2.27 Aminosäuresequenz eines Metallothioneins aus Kaninchen-Leber

Durch eine entsprechende Faltung des Metallothioneins entstehen zwei korbbartige Strukturen, die als Cluster bezeichnet werden. Darin ist jedes Metallatom (z.B. Cd) tetrahydral von vier Thiolgruppen umgeben.

Es können ein 3-Metall-Cluster mit 9 Thiolgruppen, M₃(Cys)₉, und ein 4-Metall-Cluster mit 11 SH-Gruppen, M₄(Cys)₁₁, in der β -Domäne (B in Abbildung 2.27) bzw. α -Domäne (A) gebildet werden.

Auf Grund dieses hohen Schwefelgehaltes besitzen die Metallothioneine die Fähigkeit, eine breite Palette von Metallionen wie Cd²⁺, Cu⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, Ag⁺ zu binden und charakteristische Metall-Thiolat-Komplexe auszubilden.

Aus der Metallbindungsfähigkeit resultieren für sie wichtige physiologische Eigenschaften und Funktionen wie Eliminierung toxischer Metallionen, Metallionenmetabolismus und Homöostase, Detoxifikation freier Radikale oder Rekonstruktion anderer metallhaltiger Proteine (s. Abschnitt 15.5). Auch bei der Ausbildung von Karzinomen scheinen die Metallothioneine eine entscheidende Rolle zu spielen.

2.1.5 Antikörper, Antigene

Antikörper bzw. Immunglobuline sind Eiweiße (Proteine) aus der Substanzklasse der Globuline, die im Menschen als Reaktion auf bestimmte Stoffe, die man als Antigene bezeichnet, produziert werden. Antikörper fungieren im Dienste des Immunsystems und werden von sogenannten B-Lymphocyten gebildet. Nur diese sind in der Lage dazu - sie gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukocyten).

Antigene sind meist Makromoleküle oder Moleküle, die an Partikel gebunden sind (z.B. Lipopolysaccharide an der Oberfläche von Bakterien).

Ein bestimmtes Antigen induziert meist die Bildung von nur wenigen, genau dazu passenden Antikörpern, die über spezifische, nicht-kovalente Bindung in der Regel nur diesen Fremdstoff erkennen.

Die spezifische Bindung von Antikörpern an die Antigene stellt einen signifikanten Teil der Abwehr gegen die eingedrungenen Fremdstoffe dar. Bei Pathogenen (Krankheitserregern) als Fremdstoffe kann die Bildung und Bindung von Antikörpern zur Immunität führen.

Antikörper kommen im Blutserum und in der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe vor und können meist nur einen Teil der Gesamtstruktur des Antigens erkennen. Dieser Teil wird als Epitop bzw. als antigene Determinante bezeichnet. Paratop stellt die spezifische Antigenbindungsstelle des Antikörpers dar.

Beim Kontakt von Antikörper und Antigen wird eine sogenannte humorale Immunantwort erzeugt.

Die Darstellung in Abbildung 2.28 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Immunglobulins (IgG). Da das Molekül mit Kohlenhydraten (KH) glycosyliert ist, gehören diese Antikörper zur Substanzklasse der Glycoproteine.

Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (H: „heavy chains“) und zwei identischen leichten Ketten (L: „light chains“), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Bezeichnet werden diese als V_L und C_L . Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und beim IgG drei konstante Domänen. Bezeichnet werden diese analog als V_H und C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} .

Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle. Die Domäne C_{H2} besteht u. a. auch aus einer Kohlenhydratkette (KH-K), die eine Bindungsstelle für das Komplementsystem bildet. Die Domäne C_{H3} ist die Fc -Rezeptor-Bindungsstelle zur Opsonierung.

Die beiden Leichtketten sind je nach Organismus und Immunglobulin-Subklasse entweder vom Typ κ oder λ und bilden zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion („hinge region“) liegenden Anteil der schweren Ketten das antigenbindende Fragment *Fab* (engl. *antigen-binding fragment*).

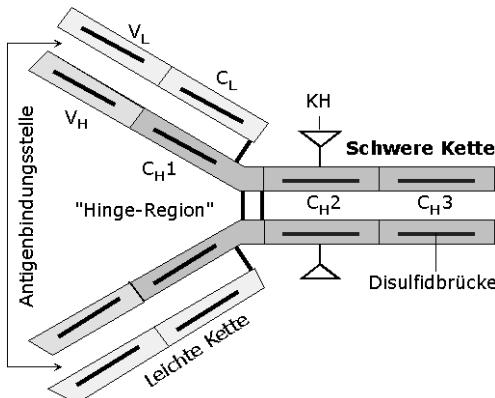


Abb. 2.28 Struktur von Immunglobulin, IgG

2.2 Nucleinsäuren

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist das eigentliche Molekül des Lebens. In ihrer Struktur sind die Erbinformationen enthalten, die den Aufbau aller Proteine bestimmen und steuern. Die DNA enthält die Befehle, nach denen Zellen wachsen und sich teilen. Sie ist die ursprüngliche Grundlage des Evolutionsprozesses, der die Mannigfaltigkeit aller Lebensformen hervorgebracht hat.

Die DNA und RNA (Ribonucleinsäure) sind sehr lange, fadenförmige Biomoleküle, die aus Desoxyribonucleotiden (Ribonucleotiden) bestehen. Diese setzen sich aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest zusammen. Die Zucker- und Phosphatgruppen determinieren hauptsächlich die strukturelle Anordnung dieser Makromoleküle. Die Basen der Nucleinsäuren (Nucleobasen) beinhalten und übertragen die genetische Information.

1953 entdeckten Watson und Crick die Doppelhelix der DNA. Dieses Modell der räumlichen Anordnung der DNA-Moleküle ist das Symbol der modernen Molekularbiologie und genetischen Forschung.

Die in der DNA gespeicherten genetischen Informationen zur Bildung von Proteinen werden durch die Ribonucleinsäure übermittelt. Zuerst wird die DNA-Botschaft in eine RNA-Kopie der DNA umgeschrieben (transkribiert). Diese Boten- oder Messenger-RNA (mRNA) übermittelt die Informationen in die Ribosomen, wo sie durch Transfer-RNA-Moleküle (tRNA) in Proteine übersetzt (translatiert) werden. Die Ribosomen enthalten neben den Proteinen als weitere RNA-Struktur noch die sogenannte ribosomale RNA (rRNA). Alle drei RNA-Formen sind als Bindeglied zwischen der DNA und den Proteinen gleich wichtig.

2.2.1 Strukturen

Beide Nucleinsäure-Typen DNA und RNA sind in ihrem strukturellen Aufbau als Polymere (Makromoleküle) sehr ähnlich.

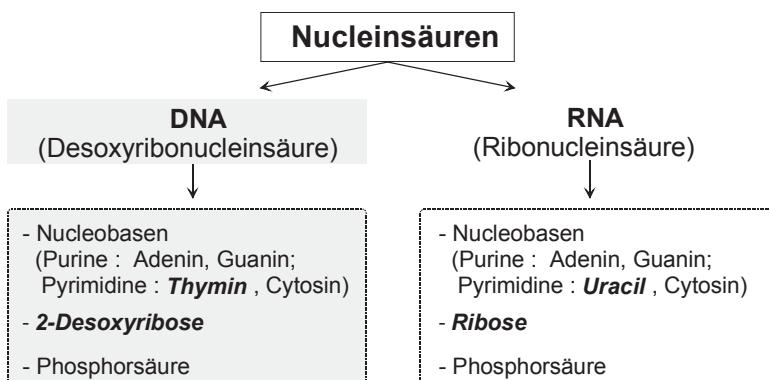


Abb. 2.29 Strukturgruppen der DNA versus RNA

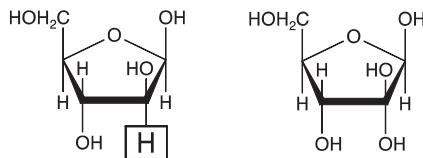


Abb. 2.30 Zuckermoleküle der DNA und RNA

Die strukturellen Unterschiede in den Zuckermolekülen sind gering. Die Pentose der DNA enthält ein Sauerstoffatom weniger, was durch die Vorsilbe „desoxy“ ausgedrückt wird.

Die Basen der Nucleinsäuren leiten sich vom Purin- und Pyrimidin-Typ ab. In der DNA sind Adenin und Guanin sowie Thymin und Cytosin angeordnet. In der RNA wird dagegen die Pyrimidinbase Thymin durch Uracil ersetzt. Die Verknüpfung einer Purin- oder Pyrimidinbase mit einem Zucker ergibt ein Nucleosid. Das C₁-Atom der Desoxyribose ist dann mit einem N₉-Atom des Purins oder mit dem N₁-Atom des Pyrimidins N-glycosidisch verbunden. Die Nucleoside der DNA werden somit als Desoxycytidin, Desoxythymidin, Desoxyguanosin und Desoxyadenosin bezeichnet. Die Struktur dieses Nucleosides zeigt Abbildung 2.32.

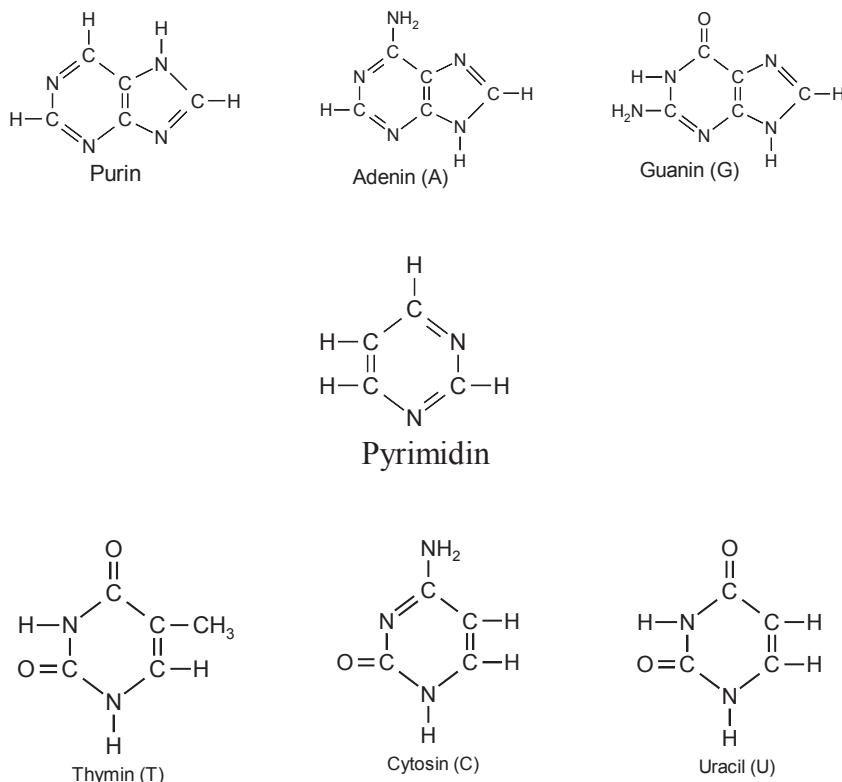


Abb. 2.31 Basen der Nucleinsäuren

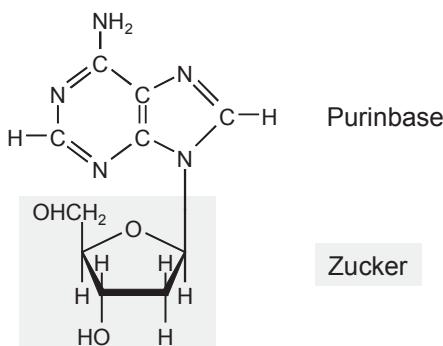


Abb. 2.32 Struktur des Nucleosides Desoxyadenosin

Die Nucleotide stellen die Grundstruktureinheiten der Nucleinsäuren dar. Sie sind die Phosphatester der Nucleoside. In der Regel ist die OH-Gruppe am C₅-Atom des Zuckers mit einem oder auch mehreren Phosphatgruppen verestert. Diese Verbindungen werden als Nucleosid-5'-phosphate oder 5'-Nucleotide bezeichnet. Die Struktur eines DNA-Kettenstückes geht aus Abbildung 2.34 hervor.

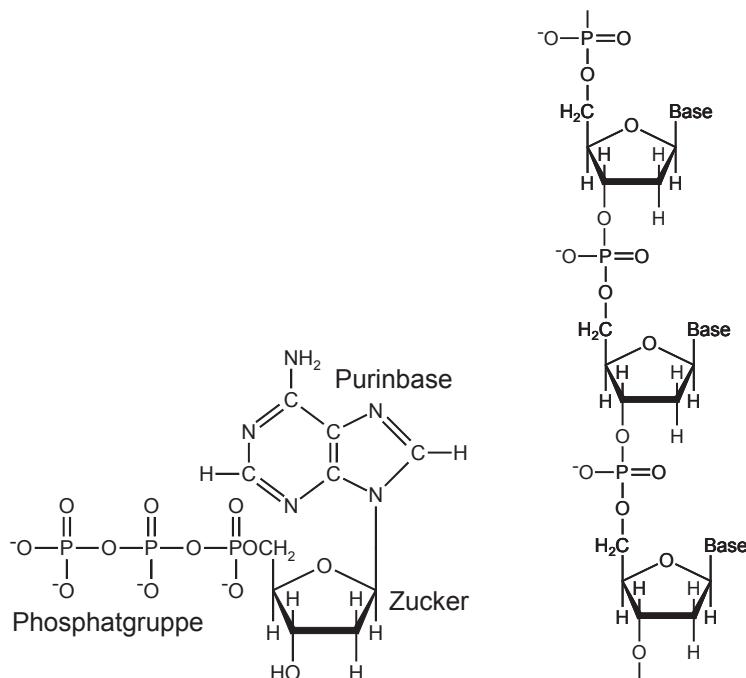


Abb. 2.33 Desoxyadenosin-5'-triphosphat

Abb. 2.34 DNA-Kettenstück

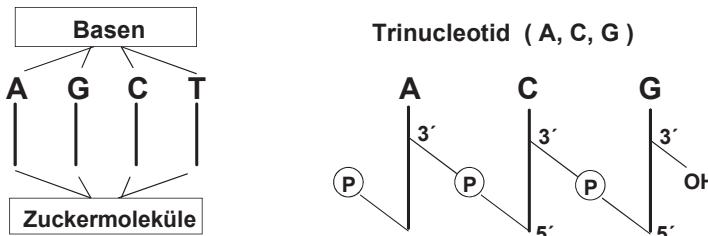


Abb. 2.35 Symboldarstellung von Nukleinsäureketten

Die organische Base und das Zuckermolekül sind über eine β -glycosidische Bindung miteinander verknüpft. Der Phosphatrest ist esterartig mit einer OH-Gruppe des Zuckers verbunden.

Zur übersichtlichen Darstellung der DNA-Ketten werden einfache Symbolanordnungen verwendet. Die Nucleobasen werden mit ihrem entsprechenden Anfangsbuchstaben (A, G, C und T) abgekürzt und die Kennzeichnung der Zucker erfolgt durch senkrechte Striche. Dabei ist die 3'-Hydroxylgruppe der einen Zuckerguppe mit der 5'-Hydroxylgruppe des nachfolgenden Zuckers über eine Phosphodiesterbrücke verbunden. Diese ist mit dem Symbol (P) gekennzeichnet. Das skizzierte Moleköl stellt ein Trinucleotid dar, welches auch durch die Bezeichnung „ACG“ noch weiter vereinfacht symbolisiert werden kann.

2.2.2 Doppelhelix, Basenpaarung und Replikation

1953 wurde von Watson und Crick das Strukturmodell der dreidimensionalen DNA experimentell aufgeklärt. Sie entdeckten, dass die DNA aus zwei Polynukleotidsträngen besteht, die um eine gemeinsame Achse gewunden sind. Dieses als „Doppelhelix“ bezeichnete DNA-Modell enthält im Inneren die Purin- und Pyrimidinbasen. Die Desoxyribose- und Phosphatgruppen sind im Helix-Modell nach Außen gerichtet und bilden das Rückgrat der DNA-Stränge. Die Ringebenen der Nucleobasen sind senkrecht zur Helixachse angeordnet, und die Zuckermoleküle stehen annähernd senkrecht zu diesen Basen. Der Durchmesser einer DNA-Helix beträgt 2 nm.

Abbildung 2.36 zeigt die Doppelhelix bestehend aus den DNA-Strängen 1 und 2. Diese enthalten die Phosphat- und Zuckermoleküle sowie die entsprechenden Nucleobasen (vgl. Abbildung 2.29). Links und rechts befindet sich das strukturbestimmende Zucker-Phosphat-Rückgrat. Im Inneren der Helix stehen sich jeweils eine Purin- und eine Pyrimidinbase gegenüber. Aus sterischen Gründen können zwei Purinbasen nicht komplementär angeordnet sein.

Die Purin- und Pyrimidinbasen sind komplementär angeordnet. Es können nur Adenin und Thymin (A-T, T-A) sowie Guanin und Cytosin (G-C und C-G) paarweise gegenüberliegen. Die stabilisierende Wechselwirkung erfolgt über Wasserstoffbrücken, die mit gestrichelten Linien in Abbildung 2.36 eingezeichnet sind.

Eine detailliertere Moleküldarstellung zur Ausbildung der Wassersoffbrücken geht aus der Abbildung 2.37 hervor.

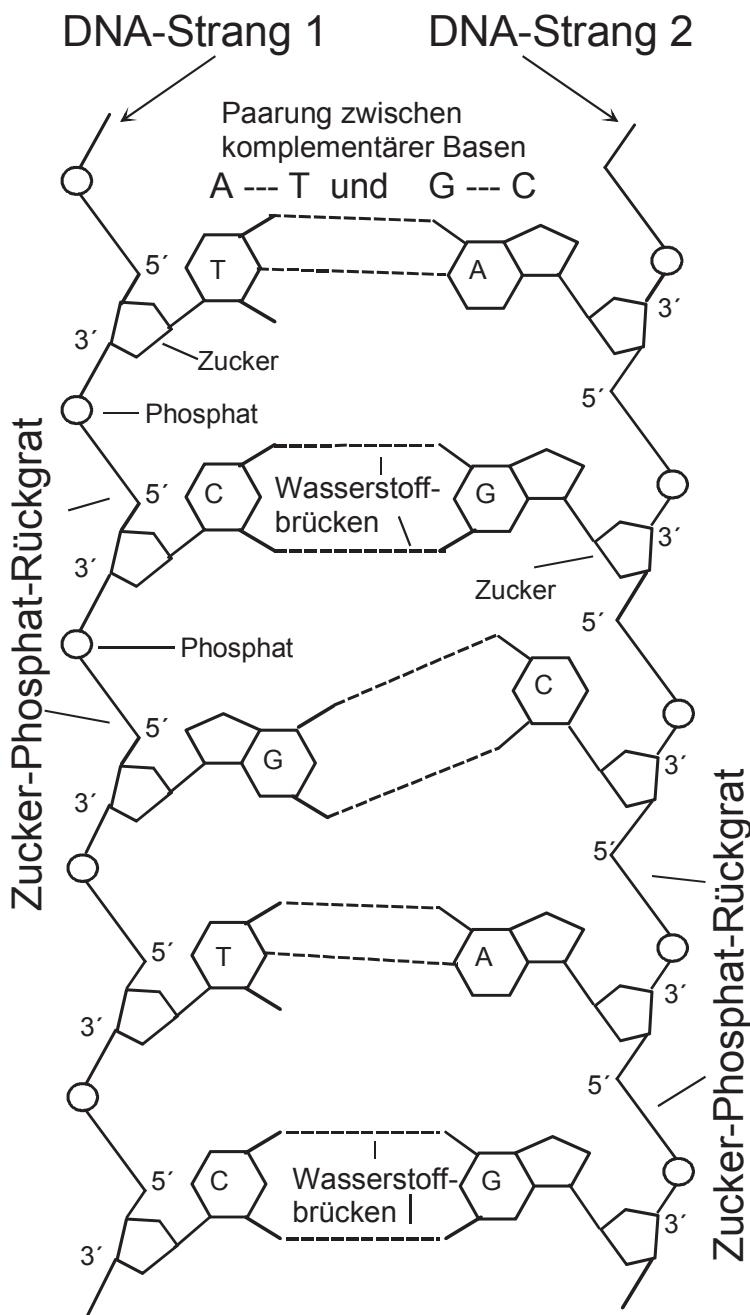


Abb. 2.36 Basenpaarung zwischen zwei DNA-Ketten

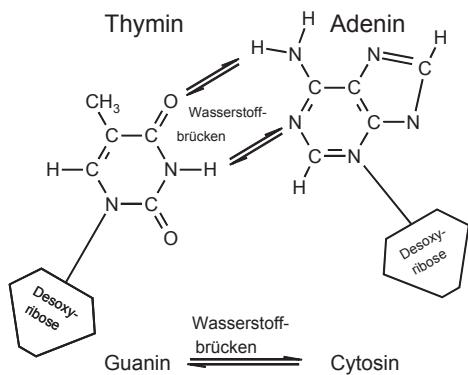


Abb. 2.37 Wasserstoff-brücken zwischen den Basenpaaren

Die Fähigkeit der DNA zur Selbstverdopplung gründet sich auf ihre komplementären Strukturen.

In Abbildung 2.38 wird gezeigt, dass sich die Stränge der „elterlichen“ Doppelhelix entwinden und entsprechend den Basenpaarungsregeln als Matrize für die Synthese neuer Tochterstränge dienen können.

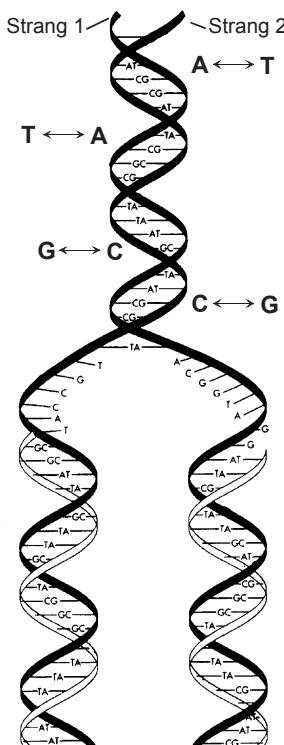


Abb. 2.38 Verdopplung („Replikation“) der DNA

2.2.3 Translation und Transkription

Die DNA ist fast immer im Zellkern lokalisiert und kann deshalb an diesem Ort nicht die Matrize sein, an der die Aminosäuren zu Proteinen synthetisiert werden. Der Ort der Proteinsynthese ist das Cytoplasma, in das die genetische Information übertragen (transkribiert) werden muss. Die Transkription dieser genetischen Information – die Nucleotidsequenz – erfolgt mit Hilfe der RNA. Das heißt, die genetische Information der DNA wird auf die RNA umgeschrieben. Die RNA dient wiederum als Matrize und hat die Anordnung der Aminosäuren – die Aminosäuresequenz – gespeichert. Die RNA wandert in das Cytoplasma, in dem sie die genetische Information über die Anordnung der Aminosäuren in den Polypeptidketten übersetzt (Translation).

Die in der DNA in Form der Nucleobasenanordnung verschlüsselte Aminosäuresequenz ist somit die Grundlage für die Synthese von Proteinen oder vereinfacht ausgedrückt, die „Nucleotidsprache“ der Nucleinsäuren wird in die „Aminosäuresprache“ übersetzt.

Die Base Uracil der DNA ist strukturell dem Thymin sehr ähnlich, weshalb sie sich auch mit Adenin paaren kann. Die eine Aminosäure codierende Nucleotidgruppe wird als *Codon* bezeichnet. Eine Dreiergruppe von Nucleotiden (z.B. AAA oder AAU) codiert eine Aminosäure. Den Gesamtorgang dieser Informationsübertragung zeigt die Abbildung 2.39.

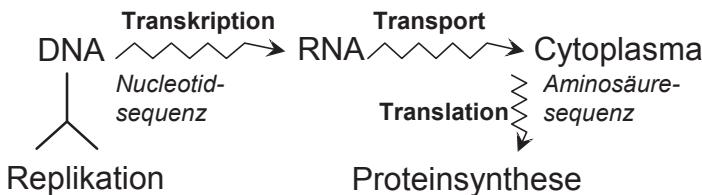


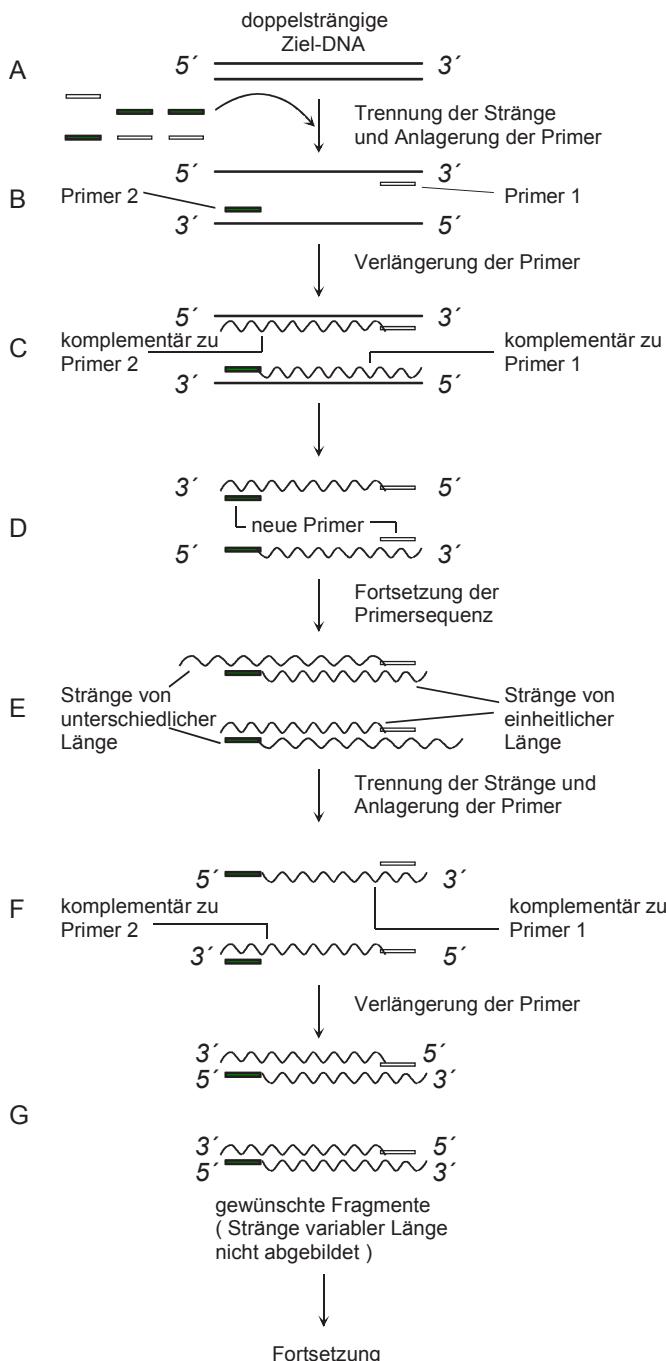
Abb. 2.39 Umschreiben der Nucleotidsequenz in die „Aminosäuresprache“

2.2.4 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR: *polymerase chain reaction*) ermöglicht, die gewünschten DNA-Bereiche zu kopieren und zu vervielfältigen. Diese Methode, die Mitte der achtziger Jahre von Mullis entwickelt wurde, hat die moderne Molekularbiologie entscheidend revolutioniert, da eine enorme Anzahl von DNA-Kopien ohne Klonierung angefertigt werden können.

Bei der PCR-Methode werden bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation genutzt. Die DNA-Polymerase verwendet eine Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges. Die Einzelstränge gewinnt man durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf ca. 90°C.

Die DNA-Polymerase, die aus in heißen Quellen lebenden Bakterien (*Thermus aquaticus*, „Taq-Polymerase“) isoliert wurde, hat ein Temperaturoptimum von etwa 75°C und ist um 90°C noch relativ stabil.

**Abb. 2.40** Ablauf der Polymerasekettenreaktion

Für den Beginn der Synthese benötigt die DNA-Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, den sogenannten Primer. Der Startpunkt der DNA-Synthese kann demzufolge determiniert werden, in dem man einen Oligonucleotid-Primer hinzufügt, der sich an der gewünschten Stelle an die Matrize anlagert. Dadurch wird mit Hilfe der DNA-Polymerase gezielt ein spezieller DNA-Bereich synthetisiert.

Beide DNA-Stränge können als Matrize dienen, wenn für jeden Strang ein Primer zur Verfügung gestellt wird.

Als Ausgangsmaterial (A) dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül, wobei Probemengen von wenigen Mikrogramm bereits ausreichend sind. Zuerst erfolgt die Trennung der DNA-Stränge durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 94°C. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches lagern sich die beiden Primer an die Bindestellen an, die an die Zielregion angrenzen (B). Von der Taq-Polymerase werden komplementär zur Matrize neue DNA-Stränge synthetisiert, die in unterschiedlicher Länge über die Position der Primer-Bindungsstelle auf der anderen Matrize hinausgehen (C). Das Reaktionsgemisch wird erneut erwärmt, wobei sich die ursprünglichen und die neu synthetisierten DNA-Stränge auftrennen. Nach diesem Schritt sind bereits vier Bindestellen für Primer verfügbar. Zwei befinden sich auf den ursprünglichen Strängen und zwei sind an den neu synthetisierten angeordnet (D). Im weiteren Verlauf der PCR-Methode synthetisiert die Taq-Polymerase neue komplementäre DNA-Stränge, wobei die Länge dieser Ketten durch die Zielsequenz determiniert wird. Die neu synthetisierten Ketten erstrecken sich genau über den von beiden Primern festgelegten Bereich (E).

Die Reaktionen werden wiederholt, und die Bindung der Primer erfolgt an die neu synthetisierten Stränge (F). Nachfolgend synthetisiert die Taq-Polymerase komplementäre Stränge und produziert auf diese Weise zwei doppelsträngige DNA-Fragmente, die identisch mit der Zielsequenz sind (G). Die Cycles werden mehrfach wiederholt, wie Abbildung 2.41 vereinfacht zeigt.

Denaturierung der DNA-Probe zur Trennung
der DNA-Stränge (94°C, 5 min)

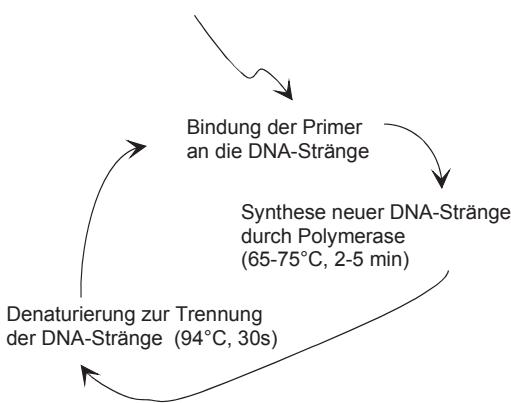


Abb. 2.41 PCR-Cyclus

2.3 Glycoproteine

In der Primärstruktur fast aller Proteine sind neben den Aminosäuren auch langkettige Kohlenhydratmoleküle (Glycane oder Oligosaccharide) enthalten. Diese Zuckerstrukturen sind kovalent an bestimmte Aminosäuren gebunden. Man bezeichnet das als Glycosylierung der Proteine.

Die Glycane waren in der Vergangenheit meist störende Verunreinigungen der Proteine. Heute ist bekannt, dass diese Kohlenhydratketten strukturspezifische Eigenschaften besitzen und die Ursache für charakteristische Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Zellen, z.B. bei der Zell-Zell-Erkennung, sind.

Glycoproteine, die in Zellmembranen vorkommen, haben Kohlenhydratanteile zwischen 2 und 10%. Muzine (lat. *mucus* = Schleim), die als Glycoproteine in Schleimen enthalten sind, besitzen Kohlenhydratgehalte bis ca. 80%.

2.3.1 Strukturen

Die Glycanketten können entweder über eine *N*- oder *O*-glycosidische Bindung mit dem Proteinanteil verknüpft sein. Die bisher bekannte Verknüpfung von *N*-glycosidisch gebundenen Glycoproteinen ist die β -glycosidische Bindung zwischen dem C₁-Atom von *N*-Acetylglucosamin und dem *N*-Atom der Seitenketten-Amidgruppe des Asparagins.

Die *O*-Bindung ist durch die Verknüpfung der Zuckerreste über das Sauerstoffatom mit einer Threonin- oder Serinseitenkette charakterisiert. Aber auch andere Möglichkeiten der Verknüpfung zwischen einer Glycankette und dem Protein sind bekannt, wie noch gezeigt werden wird.

Die Kohlenhydratketten der Glycoproteine setzen sich in der Regel aus sieben Monosaccharid-Species zusammen. Außerdem sind Sulfatierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen möglich.

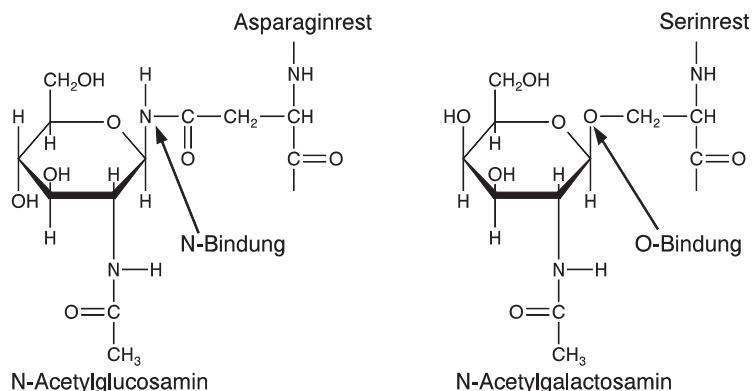


Abb. 2.42 *N*-glycosidische Bindung Abb. 2.43 *O*-glycosidische Bindung

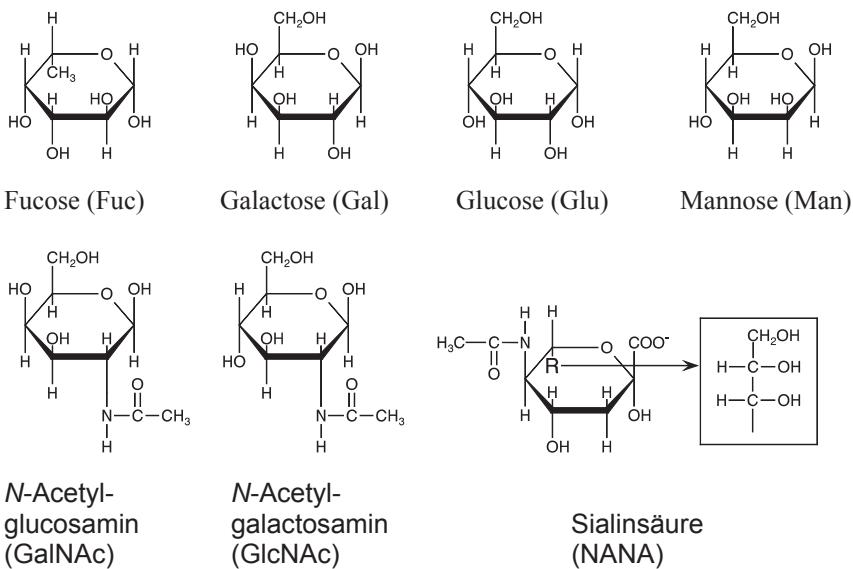


Abb. 2.44 Monosaccharid-Species der Glycoproteine

Einige Glycoproteine enthalten Xylose. Sialinsäure wird auch als *N*-Acetylneuraminsäure (NANA) bezeichnet. Sie leitet sich von dem griechischen Namen für Speichel *sialos* ab und ist ein wesentlicher Bestandteil der Schleime (Muzine).

Die Sialinsäuren umfassen 30 Kohlenhydrate, die sich von der Neuraminsäure ableiten. An die Aminogruppe der Neuraminsäure ist immer eine *N*-Acetyl- oder *N*-Glycoloylgruppe gebunden, was zur *N*-Acetyl- bzw. *N*-Glycoloylneuraminsäure führt. Diese sind die am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren und existieren in verschiedenen Strukturen (Abbildung 2.45). Darin sind die *N*- und *O*-Substituenten sowie deren Positionen (in Klammern) an der Sialinsäure aufgelistet.

R^5	$R^{4,7,8,9}$	
$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	---H	(4, 7, 8, 9)
$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2 \\ \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	(4, 7, 8, 9)
$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2 \\ \\ \text{O} \quad \text{O} \\ \text{C=O} \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{---C---CH---CH}_3 \\ \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$	(9)
	---CH_3	(8)
	$\text{---SO}_3\text{H}$	(8)
	$\text{---PO}_3\text{H}_2$	(9)

The diagram illustrates the linkage of a sialic acid residue to a glucose residue. The sialic acid is shown with its R⁵ group (e.g., acetyl, neuraminyldiacyl) attached to the nitrogen atom (N) of the glucose residue. The glucose residue is shown with its R⁴ and R⁸ substituents. The linkage is between the C3 of the sialic acid and the C2 of the glucose residue. The C1 of the sialic acid is also shown.

Abb. 2.45 Strukturen natürlich vorkommender Sialinsäuren

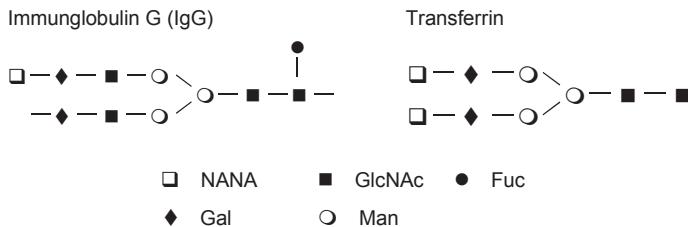


Abb. 2.46 Monosaccharid-Species im Immunglobulin G und im Transferrin

An den Beispielen Transferrin und Immunglobulin (Abbildung 2.46) wird gezeigt, wie die Anordnung der Monosaccharid-Species in glycosylierten Proteinen mit Hilfe von Symbolen vereinfacht dargestellt werden kann. Die Bindung zwischen den einzelnen Kohlenhydratbausteinen kann über eine α - oder β -glycosidische Verknüpfung hergestellt sein. Die β -Konfiguration liegt vor, wenn eine glycosidische Bindung bei „frontaler“ Betrachtung des Zuckermoleküls oberhalb der Ringebene geknüpft wurde. Im Falle der α -glycosidischen Bindung erfolgte die Verknüpfung unterhalb der Ebene der Zuckerringe. Je nach Position der einzelnen C-Atome in den Zuckermolekülen, die untereinander verknüpft sind, unterscheidet man u.a. zwischen α -1,2-, α -2,3-, α -1,3-, α -1,6- oder β -1,2 und β -1,4-Bindungen.

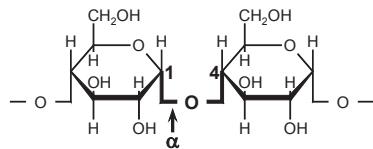


Abb. 2.47 α -glycosidische Bindung

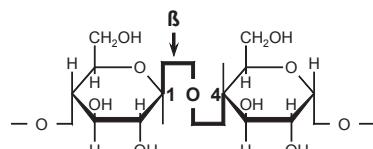


Abb. 2.48 β -glycosidische Bindung

2.3.1.1 *N*-glycosidische Bindung

Charakteristisch für alle *N*-glycosidisch gebundenen Glycoproteine ist ein Pentasaccharid, das als „inner-core“ bezeichnet wird und für alle drei *N*-glycosidisch gebundenen Strukturen, dem Hybrid-, High-Mannose- und Complex-Typ (Abbildungen 2.49-2.51), identisch ist. Es besteht aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannose-Molekülen. Außerhalb des Pentasaccharides verzweigen sich die Glykanketten bedingt durch verschiedene Biosyntheseprozesse meist in sehr komplexer Art und Weise. Diese Eigenschaft der Glycoproteine, dass identische Proteinstrukturen unterschiedliche Kohlenhydratseitenketten tragen können, wird als „Mikroheterogenität“ bezeichnet.

Im mannosereichen Glycoprotein-Typ sind außerhalb des „inner-core“ ausschließlich Mannose-Moleküle angeordnet. Im Komplex-Typ findet man neben Mannose und *N*-Acetylglucosamin als weitere Monosaccharid-Species auch Fucose, Galactose und Sialinsäure.

Dieser Strukturtyp entsteht aus dem „*inner-core*“ durch Addition unterschiedlich vieler Kohlenhydratreste. In Abhängigkeit vom Grad der Verzweigung wird zwischen Bi-, Tri-, Tetra- und Pentaantennary-Strukturen unterschieden.

Während die Glycane des High-Mannose-Typs bereits in niederen Organismen wie Hefen, Pilzen oder Pflanzen anzutreffen sind, treten Glycoproteine mit Kohlenhydratstrukturen des Complex-Typs erst in tierischen Zellen auf.

Im Hybrid-Typ sind sowohl Strukturen des High-Mannose- als auch des Complex-Typs vorhanden (Abbildung 2.49).

Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten der Sulfatierung, Phosphorylierung und Methylierung können N-glycosidisch gebundene Glycoproteine zusätzlich derivatisiert sein. Durch neu hinzu kommende Verknüpfungsmöglichkeiten wächst die Strukturenvielfalt (Mikroheterogenitäten) an. Die folgenden Strukturverknüpfungen sind einige Beispiele dafür:

1. Galactose kann durch eine α -1,2-glycosidisch gebundene Fucose substituiert werden.
2. N-Acetylglucosamin, welches direkt an das Asparagin gebunden ist, kann durch α -L-Fucose an der C₆- oder C₃-Position substituiert werden.
3. Sialinsäure kann über eine α -2,3- oder α -2,6-glycosidische Bindung an Galactose gebunden sein.

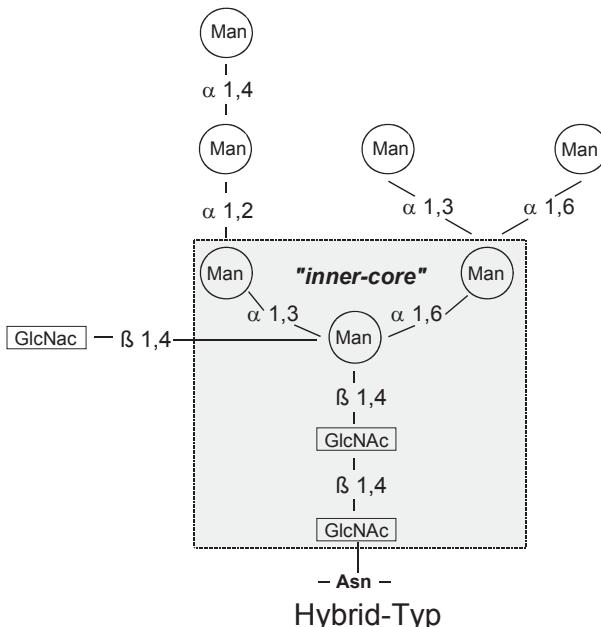
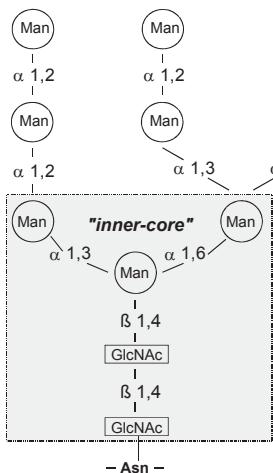
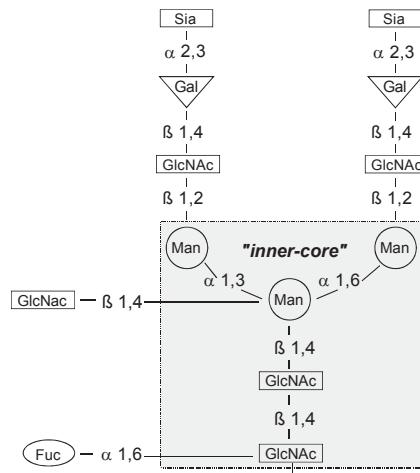


Abb. 2.49 Hybrid-Typ-Glycanketten



High-Mannose-Typ



Complex-Typ

Abb. 2.50 Mannosereiche Glycanketten**Abb. 2.51** Complex-Typ-Glycanketten

2.3.1.2 O-glycosidische Bindung

Neben der *O*-glycosidischen Bindung des O-Atoms eines Zuckers und der Threonin- oder Serinseitenkette sind weitere Glycan-Protein-Verknüpfungen möglich.

Im Muzin-Typ, der für Schleime charakteristisch ist, existiert eine α -*O*-glycosidische Bindung zwischen der L-Threonin- bzw. L-Serin-Hydroxylgruppe und dem *N*-Acetylgalactosamin. Dies trifft auch für die meisten *O*-glycosidisch gebundenen Serum- und Membranglycoproteine zu.

Im Proteoglycan-Typ existiert eine β -*O*-glycosidische Bindung zwischen D-Xylose und der L-Serin-Hydroxylgruppe und im geringen Umfang auch mit der Hydroxylgruppe des L-Threonins. Im Kollagen-Typ liegt eine β -*O*-glycosidische Verknüpfung zwischen D-Galactose und dem δ -Hydroxy-D-Lysin vor. Diese Bindung ist für Glycoproteine aus Knorpel oder Knochen charakteristisch.

2.3.2 Isolierung von Glycoproteinen aus Membranen

Glycoproteine sowie die Substanzklasse der Glycolipide (Abschnitt 2.4) sind Bestandteile von Zellmembranen. Durch Markierungstechniken mit Lektinen, die als pflanzliche Proteine eine hohe Bindungsaffinität zu den Zuckermolekülen besitzen, konnte festgestellt werden, dass die Glycanketten der Glycoproteine immer antennenartig in den extrazellulären Raum hineinragen (Abbildung 2.52).

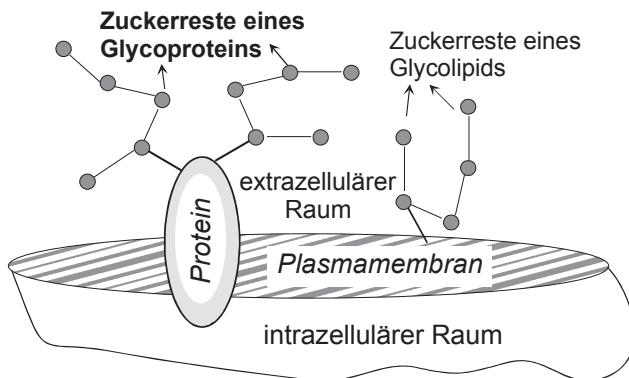


Abb. 2.52 Zuckerketten von Glycoproteinen/Glycolipiden auf der Zellmembran

Da die Zucker einen hydrophilen Charakter besitzen, ist diese Orientierung in Richtung wässriger Oberfläche eindeutig bevorzugt, während eine Ausrichtung zum hydrophoben inneren Kohlenwasserstoffbereich unwahrscheinlich ist.

Die Membranproteine selbst sind in die Lipiddoppelschicht der Zellwände eingebettet. An Hand ihrer Lokalisation in der Membran unterscheidet man zwischen integralen und peripheren Glycoproteinen (Abbildung 2.53). Letztere sind durch elektrostatische oder Wasserstoffbrückenbindungen mit polaren Lipid- oder Oberflächenstrukturgruppen von integralen Membranproteinen assoziiert. Periphere Membranproteine können relativ leicht durch Salzlösungen hoher Ionenstärke oder durch Pufferlösungen mit entsprechendem pH-Wert von der Oberfläche der Lipiddoppelschicht isoliert bzw. solubilisiert werden.

Integrale Membran(glyco)proteine dagegen tauchen mit ihren hydrophoben Oberflächengruppen weitaus tiefer in die Membran ein. Sie sind darin sehr fest gebunden und können fast die gesamte Membran durchspannen. Ihre Isolierung erfordert das „Aufweichen“ oder letztendlich die Zerstörung der Lipiddoppelschicht sowie der Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dafür können insbesondere chaotrope Reagenzien eingesetzt werden, die jedoch naturgemäß stark denaturierend auf die Proteinmoleküle wirken.

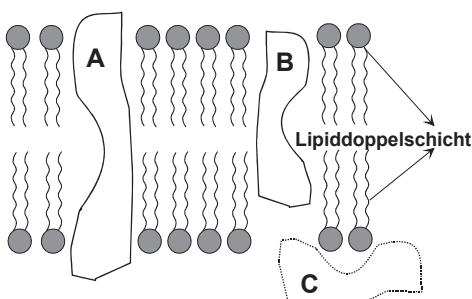


Abb. 2.53 Integrale (A, B) und periphere Membranproteine

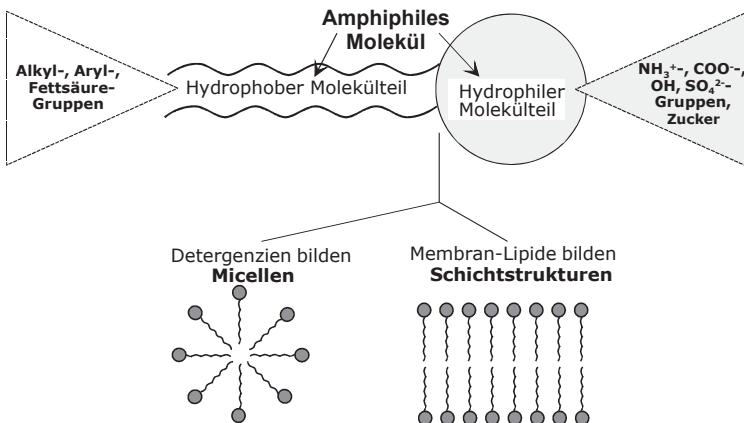


Abb. 2.54 Amphiphiles Molekül

Zur Extraktion bzw. Solubilisierung der integralen Glycoproteine aus Membranen und zum Aufrechterhalten des „Gelöstzustandes“ der Membranproteine ist die Substitution der sie umgebenden Lipidstrukturen durch andere vergleichbare amphiphile und wasserlösliche Moleküle (Detergenzien) erforderlich. Bei diesen Solubilisierungsvorgängen sollen die enzymatische Aktivität und die Funktionen der Proteine in der Regel erhalten bleiben.

Amphiphile Moleküle bestehen aus einem hydrophoben Molekülteil, der auch als Domäne oder Schwanz bezeichnet wird, und einem hydrophilen Molekülteil (hydrophile Domäne oder Kopf), wie aus Abbildung 2.54 hervorgeht.

Darin wird auch gezeigt, dass Detergenzien im Vergleich zu Membranlipiden unterschiedliche Molekülaggregate ausbilden. Amphiphile Lipide ergeben in wässrigen Suspensionen sogenannte Schichtstrukturen, während Detergenzien zur Ausbildung von kompakten Micellen neigen. Im Inneren der Micellen sind die hydrophoben Reste der Detergenzien aggregiert, während die hydrophilen Kopfgruppen nach außen gerichtet sind.

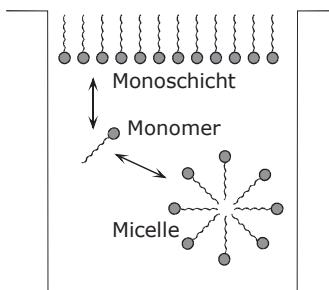


Abb. 2.55 Wässrige Detergenslösung

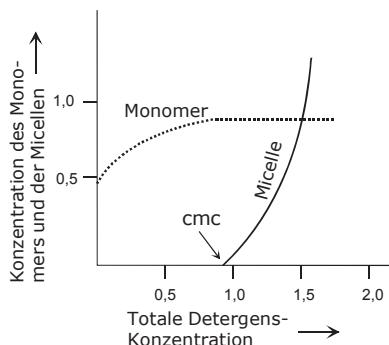


Abb. 2.56 Micellenbildung

In diesen Lösungen (Abbildung 2.55) herrscht zwischen den gelösten monomeren Detergensmolekülen, den Detergensmicellen und einem monomeren Detergensfilm an der Wasser-Luft-Grenzfläche ein Gleichgewicht. Dieses hängt entscheidend von der Konzentration des Detergenses ab (Abbildung 2.56).

Ein sukzessives Zusetzen des Detergenses erhöht vorerst nur seine Konzentration in der wässrigen Lösung. Erst wenn eine bestimmte Grenzkonzentration, die kritische Micellenkonzentration (cmc) überschritten wird, bilden sich die Detergensmicellen aus. Durch weiteres Zusetzen von Detergensmolekülen erfolgt oberhalb der kritischen Micellenkonzentration keine nennenswerte Vergrößerung der Monomerkonzentration, sondern die Erhöhung der Micellenanzahl.

Detergenzen wirken auf die Ablösung der Proteine aus biologischen Membranen ganz unterschiedlich. Dies hängt von der chemischen Natur der Detergenzen ab, die von einer schonenden Eliminierung der Proteine im nativen Zustand bis zur absolut denaturierenden Wirkung (Tabelle 2.1) reicht. Dieser Solubilisierungsvorgang mittels SDS wird im rechten Teil der Abbildung 2.57 demonstriert. Das native Protein wird zwar vollständig aus der Lipiddoppelschicht herausgelöst, befindet sich jedoch danach im denaturierten Zustand, während das Detergens mit den Lipidstrukturen Mischmicellen (s. rechts oben) ausbildet.

Nicht-denaturierende Detergenzen wie CHAPS (s. Tabelle 2.1) solubilisieren integrale Membranproteine unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität. Dabei bilden die Detergensmoleküle eine gegen Denaturierung schützende „Ersatzmembran“ um die Proteine. Außerdem entstehen Lipid-Detergens-Mischzellen (links oben).

CHAPS besitzt als halbsynthetisches und nicht-denaturierendes Detergens für Membranproteine besonders gute Solubilisierungseigenschaften, ist jedoch wie viele dieser Spezialreagenzien relativ kostenintensiv. Es gibt jedoch kein universelles Detergens, da die Struktur der Membranproteine viel zu unterschiedlich ist.

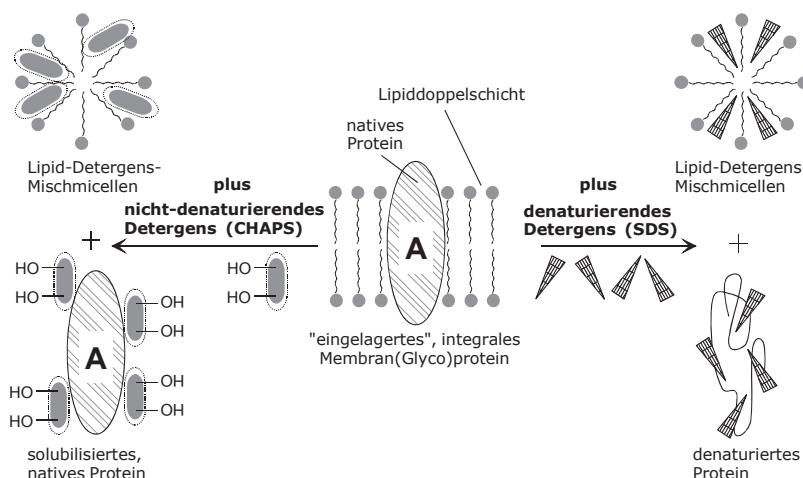
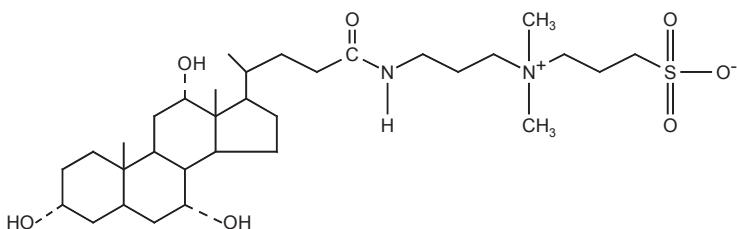


Abb. 2.57 Isolierung von (Glyco)proteinen aus Membranen

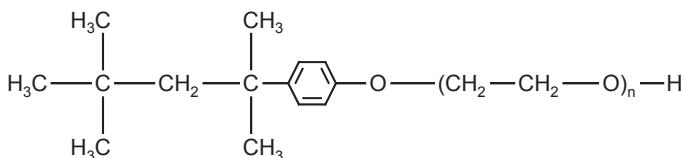
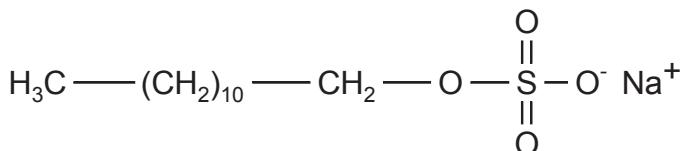
Tabelle 2.1 Detergenzen zur Isolierung von Membranproteinen (Auswahl)

	M [g/l]	Ladung	cmc [mM]
A: Nicht-denaturierende, halbsynthetische Detergenzen			
CHAPS; s. Abbildung 2.57 (1)	615	(+/-)	6-10
CHAPSO	631	(+/-)	8
Lauryl-Maltosid	511	0	0,16
Octyl-Glycosid	292	0	20
Decyl-Glycosid	292	0	2
Octyl-Glycosid	292	0	20
Natrium-Cholat	431	(-)	9
Natrium-Desoxycholat (DOC)	415	(-)	2
Natrium-Taurodesoxycholat (TDOC)	522	(-)	3
B: Schwach oder nicht-denaturierende Detergenzen			
C ₈ -Phenol-Polyethylenglycolether (Triton X100), Abbildung 2.57 (2)	625	0	0,2
Dodecyl-Polyethylenglycolether (Brij 35)	1200	0	0,05
Lauryl-Amidopropyl-Aminoxid (LAPAO)		0 (+/-)	0,2
Lauryl-Dimethylaminioxid (LDAO)	229	0 (+/-)	1-2
Polyethylenglycol-Sorbitol-Laurat (Tween 20)	1228	0	0,059
Polyethylenglycol-Sorbitol-Oleat (Tween 80)	1310	0	0,012
C: Denaturierende Detergenzen			
Dodecyltrimethyl-Ammoniumbromid (DTAB)	365	(+)	1
Lithium-Dodecylsulfat (LiDS)	272	(-)	6-8
Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Abbildung 2.57 (3)	289	(-)	8,3

Bevorzugt werden auch Glucose- oder Maltose-Glycoside aus der Gruppe der natürlichen und halbsynthetischen (A in Tabelle 2.1) verwendet. Sie enthalten eine weit ausgedehnte hydrophile Kopfgruppe mit der gewünschten nicht-denaturierenden Eigenschaft. Schwach denaturierend wirkende Detergenzen (Gruppe B in Tabelle 2.1) lagern sich lediglich an der Membranoberfläche an, da ihr hydrophiler und/oder hydrophober Molekülteil weiträumig ausgedehnt sind und nicht in das integrale Proteinmolekül eindringen können. Diese Solubilisierung beeinträchtigt die Konformation des Proteins und damit seine biologische Aktivität nur im geringen Maße, so dass eine Redenaturierung möglich ist. Weitverbreitet sind die kommerziellen Detergenzen Tween 80 oder Brij 35.



(1) : Cholamidopropyltrimethylammonium propylsulfonate (CHAPS)

(2) Triton X100 ($n=9-10$)

(3) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Abb. 2.58 Strukturen einiger ausgewählter Detergenzien (s. Tabelle 2.1)

Detergenzien mit relativ langem hydrophobem Kopfteil können dagegen intensiv in die Raumstruktur des Membranproteins eindringen. Die dabei entstehende Konformationsänderung führt in der Regel zum kompletten Verlust der biologischen Aktivität. Nur in Proteinen wie z.B. Pepsin, die Disulfidbrücken enthalten, kann die denaturierende Wirkung durch Detergenzien wie SDS ausbleiben.

Die hier aufgeführten Beispiele enthalten die Strukturformeln einiger wichtiger (vgl. auch Tabelle 2.1) nicht-denaturierender, schwach denaturierender und denaturierender Detergenzien.

2.3.3 Enzymatische Sequenzierung der Glycane

Nach der Isolierung von Glycoproteinen aus biologischen Membranen schließen sich weitere Charakterisierungen dieser Biomoleküle an.

Eine zentrale Frage ist die Sequenzierung des Proteins hinsichtlich seiner Aminosäurezusammensetzung, was heutzutage routinemäßig durchgeführt wird und nicht Gegenstand dieses Buches ist.

Von besonderem Interesse, wie bereits erwähnt, sind die Strukturen der an die Glycoproteine angehefteten Kohlenhydratketten (Glycane).

Mit Hilfe hochspezifischer Enzyme (Tabelle 2.2) können die einzelnen Monosaccharid-Species in den Glykanketten sukzessive identifiziert werden. Dies gilt sowohl für einzelne Oligosacharide, die z.B. als intakte Glykankette von einem Glycoprotein zuvor abgetrennt und chromatographisch vom Proteinrest gereinigt worden (s. Abschnitt 2.3.4), als auch für solubilisierte und entsprechend rein dargestellte Membran(Glyco)proteine.

Abbildung 2.59 zeigt den schematischen Ablauf dieser enzymatischen Sequenzierung und weist auf die Spezifität der Glycosidasen (vgl. Tabelle 2.2) hin.

In einer ersten einfachen Betrachtung werden mit den entsprechenden Enzymen die Monosaccharid-Species an den äußersten Rändern der Glykankette abgespalten. β -Galactosidase beispielsweise eliminiert die Galactosemoleküle, α -Fucosidase die Fucosebausteine und die β -N-Acetylhexosaminidase ist selektiv für die Abtrennung der N-Acetylglucosamin-Bausteine.

Wie aus der umfangreichen Übersicht (Tabelle 2.2) hervorgeht, können die Enzyme sowohl die Verknüpfungen der Monosaccharid-Species an den einzelnen Bindungsstellen (1-2, oder 1-6) als auch die anomeren Formen (α oder β) „erkennen“ und hydrolysieren.

Verwiesen sei auch auf die Sequenzierung von N-Glycanen mittels RAAM-Technik (RAAM: reagent array analysis method).

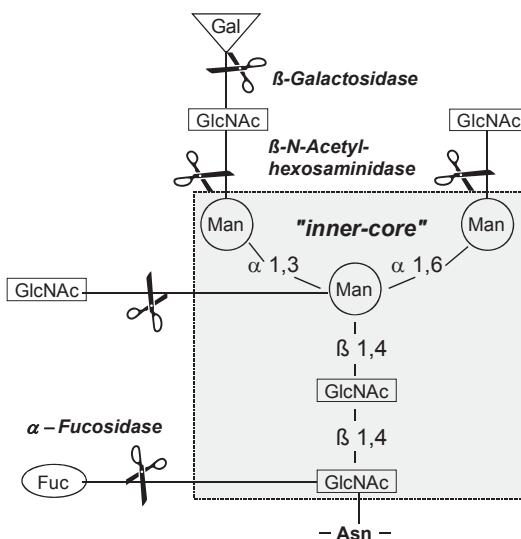


Abb. 2.59 Prinzip der enzymatischen Sequenzierung der Glycane

Tabelle 2.2 Spezifität von Glycosidasen und Amidohydrolasen bei der enzymatischen Sequenzierung von Glycanen

Enzym	Monosaccharide	Herkunft	A¹	AP²
Sialidase	Sia (NANA)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	α	6>3, 8
	"	<i>Clostridium perfringens</i>	α	3, 6, 8
	"	<i>Vibrio cholerae</i>	α	3, 6, 8
	"	<i>Salmonella typhimurium</i>	α	3>6>>8, 9
	"	<i>Newcastle Disease Virus</i>	α	3, 8
α-Galactosidase	Galactose	<i>Coffee bean</i>	α	3, 4, 6
	Galactose	<i>Jack bean</i>	β	6>4>3
β-Galactosidase	"	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β	4
	"	<i>Bovine testes</i>	β	3, 4>6
	"	<i>Chicken liver</i>	β	3, 4
β-N-Acetylhexosaminidase	GlcNAc / GalNAc	<i>Jack bean</i>	β	2, 3, 4, 6
	GlcNAc / GalNAc	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β	2, 3
	GlcNAc	<i>Chicken liver</i>	β	3, 4
α-N-Acetylgalactosaminidase	GalNAc	<i>Chicken liver</i>	α	3, Serin / Threonine
α-Mannosidase	Mannose	<i>Jack bean</i>	α	2, 6>3
	"	<i>Aspergillus saitoi</i>	α	2
β-Mannosidase	Mannose	<i>Helix pomatia</i>	β	2, 3
α-Fucosidase	Fucose	<i>Chicken liver</i>	α	2, 3, 4, 6
	"	<i>Bovine epididymis</i>	α	6>2, 3, 4
	"	<i>Almond meal</i>	α	3, 4
	"	<i>Almond meal</i>	α	2
	"	<i>Charonia lampas</i>	α	2, 6>>3, 4
β-Xylosidase	Xylose	<i>Charonia lampas</i>	β	3, 4
		<i>Almond meal</i>	β	3, 4
Endo-β-galactosidase	Galactose	<i>Bacteroides fragilis</i>	β	4
Endoglycosidase H	GluNAc	<i>Streptomyces plicatus</i>	β	4

¹ Anomer² Angriffspunkt(e)

2.3.4 Freisetzung der Glycane aus Proteinen

Für eine umfassende Oligosaccharid-Strukturaufklärung von Glycoproteinen sind die Abtrennung der intakten Glykanketten vom Proteinteil sowie eine anschließende chromatographische Auf trennung der einzelnen Fraktionen erforderlich.

Zur Freisetzung der Kohlenhydratketten ist es notwendig, die glycosidischen Bindungen von Glycoproteinen zu spalten. Dazu dient in der Regel eine chemische Methode, die Hydrazinolyse, oder die enzymatische Isolierung mit Hilfe der Peptid-*N*-glycosidase F (PNGase F).

2.3.4.1 Enzymatische Isolierung

Nach der chromatographischen Reinigung eines Glycoproteins erfolgt die Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung zwischen *N*-Acetylglucosamin und der Asparaginsäure mit Hilfe der spezifischen Amidohydrolase PNGase F aus *Flavobacterium meningosepticum*. Dafür ist es notwendig, die *N*-glycosidische Bindung durch vorherige Denaturierung des Proteins für den Enzymangriff besser zugänglich zu machen.

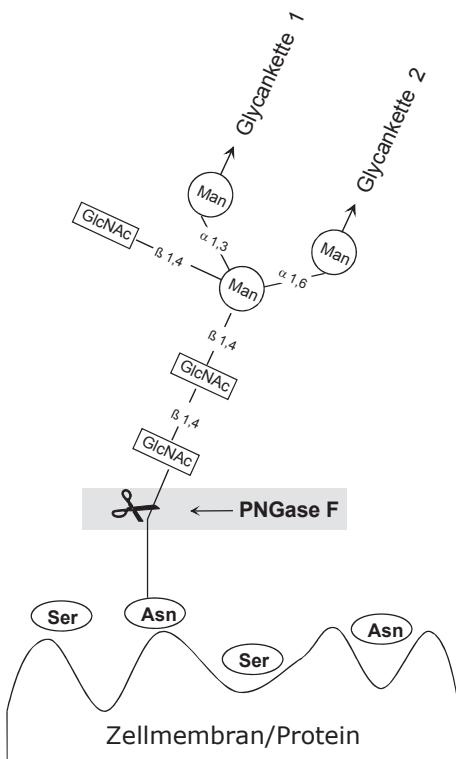


Abb. 2.60 Enzymatische Hydrolyse der intakten Glykanketten

Die Spaltung einer *O*-glycosidischen Bindung kann mit Hilfe der Endo- α -N-acetylgalactosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae* realisiert werden. Der Angriff des Enzyms erfolgt zwischen der Galactose- β 1-3-N-Acetylgalactosamin-Gruppierung ($\text{Gal}\beta$ 1-3GalNAc) und dem α -Serin oder α -Threonin.

2.3.4.2 Hydrazinolyse

Als chemische Methoden zur Freisetzung von Glycanen aus Glycoproteinen dienen die alkalische Hydrolyse und bevorzugt die Hydrazinolyse. Dieser folgen in weiteren Reaktionsschritten die Re-N-Acetylierung und die Abtrennung von Acetylhydrazone. Dadurch werden sowohl *N*- als auch *O*-glycosidische Bindungen von Glycoproteinen gespalten. Die resultierenden Glycane befinden sich danach in einem intakten Zustand, d.h., sie werden durch Hydrazin vor Spaltungsreaktionen geschützt. Die Ausbeuten an Glycanen sind meist größer als 85%.

Die Glycane können danach mit Hilfe von chromatographischen Methoden von den entstandenen Peptid- bzw. Proteinfragmenten abgetrennt, gereinigt sowie in einzelne Glykanketten (Individuen) aufgetrennt werden.

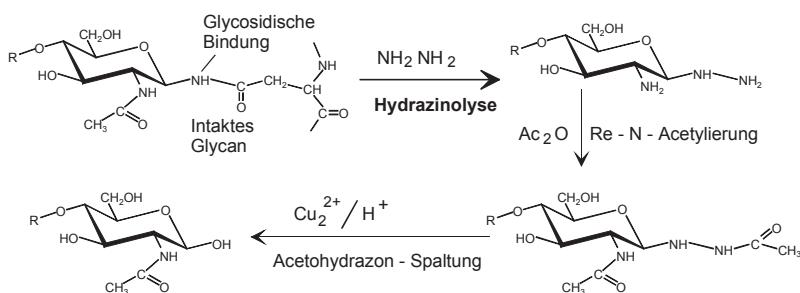


Abb. 2.61 Prinzip der Hydrazinolyse von Glykanketten

2.3.5 Markieren der Glycane

Nach dem Vorliegen der Glycane in möglichst hochreinem Zustand stellt sich die Frage nach ihrer chromatographischen Trennung und sensitiven Detektion, da oft nur sehr geringe Mengen an Glycoproteinen aus biologischen Materialien zur Verfügung stehen. Da die Oligosaccharidketten (Glycane) keine UV-aktiven chromophoren Gruppen enthalten, sind zur Registrierung kleinstter Kohlenhydratmengen Markierungen bzw. Derivatisierungen erforderlich.

Für die Kohlenhydrate insgesamt werden die unterschiedlichsten Derivatisierungsreaktionen mit fluoreszierenden Reagenzien eingesetzt. Kohlenhydrate können vor (*pre column derivatisation*) oder nach der Chromatographiesäule (*post column derivatisation*) in fluoreszierende Derivate konvertiert werden.

Die Reaktion der Kohlenhydrate nach der Säule kann mit 2-Ethanolamin, Ethylen diamin oder 2-Cyanoacetamid unter schwach basischen Bedingungen oder mit Arylamidinen im stark alkalischen Milieu erfolgen.

Für die *pre column derivatisation* von reduzierenden Kohlenhydraten werden fluoreszierende Reagenzien wie 2-Aminopyridin oder 9-Fluorenylmethylchlorformiat-(Fmoc)-hydrazin eingesetzt.

Zur Markierung der Kohlenhydrate (Glycane), die aus Glycoproteinen freigesetzt wurden, dient die reduktive Aminierung mit fluoreszierenden Verbindungen wie 2-Aminobenzamid (2-AB) oder 2-Amino(6-amidobiotinyl)pyridin (BAP).

Derartige Reaktionen müssen unabhängig von der Kohlenhydratsequenz der einzelnen Glykanketten sein und an einem reduzierenden Ende des Moleküls angreifen.

2.3.5.1 Fluoreszenzmarkierung mit 2-AB und BAP

Fluoreszenzmarkierte Glycane können mit hoher Empfindlichkeit (pmol-Bereich) detektiert werden. Die einzelnen Reaktionsschritte der reduktiven Aminierung mit 2-Aminobenzamid sind in Abbildung 2.62 dargestellt.

Zur chromatographischen Trennung der markierten Kohlenhydrat-Species kommen verschiedene HPLC-Methoden (s. a. die Abschnitte 15.7, 15.8, 15.12) wie z.B. die Anionenaustauschchromatographie zum Einsatz.

Der Ablauf einer reduktiven Aminierung von Glycanen mit der Fluoreszenzverbindung 2-Amino(6-amidobiotinyl)pyridin (BAP) zeigt die Abbildung 2.63.

Die markierten Glycan-Komponenten werden meist mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie getrennt.

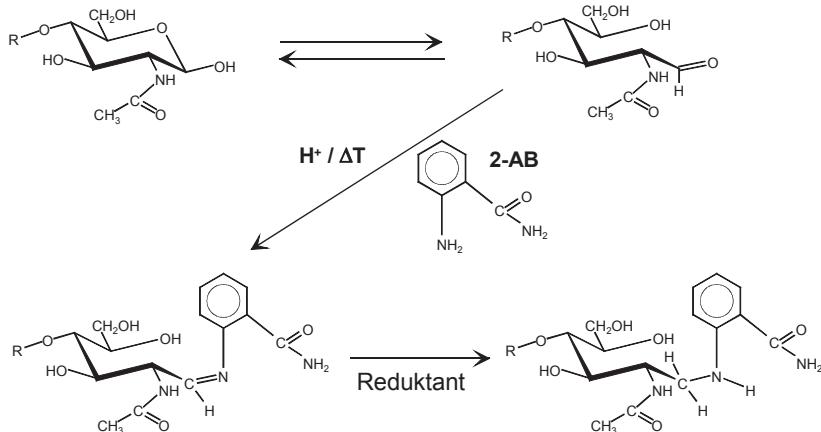


Abb. 2.62 Fluoreszenzmarkierung mittels 2-Aminobenzamid

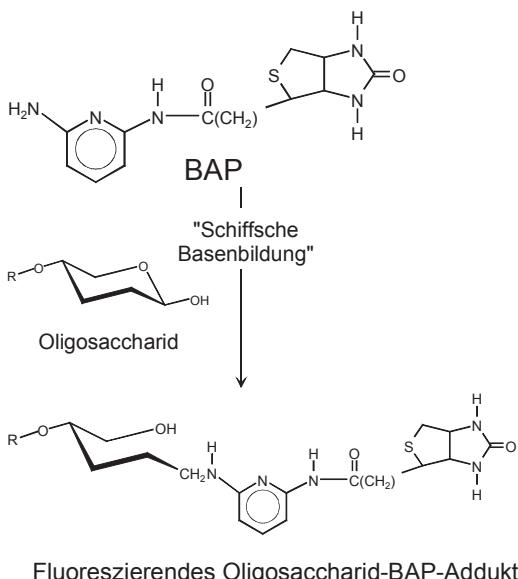


Abb. 2.63 Fluoreszenzmarkierung mittels BAP

2.3.5.2 Radioaktive Markierung

Zur Markierung der Glykanketten wird Natriumborhydrid eingesetzt. Das Wasserstoffisotop ^3H (Tritium) wird dabei in den reduzierenden Teil des Glycanmoleküls eingebaut, und es entsteht ein radioaktiv markiertes Oligosaccharid-Alditol.

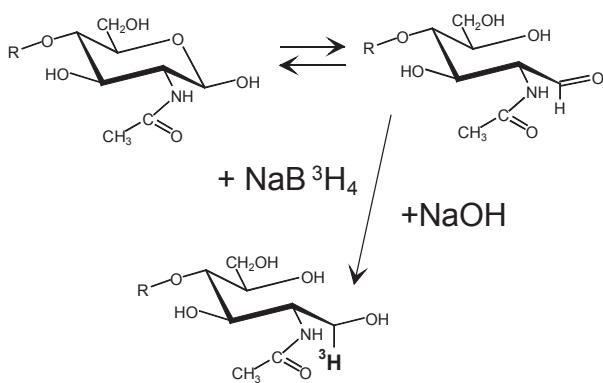


Abb. 2.64 Markierung der Glycane durch Reduktion mit Natriumborhydrid

2.4 Lipide

Lipide sind wasserunlösliche und fettähnliche Moleküle, die nur in Flüssigkeiten wie Chloroform, Ether oder Kohlenwasserstoffen löslich sind. Lipide werden in die Gruppe der Fette (Neutralfette, Wachse) und in die Lipoide (Phospholipide, Glycolipide, Carotinoide, Steroide) unterteilt.

Lipide dienen als Brennstoffmoleküle, Signalüberträger oder Energiespeicher. Über das Vorkommen und wichtige Eigenschaften von Lipiden in biologischen Membranen sowie über die Ausbildung von Lipiddoppelschichten und Micellen wurde bereits ausführlich im vorhergehenden Abschnitt 2.3 berichtet.

Die Lipid-Hauptgruppen sind die Phospholipide, die auch als Phosphatide oder Phosphoglyceride bezeichnet werden, die Glycolipide und spezielle Kohlenwasserstoffe wie Squalen oder Cholesterin. Diese Vertreter verfügen über einen hydrophilen und hydrophoben Molekülteil, wie aus Tabelle 2.3 hervorgeht.

Tabelle 2.3 Lipidklassen und funktionelle Gruppen

Lipidklasse	Vertreter	hydrophile Gruppe	hydrophobe Gruppe	Extraktionsmittel
mehr polare Lipide	<i>Phospholipide:</i> Phosphatidylserin, -ethanolamin	phosphorylierter Alkohol	Fettsäureketten	polare Lösungsmittel wie MeOH, EtOH
mehr polare Lipide	<i>Glycolipide:</i> Cerebrosid, Sphingomyelin	Zuckerreste	Kohlenwasserstoff-/Fettsäureketten	Detergenzien wie CHAPS
mehr unpolare Lipide	<i>Kohlenwasserstoffe:</i> Squalen, Cholesterin		Kohlenwasserstoffketten OH-Gruppe	unpolare Lösungsmittel wie CHCl ₃ , Benzen

2.4.1 Strukturen

Die Neutralfette sind Triester des Glycerins mit langen Fettsäureketten, während die Wachse Ester von einwertigen langkettigen Alkoholen mit höheren Fettsäuren darstellen.

Man unterscheidet zwischen gesättigten Fettsäuren wie Stearinsäure und ungesättigten Fettsäuren mit einer Doppelbindung (Ölsäure) sowie mit zwei oder mehreren Doppelbindungen. Weiterhin existieren sogenannte atypische Fettsäuren.

Im Abschnitt 15.9 werden charakteristische Eigenschaften und Funktionen sowie analytische Methoden (GC, GC-MS, HPLC) zur Identifizierung dieser Fettsäuren behandelt.

In der Tabelle 2.4 sind die Strukturen und Trivialnamen einiger häufig in tierischen und pflanzlichen Organismen vorkommenden Fettsäuren aufgelistet.

Tabelle 2.4 Natürlich vorkommende Fettsäuren (Auswahl)

Trivialname	Struktur	Doppelbindungen
Laurinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	
Myristinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	
Palmitinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	
Stearinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	
Arachinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	
Lignocerinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	
Palmitoleinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	≤ ⁹
Ölsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	≤ ⁹
Linolsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	≤ ^{9,12}
α-Linolensäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2[\text{CH}=\text{CHCH}_2]_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	≤ ^{9,12,15}
Arachidonsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4[\text{CH}=\text{CHCH}_2]_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	≤ ^{5,8,11,14}

Bedeutsame Vertreter aus der Gruppe der Lipoide sind die Phospholipide. Diese polaren Moleküle leiten sich von den Alkoholen Glycerin oder Sphingosin ab, deren Strukturen nachstehend dargestellt sind.

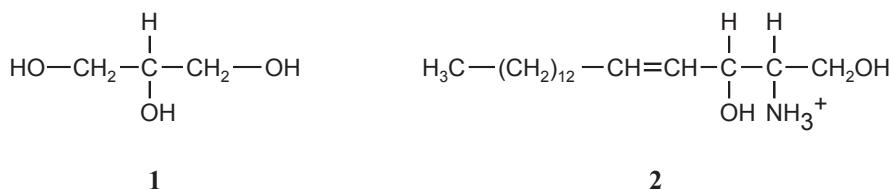


Abb. 2.65 Struktur von Glycerin (1) und Sphingosin (2)

Im Falle eines Phosphoglycerides setzt sich die Molekülstruktur aus Glycerin, zwei Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol zusammen.

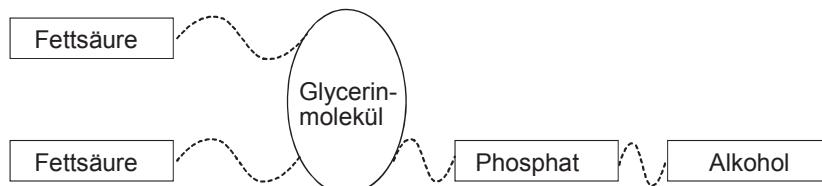


Abb. 2.66 Bestandteile eines Phosphoglycerides

In Phosphoglyceriden sind die Hydroxylgruppen am C₁- und C₂-Atom des Glycerins mit den Carboxylgruppen zweier Fettsäuren und die C₃-Hydroxylgruppe mit Phosphorsäure verestert. Diese Verbindung ist das einfachste Phosphoglycerid und wird als Phosphatidat bezeichnet.

Die häufigsten und wichtigsten Phosphoglyceride sind Abkömmlinge der Phosphatidat-Struktur und entstehen durch Veresterung der Phosphorylgruppe mit der Hydroxylgruppe eines von mehreren Alkoholen.

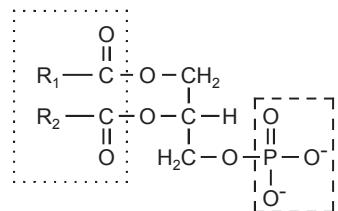
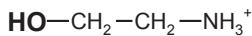
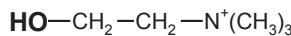


Abb. 2.67 Struktur des Phosphatidats

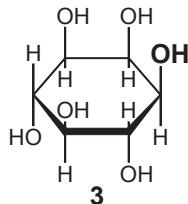
Typische Alkoholkomponenten in Phosphoglyceriden sind Ethanolamin, Cholin, Inositol, Serin oder auch Glycerin.



1



2



$$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\text{NH}_3^+-\text{COO}$$

4

4

Abb. 2.68 Struktur von Ethanolamin (1), Cholin (2), Inositol (3) und Serin (4)

Wichtige Vertreter der Phosphoglyceride (s. Analytik in 15.13) sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol.

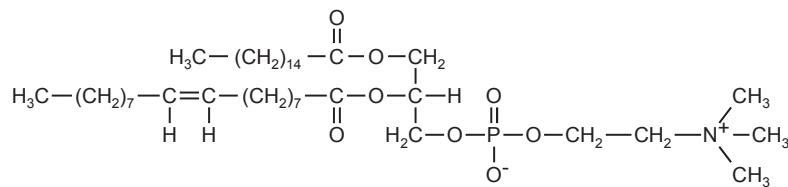


Abb. 2.69 Struktur von Phosphatidylcholin

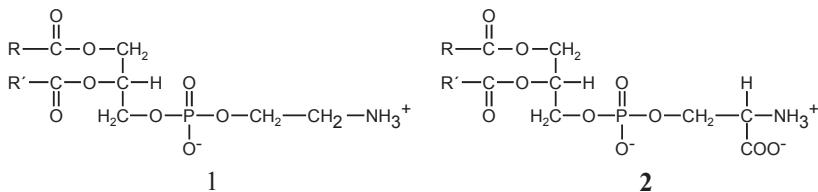


Abb. 2.70 Struktur von Phosphatidylethanolamin (1), Phosphatidylserin (2)

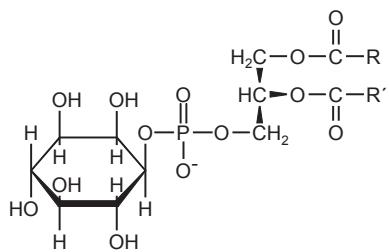


Abb. 2.71 Struktur von Phosphatidylinsitol

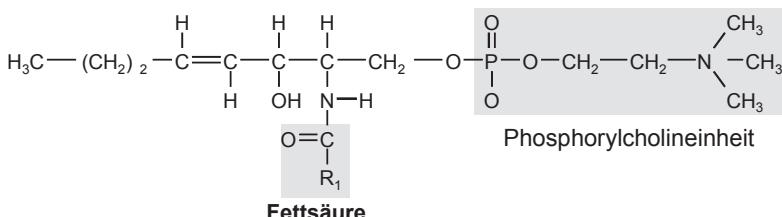


Abb. 2.72 Struktur von Sphingomyelin

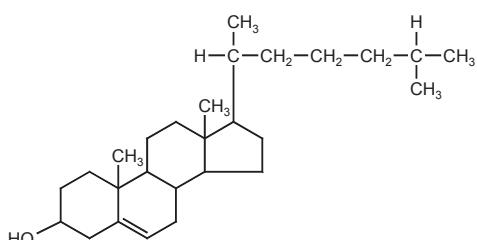


Abb. 2.73 Struktur von Cholesterin

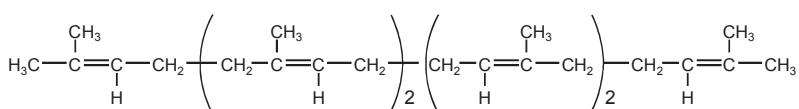


Abb. 2.74 Struktur von Squalen

Im Phospholipid Sphingomyelin ist an Stelle des Glycerins ein Sphingosinmolekül angeordnet. Diese Verbindung ist ein langkettiger und ungesättigter Alkohol. In der Struktur des Sphingomyelins ist die Aminogruppe des Sphingosinrückgrats durch eine Amidbindung mit einem Fettsäuremolekül verknüpft und seine primäre Hydroxylgruppe mit Phosphocholin verestert.

Zu den weiteren wichtigen Lipidstrukturen gehören das Cholesterin, Squalen, Ceramid und Cerebroside (s. Abbildung 2.73 bis 2.76).

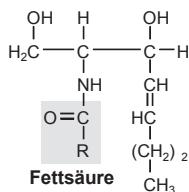


Abb. 2.75 Struktur von Ceramid

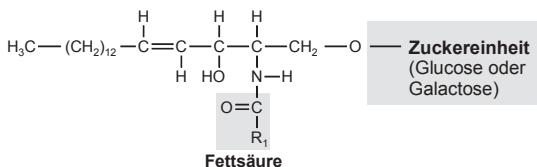


Abb. 2.76 Struktur des Glycolipids Cerebrosid

2.4.2 Biosyntheseprozesse

Die schematisch aufgezeigten Biosyntheseprozesse für ausgewählte Lipide sollen stellvertretend dazu anregen, die Wege des biochemischen Anabolismus und Katabolismus von Biomolekülen in der entsprechenden Fachliteratur nachzulesen und zu vertiefen.

2.4.2.1 Cholesterin und Squalen

Cholesterin wurde bereits im Jahre 1784 aus Gallensteinen isoliert. Seine Unlöslichkeit in Wasser verleiht dieser organischen Verbindung einerseits wichtige Funktionen in Zellmembranen. Andererseits sind damit Ablagerungen im menschlichen Organismus und gesundheitliche Risiken verbunden.

Cholesterin stellt außerdem eine Vorstufe zur Synthese von Steroidhormonen wie Testosteron, Progesteron, Cortisol oder Östradiol dar. Erste Untersuchungen zur Biosynthese von Cholesterin gehen auf Arbeiten von K. Bloch in den 40-er Jahren zurück. Er markierte Acetat mit radioaktivem Kohlenstoff und verfütterte diese Substanzen an Ratten. Das in den Tieren synthetisierte Cholesterin trug die Isotopenmarkierung, und es konnte der Beweis angetreten werden, dass das Acetat als Vorstufe für die Cholesterinsynthese fungiert.

Durch die radioaktive Markierung konnte festgestellt werden, dass alle Kohlenstoffatome des Cholesterins vom Acetyl-Coenzym A stammen.

Die Tatsache, dass Squalen (Abbildung 2.74) aus Isopreneinheiten aufgebaut ist, und der erzielte Nachweis, dass Squalen bei der Cholesterinsynthese als Zwischenprodukt entsteht, führten zu einer weiteren Aufklärung des Gesamtbiosyntheseweges. Weiterhin wurde das Mevalonat (Abbildung 2.77) als Zwischenprodukt entdeckt, das durch Decarboxylierung in das Isopentenylpyrophosphat übergeht.

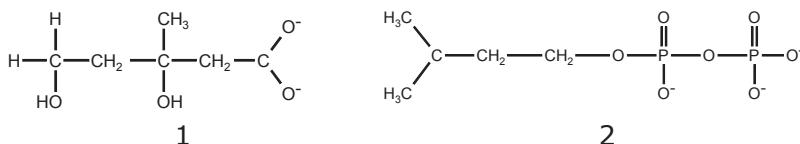
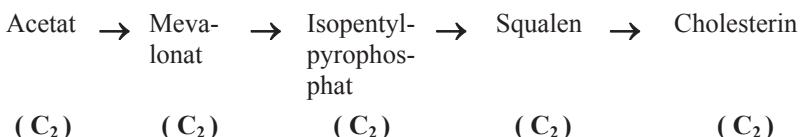


Abb. 2.77 Struktur von Mevalonat (1) und Isopentenylpyrophosphat (2)

Daraus resultierten die einzelnen Biosynthese-Stufen vom Acetat über das Squalen zum Cholesterin.



2.4.2.2 Ceramid und Cerebroside

Die sogenannten Sphingolipide unterscheiden sich von den Phosphoglyceriden dadurch, dass das Glycerin im Rückgrat des Moleküls durch Sphingosin substituiert ist. Das Ceramid (*N*-Acylsphingosin) entsteht durch Reaktion eines langketigen Acetyl-CoA mit Sphingosin (Abbildung 2.65). Im Sphingomyelin tritt als Substituent Phosphocholin auf, das aus CDP-Cholin stammt.

In einem Cerebrosid (Abbildung 2.76) ist ein Kohlenhydrat (Glucose oder Galactose) an die terminale Hydroxylgruppe des Ceramids gebunden, wobei UDP-Glucose oder UDP-Galactose als Zuckerdonatoren fungieren.

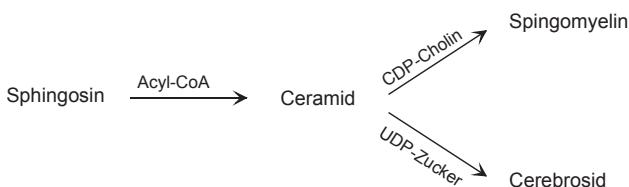


Abb. 2.78 Synthese von Ceramid: Vorstufe von Spingomyelin und Cerebroside

2.5 Pharmaka, Vitamine, Farbstoffe

Eigenschaften und Strukturen dieser i.d.R. niedermolekularen Verbindungsklassen stehen mit den anwendbaren analytischen Nachweismethoden in engen Zusammenhängen. So sind Pharmaka meist polar und damit wasserlöslich. Sie können dadurch aus dem menschlichen Körper besser eliminiert werden. Für ihre chromatographische Analyse wurden spezielle Trennsysteme entwickelt und optimiert (siehe Kapitel 15.1).

Vergleichbares gilt für wasser- und fettlösliche Vitamine. Sie müssen bei flüssigchromatographischen Trennungen im entsprechend ausgewählten Eluent gut löslich sein – das hydrophile Vitamin C zum Beispiel im sauren Wasser oder lipophiles Vitamin E in unpolaren Eluenteren wie Hexan.

Auch Farbstoffe, die in natürlichen Lebensmitteln vorkommen (z.B. Lycopin in der Tomate) oder die als Zusatzstoffe in den Lebensmitteln enthaltenen Farbstoffe müssen toxikologisch unbedenklich sein. Während das Lycopin hydrophob ist, sind Lebensmittelfarbstoffe mit den E-Nummern 120 (Ponceau R, Abb. 2.93) oder 124 (Gelborange, Abb. 2.94) eher hydrophiler Natur. Diese werden in der Dünnschichtchromatographie mit wässrig-polaren mobilen Phasen eluiert.

Bei lipophilen Azofarbstoffen (4-Aminoazobenzol, Abb. 2.96) erfolgt die Elution mit unpolaren Flüssigkeiten wie z.B. Toluol.

2.5.1 Pharmaka

Die Bezeichnung Pharmaka (griech: „Gift, Droge, Arznei“) kann begrifflich auch für die Termini Wirkstoff, Arzneistoff bzw. Arzneimittel verwendet werden.

So ist ein Wirkstoff eine Substanz, die im Körper einen pharmakologischen Effekt hervorruft, während der Begriff Arzneistoff auf die therapeutische bzw. diagnostische Applikation fokussiert ist.

Unter Arzneimittel versteht man hingegen die Zubereitung eines oder mehrerer Arzneistoffe für die Anwendung am Patienten bzw. Probanden.

Anhand einiger weniger ausgewählter pharmazeutischer Wirkstoffe soll auf die Problematik der analytischen Bestimmung hingewiesen werden.

Weitbekannt sind Acetylsalicylsäure (ASS) und Paracetamol. Acetylsalicylsäure wird unter dem Namen Aspirin vermarktet und wirkt schmerzstillend, fiebersenkend und entzündungshemmend.

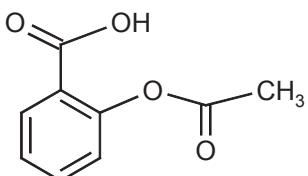


Abb. 2.79 Acetylsalicylsäure

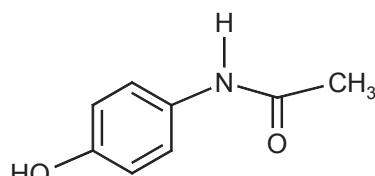


Abb. 2.80 Paracetamol

Der Wirkstoff (Abb. 2.79) ist gut in Alkohol löslich, jedoch weniger gut in kalter wässriger Lösung. Dies ist auf den hydrophoben aromatischen Ring zurückzuführen. Die Heteroatome im Molekül der Acetylsalicylsäure verleihen ihr eine gewisse Polarität. Die Wasserlöslichkeit verbessert sich bei Temperaturerhöhung.

Acetylsalicylsäure wirkt durch die Hemmung der Cyclooxygenase bereits in kleineren Mengen blutgerinnungshemmend. Bei ansteigender Dosis erfolgt die Hemmung der Prostaglandinbildung und es tritt eine schmerzstillende, antirheumatische sowie fiebersenkende und entzündungshemmende Wirkung ein.

Paracetamol (Abb. 2.80) ist auch ein schmerzstillender und fiebersenkender Arzneistoff und besitzt vergleichbare Eigenschaften wie Acetylsalicylsäure. Zusammen mit anderen Wirkstoffen wie Amitriptylin (Abb. 2.81), Diphenhydramin (Abb. 2.82) können sie bei Elution mit alkoholisch-wässrigen Eluenten einzeln analysiert werden (siehe Kapitel 15.1).

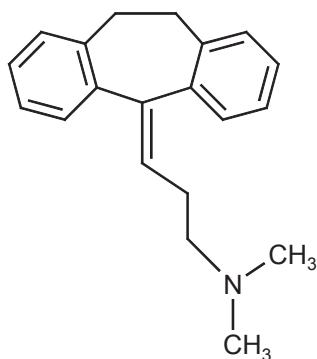


Abb. 2.81 Amitriptylin

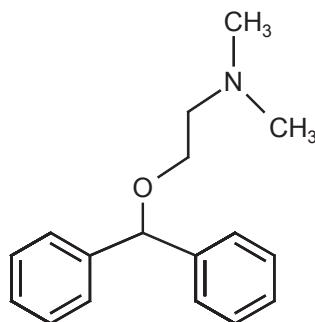


Abb. 2.82 Diphenhydramin

Zu den weiteren Pharmaka von besonderem Interesse gehören die sogenannten Lokalanästhetika, die in der Chirurgie oder Zahnmedizin zur örtlichen Betäubung dienen. Bekannte Vertreter sind Benzocain, Procain, Tetracain und Lidocain (Abb. 2.83–2.86). Ihre Erscheinungsform als weiße kristalline Pulver, die ein leichtes Kribbeln z.B. auf der Zunge erzeugen können, machen die Lokalanästhetika als „Streckungssubstanzen“ für „Cocain-Präparate“ (s. auch Kapitel 15.2) interessant.

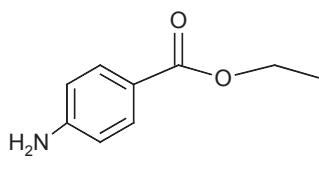


Abb. 2.83 Benzocain

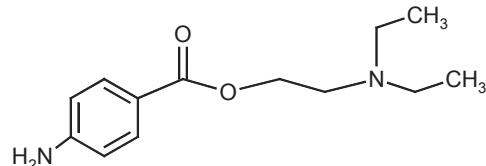


Abb. 2.84 Procain

Auch hier weisen die Moleküle einerseits hydrophobe Phenylgruppen und andererseits polare Heteroatome auf. Saure RP-HPLC oder Ionenpaarchromatographie bieten sich somit für flüssigchromatographische Analysen an. Als Alternative in der Pharmazeutischen dient zunehmend die Kapillarelektrophorese (CE, Kapitel 8.4). Entsprechende CE-Applikationen dieser Lokalanästhetika werden in Abbildung 8.47 präsentiert.

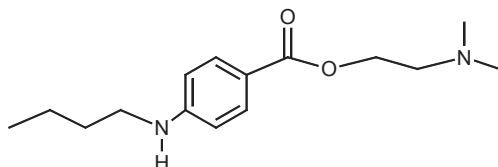


Abb. 2.85 Tetracain

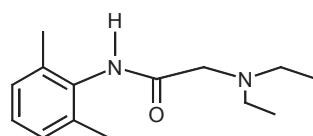


Abb. 2.86 Lidocain

2.5.2 Wasserlösliche Vitamine

Zu den wasserlöslichen Vitaminen gehören neben der Ascorbinsäure (Vitamin C) auch Vitamin B₁ (Thiamin), Vitamin B₂ (Riboflavin), Vitamin B₆ (Pyridoxin), Vitamin B₉ (Folsäure), Vitamin B₁₂ (Cobalmin) sowie Niacin (Nicotinsäure, Vitamin B₃), Biotin (Vitamin B₇, Vitamin H) und Pantothenäure (Vitamin B₅).

Ascorbinsäure (Abb. 2.87) ist eine leicht oxidierbare organische Säure und wirkt deshalb antioxidativ. Die Säure ist licht- und sauerstoffempfindlich.

Sie besitzt einen hydrophilen Charakter und eine Doppelbindung im Molekül. Vitamin C ist in früheren Zeiten vor allem auch durch die alte Seefahrerkrankheit „Skorbut“ bekannt geworden. Das Fehlen von Ascorbinsäure führt zu Mangelkrankheiten (Skorbut), die sich durch Zahnfleischbluten oder in schweren Fällen auch durch Zahnausfall zu erkennen geben.

Ascorbinsäure kommt u.a. in Citrusfrüchten vor – meist gemeinsam mit der Citronensäure. Diese besitzt drei Carboxylgruppen im Molekül (Abb. 2.88) und sollte deshalb etwas polarer als die Ascorbinsäure sein.

Auch in vielen Obst- und Gemüsesorten ist Vitamin C reichlich vorhanden, z.B. in Camu-Camu-Früchten, Hagebutten, schwarzen Johannisbeeren oder im Rosenkohl.

Beide organischen Säuren können mit einfachen, aber sehr robusten wässrigen Trennsystemen analysiert werden (s. Kapitel 5.2.1, 5.2.2, 5.2.5).

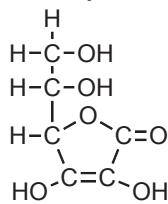


Abb. 2.87 Ascorbinsäure (Vitamin C)

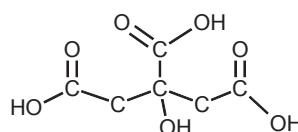
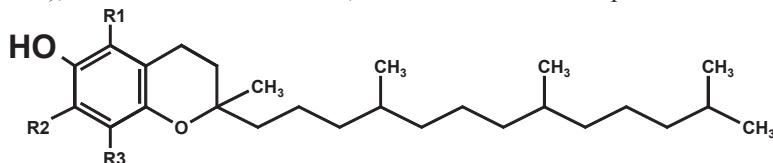


Abb. 2.88 Citronensäure

2.5.3 Fettlösliche Vitamine

Zu den fettlöslichen Vitaminen zählen das Vitamin A (Retinol), Vitamin D (Calcidiol), Vitamin K und Vitamin E, das aus einzelnen Tocopherolen besteht.



Chromanol-Ring

Abb. 2.89 Vitamin E (Tocopherole)

Abbildung 2.89 zeigt den gemeinsamen strukturellen Aufbau; die einzelnen Spezies α - , β - , γ - und δ - Tocopherol unterscheiden sich nur geringfügig in den Substituenten R1, R2 und R3 (siehe Tabelle 2.5), d.h., in der Anzahl von H-Atomen bzw. von CH₃-Gruppen. Im Vergleich zum Gesamt molekül, das durch den Chromanolring mit aromatischem Charakter und die hydrophobe Alkylkette gekennzeichnet ist, sind das infinitesimalen strukturelle Unterschiede.

Tabelle 2.5 Substituenten von α - , β - , γ - und δ - Tocopherol

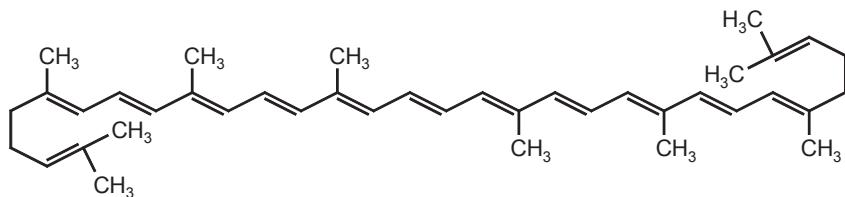
Form	R1	R2	R3
Alpha	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta	CH ₃	H	CH ₃
Gamma	H	CH ₃	CH ₃
Delta	H	H	CH ₃

Insofern stellt sich hier die Frage, inwieweit derartige Spezies mit geringen Strukturunterschieden analytisch differenziert werden können. Die Antwort gibt erstaunlicherweise schon eine Normalphasenchromatographie (s. Kapitel 4.3.1).

2.5.4 Lebensmittelfarbstoffe/Azofarbstoffe

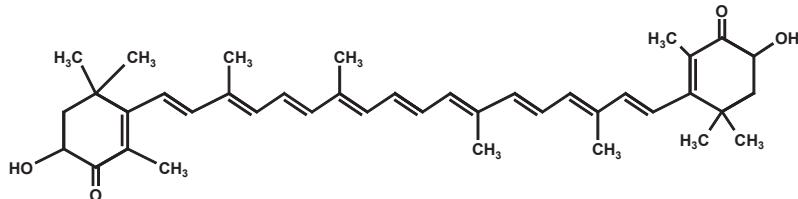
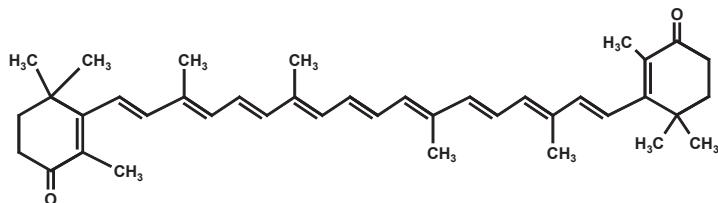
Die Vielfalt der Farben und Farbstoffe erfordert eine gewisse Begrenzung und Systematisierung. Wir kennen charakteristische natürliche Farbstoffe wie das Lycopin (Abb. 2.90), das für die rote Farbe der Tomate verantwortlich ist. Es ist charakterisiert durch zahlreiche konjugierte Doppelbindungen, die das „Rot“ des Moleküls im sichtbaren Spektralbereich hervorbringen.

Besonders reichlich vorhanden/konzentriert ist Lycopin im Tomatenmark, woraus es mit unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan oder Isooctan extrahiert werden kann.

**Abb. 2.90** Lycopin

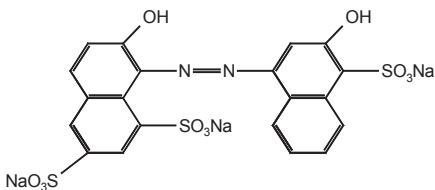
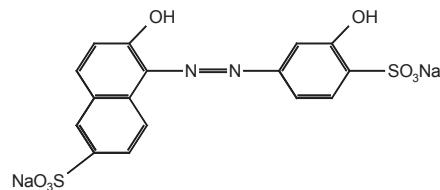
Ähnliche Strukturen findet man auch in „farbigen Tieren“ wie z.B. im Zuchtlachs. Durch die orangeroten Pigmente Astaxanthin und Canthaxanthin (Abb. 2.91 und 2.92), die als Futtermittelzusatz dienen, erhält das Zuchtlachsfilet seine typisch rosarote Farbe.

Wildlachse sind ähnlich gefärbt; der Fisch nimmt diese Färbung auf Grund des Verzehrs von Krabben und der darin enthaltenen Farbstoffe an.

**Abb. 2.91** Astaxanthin**Abb. 2.92** Canthaxanthin

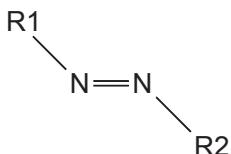
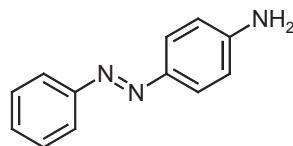
Lebensmittelfarbstoffe (Abb. 2.93 und 2.94) mit den E-Nummern sind oft Azofarbstoffe, die die charakteristische Azo-Bindung (Abb. 2.95) aufweisen.

Ponceau R (E 124) und Gelborange (E 120) sind nun toxikologisch geprüfte Lebensmittelfarbstoffe, die wiederum die rote Farbe in Lachsersatzproben ausmachen. Der Fisch wird damit lediglich „imprägniert“ und die Lebensmittelfarbstoffe können daraus leicht extrahiert werden. Die Wahl der extraktiv wirksamen Lösungsmittel lässt Schlussfolgerungen auf die Polarität der Farben zu. Sowohl Hexan als auch Wasser sind nicht bzw. nur wenig wirkungsvoll. Mittelpolares Ethanol ist dagegen gut geeignet.

**Abb. 2.93** Ponceau R, E 124**Abb. 2.94** Gelborange, E 120

Die Strukturen beider Farbstoffe weisen sowohl hydrophobe (aromatische) Strukturelemente als auch polare Segmente (Azo-Bindung, „Sulfonat“-Gruppen) auf. „Gleches löst sich im Gleichen“ – Ethanol ergibt sich auch aus diesen Strukturbetrachtungen als das geeignete Extraktionsmittel.

Andere Azofarbstoffe sind eher lipophil und für Lebensmittel aus toxikologischer Sicht bedenklich bzw. nicht vertretbar. Als Beispiel dient hier 4-Aminoazobenzol (Abb. 2.96), das auch als Anilingelb bezeichnet wird, kanzerogen ist und im Verdacht steht, mutagen zu sein. Deratige – eher lipophile Azofarbstoffe – können mittels TLC durch Elution mit unpolarem Toluol auf Silicagel-Platten in sehr schöne Farbbanden aufgetrennt werden.

**Abb. 2.95** Azo-Bindung**Abb. 2.96** 4-Aminoazobenzol

2.6 Literatur

- Berndt J (1995) Umweltbiochemie, Georg Fischer Verlag Stuttgart
 Dolphin D, Avramovic O, Poulsen R (1988) Glutathion, John Wiley & Sons
 Dose K (1994) Biochemie, Springer-Verlag Heidelberg
 Lehmann J (1996) Kohlenhydrate: Chemie und Biologie, Georg Thieme Verlag
 Schauer R (1992) Nachr Chem Tech Lab. 40:1227, Tools for Glycobiology, Oxford GlycoSystem UK (1994)
 Stillmann MJ, Shaw CF, Suzuki KT (1992) Metallothioneins, VCH-Verlag
 Stryer L (1990) Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Heidelberg
 Voet D, Voet, JG (1992) Biochemie, VCH-Verlag Weinheim
 Watson JD et al. (1993) Rekombinierte DNA, Spektrum Akademischer Verlag
 Roitt IM et al. (1995) Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
 Gey MH (1998) Instrumentelle Bioanalytik, Springer-Verlag Braunschweig/Wiesbaden
 Raem, AM, Rauch, P (2007) Immunoassays, Spektrum Akademischer Verlag
 Nelson, D, Cox, M (2008) Lehninger Biochemie, Springer-Verlag Berlin

Es ist ein Gesetz im Leben: Wenn sich
eine Tür vor uns schließt, öffnet sich
eine andere. Die Tragik ist jedoch, daß
man nach der geschlossenen Tür blickt
und die geöffnete nicht beachtet.

André Gide

3 Präanalytische Methoden

3.1 Einführung

Präanalytische Methoden beinhalten teilweise Techniken der Probennahme und vor allem die verschiedenen Möglichkeiten der Probenvorbereitung. Eine Probe besteht meist aus einer (komplexen) Matrix und einem oder mehreren Analyten.

Ziel präanalytischer Methoden ist die Überführung der Probe in eine für die analytische Bestimmung geeignete Form. Als Grundlage dienen die Isolierung, Reinigung und Konzentrierung von Analyten, um sie zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung mit chromatographischen, elektrophoretischen und strukturanalytischen Methoden bearbeiten zu können.

Dafür kommen u.a. Zerkleinern, Lösen, Homogenisieren, Verjüngen, Aufschlussverfahren und verschiedene Varianten von Extraktionstechniken (Kapitel 3.2) zum Einsatz, die für kleine und „robuste“ Moleküle besonders geeignet sind. Für weniger stabile Moleküle und hauptsächlich für Proteine/Enzyme, die unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität isoliert und gereinigt werden müssen, sind schonende präanalytische Methoden (Kapitel 3.3) anzuwenden.

Vor allem auch für den Einsatz empfindlicher instrumentalanalytischer Methoden (GC, HPLC, CE, MS, IR, UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie) zur Analyse von Inhaltsstoffen in komplexen Matrices aus den Bereichen Umwelt (z.B. Abwasser, Böden, Klärschlamm, Abluft von Industrieemissionen), Biotechnologie (Fermentationsmedien), Lebensmittelindustrie (Nahrungs- und Genussmittel), Pharmazeutische und Klinische Chemie (Serum, Plasma, Speichel, Urin, Blut), Biochemie und Medizin (Zellen und Gewebe) ist in der Regel eine sehr gründliche Probenvorbereitung (Probenreinigung und -konzentrierung der Analyte) erforderlich.

Ohne diese Präanalytik können sehr große Analysenfehler, nur geringe Reproduzierbarkeiten der Daten und vor allem auch unerwünschte Kontaminationen der Geräteteile sowie ein starker Verschleiß von Materialien wie HPLC- und GC-Trennsäulen eintreten.

3.2 Extraktionstechniken

Extraktion bedeutet die Überführung eines oder mehrerer Analyte von einer Phase in die andere Phase. Klassisches Beispiel ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, 3.2.2). Dabei wird eine wässrige Lösung mit einem in Wasser nicht löslichen bzw. nicht mischbaren organischen Lösungsmittel verwendet.

Die Grundlage ist der Verteilungskoeffizient K_D , der die Verteilung einer Komponente (eines Analyten) zwischen Wasser (Phase 1) und dem organischen Extraktionsmittel (Phase 2) beschreibt.

$$K_D = \frac{c_2}{c_1} = \frac{m_2 V_1}{m_1 V_2} = \frac{(1-q) m V_1}{q m V_2} \quad (3.1)$$

Dabei sind c_1 und c_2 die Analytkonzentrationen in den Phasen 1 und 2, m ist die Gesamtmenge des Analyten, V_1 steht für das Volumen der Phase 1 (wässrige Probe) und V_2 für das Volumen der Phase 2 (Extraktionsmittel). Der nach einem Extraktionsschritt in der Phase 1 verbliebene Analytanteil repräsentiert q (3.2).

$$q = \frac{m_1}{m_1 + m_2} = \frac{V_1}{V_2 + K_D V_2} \quad (3.2)$$

In Abhängigkeit der Aggregatzuständen beider Phasen lassen sich Extraktionsmethoden wie folgt einteilen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Aggregatzustände und Extraktionstechnik (Auswahl)

Phase 1	Phase 2	Extraktionstechnik
fest	flüssig	Solventertraktion - Soxhletextraktion - Beschleunigte Lösemittelextraktion, ASE - Ultraschall-Extraktion
fest	überkritisch	Superkritische Fluidextraktion, SFE
fest	gasförmig	Gasextraktion - Headspace-Technik - Wasserdampfdestillation
flüssig	fest	adsorptive Extraktion - Festphasenextraktion, SPE - Festphasenmikroextraktion, SPME
flüssig	flüssig	Flüssig-Flüssig-Extraktion, LLE
flüssig	gas	Gasextraktion - Purge-and-Trap-Technik
gas	fest	SPME (Adsorbenzbeschichtung)
gas	flüssig	SPME („flüssige“ Faserbeschichtung)

Für die folgenden Kapitel wurden die Soxhlet-, Flüssig-Flüssig-, Ultraschall-, und Mikrowellenunterstützte Extraktion ausgewählt. Hinzu kommen die Überkritische Fluidextraktion, Headspace- und Purge-and-Trap-Technik, die beschleunigte Lösungsmittlextraktion, die MSPD-Technik sowie die Festphasenmikro- und Festphasenextraktion, die hier auf Grund ihrer häufigen Anwendungen besonders ausführlich behandelt wird.

3.2.1 Soxhlet-Extraktion

Der Soxhlet-Apparat hat seinen Namen von Professor Franz von Soxhlet (1848–1926), der damit den Fettgehalt von getrockneten Lebensmitteln bestimmte. Er arbeitete vorwiegend an der Analyse von Milchfett, wobei für die Extraktion mit dem Soxhlet-Apparat (Abbildung 3.1) zuerst Trockenmilch hergestellt wurde, um das dabei störende Wasser zu entfernen.

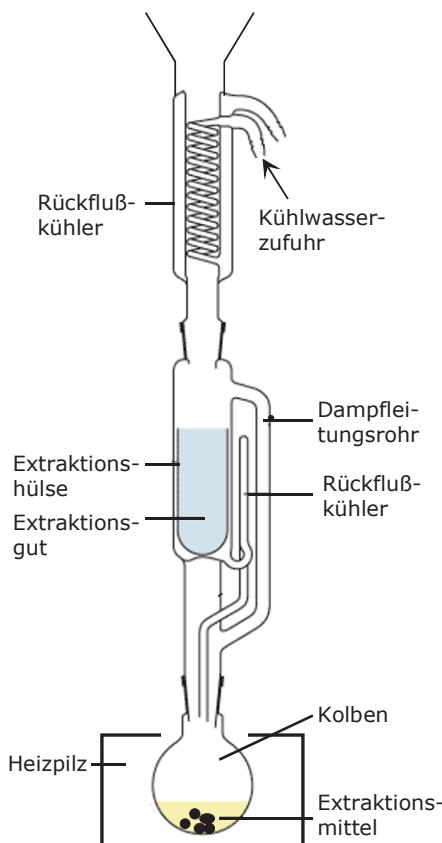


Abb. 3.1 Soxhlet-Apparatur

Soxhlet studierte landwirtschaftliche Chemie an der Universität Leipzig und promovierte dort 1872 mit einer Arbeit über die Chemie der Milch. Auch seine späteren Forschungsarbeiten waren mit dieser Thematik eng verknüpft und er konstruierte weitere Apparate; z.B. zur Sterilisation der Milch.

Die Soxhlet-Extraktion ist eine Feststoff-Extraktion und dient zum Herauslösen von in Flüssigkeiten löslichen Bestandteilen (Analyten) aus Feststoffen. Als Probenmaterial kommen Böden verschiedenster Art sowie biologische Materialien und Lebensmittel zur Anwendung.

In der Soxhlet-Apparatur (Abbildung 3.1) wird mit Hilfe eines Heizpilzes das Extraktionsmittel in einem Destillationskolben zum Sieden erhitzt und verdampft. Das Lösungsmittel steigt als Dampf auf und wird am Rückflusskühler verflüssigt. Dieses kondensierte Extraktionsmittel tropft danach in die Extraktionshülse, die das zu extrahierende Material enthält.

Weiteres Zutropfen des Elutionsmittels bewirkt einen Anstieg des Flüssigkeitsspiegels im Soxhlet-Aufsatz, so lange, bis die Höhe der Biegung des dünnen Röhrchens erreicht ist. Bedingt durch die Saug-Heberwirkung wird nun das Lösungsmittel mit dem gelösten Extrakt in den Destillierkolben zurückgeführt.

Infolge des weiteren Verdampfens des Lösungsmittels wird die Extraktionshülse erneut mit Lösungsmittel gefüllt. Die extrahierten Inhaltsstoffe reichern sich im Kolben an, während das Extraktionsmittel erneut verdampft, kondensiert und die zu extrahierende Substanz aus der Probe in der Papierhülse herauslöst.

Probleme resultieren meist bei sehr heterogenen Proben oder wenn starke Wechselwirkungen zwischen Analyt und Matrix bestehen. Hinzu kommt eine langsame Desorptions- und Transportkinetik verbunden mit langen Extraktionszeiten (Stunden bis zu einem Tag) und hohem Lösungsmittelverbrauch (Literbereich).

Aus diesem Grund wurde die Feststoff-Extraktionen weiter entwickelt und verbessert. Automatisierte Systeme ermöglichen deutlich kürzere Extraktionszeiten und Lösungsmittelverbräuche durch erhöhte Drücke und Temperaturen. Eine solche Entwicklung wird im Punkt 3.2.7 (Beschleunigte Lösungsmittlextraktion, ASE) vorgestellt.

3.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE: *liquid liquid extraction*) versteht man im allgemeinen die Extraktion einer wässrigen Lösung mit einem in Wasser nicht löslichen organischen Lösungsmittel.

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sollte zudem zwischen dem Extraktionsgut und dem Extraktionsmittel ein genügend hoher Dichteunterschied sein, um das Abtrennen beider Phasen zu ermöglichen. Die Polarität des Lösungsmittels zum Extraktionsgut muss unterschiedlich sein, damit sich die zu extrahierenden Stoffe nicht ineinander lösen.

Die Extraktion kann als einfache Variante durch „Ausschütteln“ durchgeführt werden (Abbildung 3.2). Dies ist mit einer einmaligen Gleichgewichtseinstellung verbunden. Es resultieren Extrakt und Raffinat.

Weiterhin unterscheidet man zwischen Multiplikativer und Mehrfacher Extraktionsverfahren. Letztere basiert auf einer wiederholten Trennoperation mit einem frischen Extraktionsmittel. Dies kann diskontinuierlich durch mehrfaches Ausschütteln mit einer neuen Lösungsmittelphase erfolgen oder kontinuierlich in einem Perforator. Dabei wird nur wenig Lösungsmittel benötigt, da es kontinuierlich erneuert wird. Multiplikative Extraktionsverfahren werden in automatisierten Apparaturen mit Kolonnen und Säulen durchgeführt, die einen sehr intensiven Stoffaustausch und demzufolge eine sehr effiziente Extraktion ermöglichen.

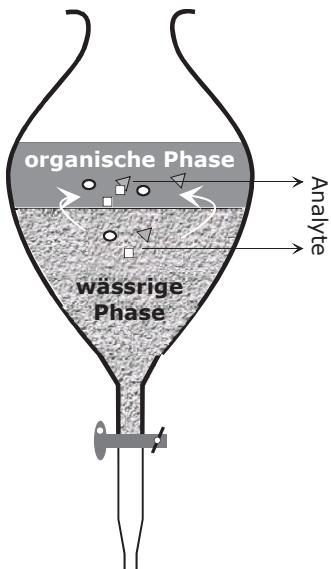


Abb. 3.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

3.2.3 Mikrowellenunterstützte Extraktion

Mikrowellen und Ultraschall tragen zur Beschleunigung und Effizienzsteigerung von Extraktionsprozessen z.T. im erheblichen Maße bei.

Anstatt konventioneller Heizblöcke werden Aufschlussysteme mit Mikrowellenunterstützung eingesetzt.

Mikrowellen sind elektromagnetische Wellen im Bereich zwischen $5 \cdot 10^{-2}$ und 1 m, die Frequenz liegt zwischen 300 MHz und dem GHz-Bereich. Auf Grund ihrer niedrigen Energie sind sie wie Ultraschall nicht in der Lage, Molekularstrukturen zu verändern und damit Probematerial zu zerstören.

Durch die Rotation von Dipolen und die Molekularbewegung können sie lediglich Ionen anregen, jedoch keine Elektronenübergänge. Kommerzielle Mikrowellengeräte arbeiten heute meist mit einer Frequenz von 2,45 GHz, die durch ein internationales Abkommen (*International Radio Regulations*, Genf 1959) festgelegt wurde.

Die Extraktion wird in druckstabilen Gefäßen bei Drücken im Bereich zwischen 0,5 und 20 MPa und bei Temperaturen um 250°C durchgeführt. Die erhöhte Temperatur bewirkt eine beschleunigte Kinetik der Extraktion und es werden kurze Extraktionszeit um 10 Minuten erzielt. Günstig für die Mikrowellentechnik ist der Einsatz von polaren Extraktionsmitteln, die ein Dipolmoment besitzen. Bei wasserhaltigen Proben können auch unpolare Lösungsmittel verwendet werden. Hier erfolgt die Aufnahme der Mikrowellenenergie durch das Wasser und es wird dadurch aufgeheizt. Das umgebene unpolare Extraktionsmittel erwärmt sich ebenfalls und ist nun besser in der Lage, die Analyte aus der Matrix zu extrahieren.

Bei Einsatz von Geräten aus Teflon, das eine schlechte Wärmeleitfähigkeit besitzt, dauert der Abkühlungsprozess relativ lange (Stundenbereich). Ein weiterer Nachteil ist, dass der Extrakt durch einen zusätzlichen Arbeitsschritt (Filtration) abgetrennt werden muss. Bei einer geringen Löslichkeit der Analyte im Lösungsmittel sind Mehrfachextraktionen durchzuführen.

3.2.4 Ultraschallunterstützte Extraktion

Ultraschall wird durch elektrisch erregte Kristalle (piezoelektrische Quarz- oder Keramikschwinger) erzeugt. Es sind Wellen, die sich in einem Medium wie Luft oder Wasser ausbreiten können. Ultraschall besitzt Frequenzen im Bereich zwischen 20 kHz und 1 GHz und liegt oberhalb der menschlichen Hörschwelle.

Ultraschallreinigungsgeräte werden meist zur Säuberung von kleinen, komplexen und feinstrukturierten Materialien oder zum besseren Lösen von schwer löslichen Substanzen eingesetzt.

Bei der ultraschallunterstützten Extraktion wird die zu untersuchende Probe mit dem Extraktionsmittel in ein Becherglas eingebracht, das man i.d.R. in ein mit Wasser gefülltes Ultraschallbad überführt. Die Übertragung von Energie durch Ultraschall auf die Probemoleküle erfolgt schonend, so dass Probenzersetzung vermieden werden. Gleichzeitig erfolgt die Steigerung der Effizienz der Extraktion oder auch von Löseprozessen bei festen Proben. Temperaturgeregelte Ultraschallgeräte bieten die Möglichkeit diese Prozesse noch effektiver durchzuführen.

3.2.5 Überkritische Fluidextraktion

Mit Hilfe der überkritischen Fluidextraktion (SFE: *supercritical fluid extraction*) erfolgt unter Verwendung von Kohlendioxid auch eine sehr schonende Extraktion von Inhaltsstoffen oft aus biologischen Materialien oder Lebensmitteln. CO₂ gilt bei der Extraktion als unbedenklich und ist leicht wieder entfernbare. Bekannt als wichtige Applikation ist die Extraktion von Koffein und damit die Produktion von entkoffeiniertem Kaffee.

Zur Erklärung der Begriffe überkritisches Fluid und kritischer Punkt dient das Phasendiagramm von Kohlenstoffdioxid in Abbildung 3.3. In der Thermodynamik ist der kritische Punkt ein thermodynamischer Zustand eines Stoffes, der durch Angleichen der Dichten von flüssiger Phase und Gasphase gekennzeichnet ist.

Einen Unterschied zwischen den beiden Aggregatzuständen gibt es an diesem Punkt nicht mehr. Der kritische Punkt ist durch die Zustandsgrößen kritische Temperatur, kritischer Druck und kritische Dichte gekennzeichnet.

Die kritische Temperatur von Kohlenstoffdioxid (CO_2) beträgt $31,0^\circ\text{C}$, der kritische Druck 73,8 bar.

Ein überkritisches Fluid liegt vor, wenn unter Druck erhitzte Gase oder Flüssigkeiten oberhalb ihrer jeweiligen kritischen Temperatur und ihres kritischen Druckes in den sogenannten kritischen Zustand übergehen. Gase oder auch Flüssigkeiten können in diesen kritischen Zuständen nicht mehr unterschieden werden und zeichnen sich gegenüber von herkömmlichen Flüssigkeiten durch niedrige Viskosität und geringe Dichte aus. Die Diffusionskoeffizienten sind in überkritischen Phasen um zwei Zehnerpotenzen höher und ermöglichen somit einen günstigen Stoffaustausch.

Diese Eigenschaften bilden die Grundlage für sehr effiziente Extraktionen mit überkritischen Fluiden in relativ kurzen Zeiten (10 ... 100 min) und bei Einsatz geringer Lösungsmittelmengen.

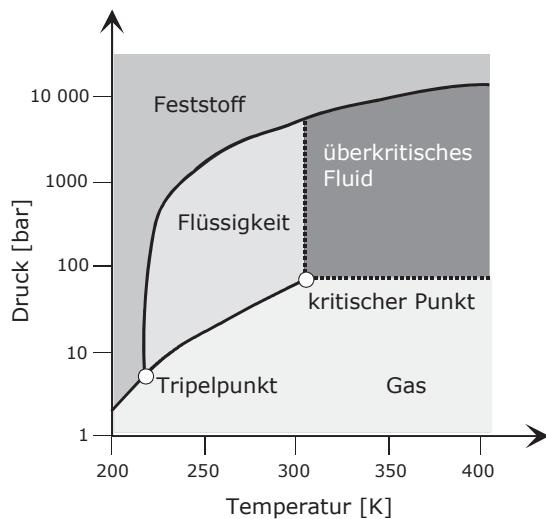


Abb. 3.3 Phasendiagramm von Kohlenstoffdioxid

3.2.6 Headspace- und Purge-and-Trap-Technik

Beide Methoden dienen der Probennahme und sind in der Regel on-line mit einem Gaschromatographen gekoppelt (Abbildungen 3.4 und 3.5).

Die Headspace-(Kopfraum- oder Dampfraum-)Technik (Abbildung 3.4) dient der Überführung von leichtflüchtigen Stoffen aus komplex zusammengesetzten (biologischen) Matrices, die meist nicht verdampfbar sind, in den darüber liegenden Kopfraum. Das findet u.a. Anwendung bei der Analyse von Alkohol im Blut.

Die Probe wird erwärmt und die Analyte gelangen aus der schwerflüchtigen Probematrix in die Gasphase. Zwischen beiden Phasen stellt sich ein Gleichgewicht ein. Nach dem Durchstechen des Septums wird eine Auffangkapillare bzw. eine Kanüle in den Dampfraum überführt, durch die die Analyte entnommen werden können. Der Analytstrom wird mit Hilfe eines Trägergases zum Gaschromatographen geleitet und dort analysiert.

Applikationsgebiete für die Headspace-Technik im Umweltbereich sind Untersuchungen von Grundwasser-, Abwasser- und Trinkwasserproben. Diese weisen häufig Verunreinigungen mit Chlorkohlenwasserstoffen und anderen Lösungsmitteln im Spurenbereich auf. Mit Hilfe der Headspace-GC-Analyse lassen sich diese Kontaminationen direkt in der Wasserprobe mit sehr hoher Empfindlichkeit auch quantitativ bestimmen.

Bei der Purge-and-Trap-Technik (Abbildung 3.5) werden mit einem Inertgas (Helium) leichtflüchtige organische Stoffe (Analyte) von der flüssigen Probelösung in die Gasphase überführt. Durch eine Fritte wird das Helium gleichmäßig in die Probelösung gespült und verdrängt daraus die leichtflüchtigen Analyte. Das bezeichnet man als Purge-Vorgang (*purge: reinigen, abführen*). Anschließend gelangen die Analyte über eine beheizte Leitung, die Kondensationsvorgänge verhindert, zu einem Adsorptionsröhrrchen. Die darin befindliche stationäre Phase (z.B. Tenax) adsorbiert die leichtflüchtigen Stoffe (*Trap-Vorgang, trap: einfangen*). Durch nachfolgendes Ausheizen werden diese wieder desorbiert und auf die Kapillarsäule des Gaschromatographen appliziert.

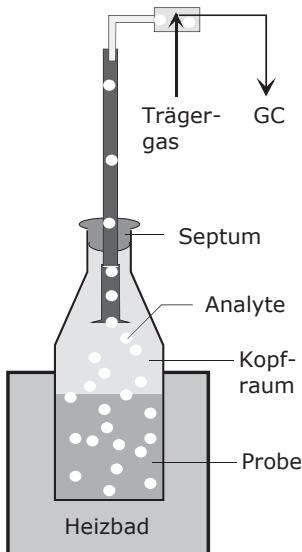


Abb. 3.4 Head-Space-Technik

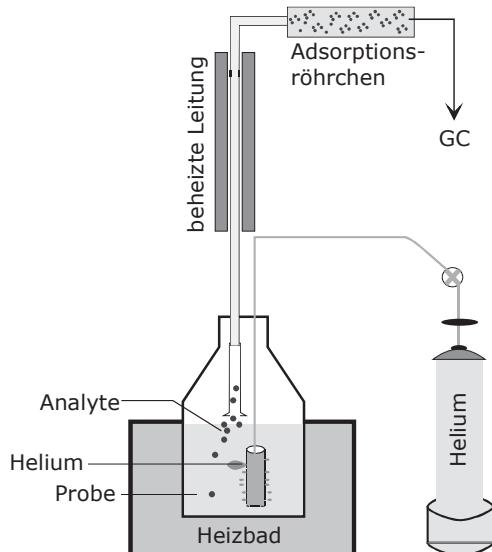


Abb. 3.5 Purge-and-Trap-Technik

3.2.7 Beschleunigte Lösungsmittelextraktion

Die Beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE: *accelerated solvent extraction*) arbeitet unter Druck und bei erhöhter Temperatur und dient der Isolierung von Inhaltsstoffen aus festen Proben. Diese befinden sich in Extraktionszellen aus Edelstahl (Abbildung 3.6) mit Volumina zwischen 1 und 100 ml. Engmaschige Edelstahlfritten verhindern das Austreten von Probematerial aus der Zelle.

In einem regelbaren Ofen können die Extraktionszellen bis zu einer Temperatur von 200°C aufgeheizt werden. Die Einstellung des Druckes kann zwischen 0,3 und 20 MPa erfolgen. Als Extraktionsmittel dienen sowohl organische Lösungsmittel wie Pentan, Ethylacetat oder Aceton als auch wässrige Flüssigkeiten (z.B. Pufferlösungen).

Diese Bedingungen bewirken eine starke Beschleunigung der Reaktionskinetik. Die Desorption der Analyte von der Matrix sowie der Lösungsprozess insgesamt verlaufen wesentlich schneller. Als Faustregel gilt, dass bei einer Temperaturerhöhung von 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2–3 ansteigt.

Die ASE-Extraktion besteht aus folgenden Teilschritten: Zuerst wird die Extraktionszelle mit festem Probematerial gefüllt und das Lösungsmittel hinzugefügt. Beim Arbeiten mit einer ASE-Apparatur der Firma Dionex können bis zu vier verschiedene Extraktionsmittel zum Einsatz kommen.

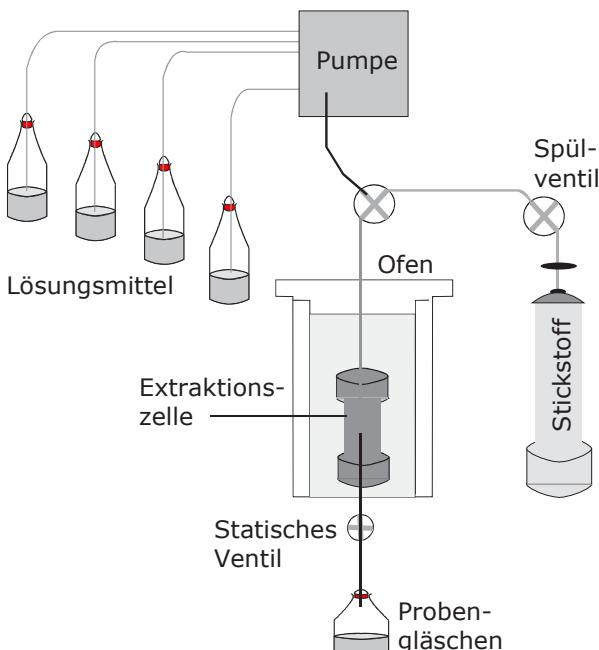


Abb. 3.6 Prinzipieller Aufbau einer ASE-Apparatur

Danach erfolgt das Aufheizen der Zellen unter konstantem Druck und der Extraktionsprozess wird beschleunigt. Die nach 5 Minuten erreichte Extraktionstemperatur beträgt 100°C. Es folgt die Überführung des Extraktes in ein Probengläschchen und eine nachfolgende Spülung der Extraktionszelle mit Lösungsmittel.

Nach Öffnen des Spülventils können alle Leitungen und die Extraktionszelle mit Stickstoff gespült und für weitere Extraktionen vorbereitet werden.

3.2.8 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (SPE: *solid phase extraction*) ist eine leistungsfähige, relativ unkompliziert handhabbare und gut automatisierte Methode zur Probenvorbereitung, die für sehr viele Substanzen/Substanzklassen (Analyte) unter Verbrauch nur geringer Lösungsmittelmengen eingesetzt wird. Darüber existieren von den entsprechenden Herstellern zahlreiche und gut optimierte Vorschriften.

Grundlage der SPE-Technik sind die auch in der Flüssigchromatographie eingesetzten Sorbentien wie Silicagel, die in kleine Extraktionsrörchen gefüllt werden. Sie liegen meist als chemisch modifizierte Materialien vor. Ihre Korngrößen betragen etwa 40 µm, während in der HPLC Partikel um 3, 5 oder 10 µm verwendet werden. Auch hydrophobe oder hydrophile Polymermaterialien kommen für selektive Reinigungen und Konzentrierungen sowohl von nieder- als auch von hochmolekularen Analyten in der SPE-Technik zum Einsatz.

3.2.8.1 Eigenschaften und Struktur von Silicagelen

Die stationäre Phase Silicagel ist das innerhalb der Trennmethoden (LC, TLC) und Festphasenextraktion am häufigsten verwendete Adsorbens. Andere anorganische Adsorbentien wie Al₂O₃ oder Hydroxylapatit sind weniger im Gebrauch.

Silicagel, das auch unter verschiedenen kommerziellen Bezeichnungen (Li-Chrospher, LiChrosorb, Nucleosil, Perisorb, Silasorb, Zorbax u.a.) geführt wird, besteht aus Siliziumatomen, die mit Sauerstoffatomen dreidimensional verknüpft sind. Es besitzt wie Quarzglas- oder Fused-Silica-Kapillaren, die in der Kapillargaschromatographie (CGC) bzw. in der Kapillarelektrophorese (CE) eingesetzt werden, an der Oberfläche freie Silanolgruppen (Abbildung 3.7), die die Trenneigenschaften dieser stationären Phase signifikant beeinflussen. Insbesondere dann, wenn die Si-OH-Gruppen zielgerichtet chemisch modifiziert und dadurch auf eine relativ „maßgeschneiderte“ Selektivität eingestellt sind.

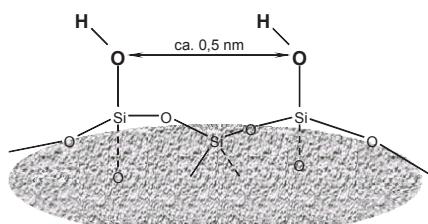


Abb. 3.7 Oberflächenstruktur von Silicagel (schematisch)

Silicagel hat eine Dichte von $2,2 \text{ g/cm}^3$ und ist nur im pH-Bereich von 2 bis 8 hydrolysestabil. Die Oberfläche dieses Adsorbens beträgt meist $200 \text{ m}^2/\text{g}$. Auch Materialien mit größeren Oberflächen ($400\text{--}700 \text{ m}^2/\text{g}$) sind im Gebrauch. In der SPE-Technik werden bezogen auf die Gesamtmenge an Sorbens-Material ca. 8% Analytmenge zurückgehalten (z.B. 40 mg Analyt pro 500 mg Sorbens).

Es gibt Silicagele, für die relativ enge Poren um 6 nm charakteristisch sind und die bei hohem Druck (60–80 MPa) in ihrer Form stabil bleiben. Für hochmolekulare Substanzen gibt es spezielle weitporige Silicagele mit Porengrößen bis 100 oder sogar 400 nm, die in Abhängigkeit der Herstellung bei derart hohem Druck (z.B. während der Füllung von HPLC-Säulen) sich verformen können.

Man unterscheidet zwischen irregulärem (gebrochenem) und sphärischem Silicagel (vgl. Abbildungen in 3.8), das kugelförmig und relativ teuer ist.

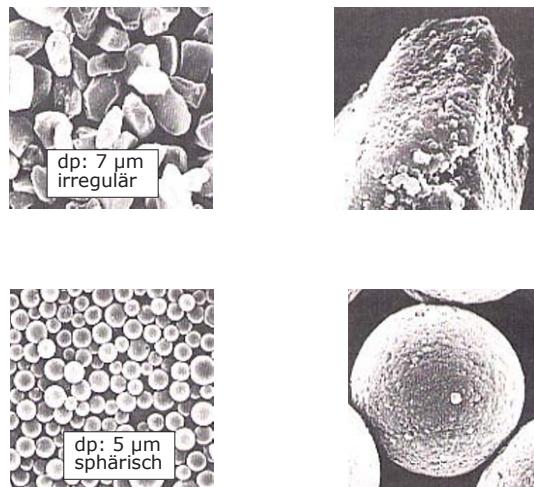


Abb. 3.8 Vergleich zwischen irregulärem und sphärischem Silicagel
(Bildaufnahmen erfolgten mit einem Rasterelektronenmikroskop).

3.2.8.2 Polymermaterialien

Als Alternative zu Silicagel wurden Polymere entwickelt, die sowohl für die Festphasenextraktion als auch für die Flüssigchromatographie geeignet sind. Die Abbildung 3.9 zeigt die Herstellung von Styrendivinylbenzen (S-DVB) durch Copolymerisation von Styren und Divinylbenzen. Die hydrophoben Materialien sind durch eine geringere Druckstabilität (8 bis ca. 12 MPa) gekennzeichnet und neigen zum Quellen. Die besonderen Vorteile dieser Polymere liegen allerdings in ihrer Beständigkeit innerhalb eines sehr weiten pH-Bereiches von 1 bis 13 sowie in einer hohen Robustheit.

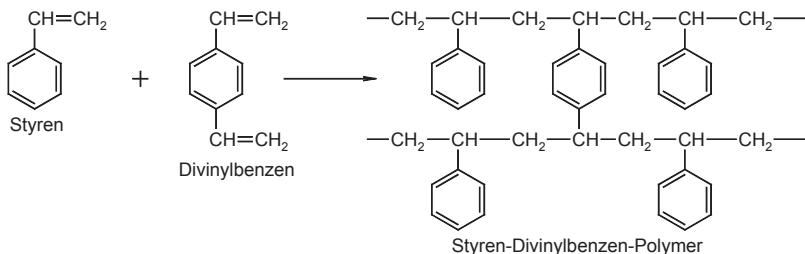


Abb. 3.9 Synthese von vernetztem Styren-Divinylbenzen (S-DVB)

„Robustheit“ bedeutet, sie sind auch nach der Analyse relativ „schmutziger“ Proben mit Hilfe von starken Elutionsmitteln (auch durch Säuren oder Basen) schnell wieder regenerierbar. Das ist allerdings mehr für die HPLC und weniger für die SPE-Technik („Einmal- bzw. Wegwerfsäulen“) von Bedeutung. Hinzu kommt, dass diese Materialien größere Analytmengen (ca. 15%) im Vergleich zu Silicagel binden können.

Der für die Synthese zugesetzte Anteil an Divinylbenzen bestimmt den Vernetzungsgrad und damit auch die Porenstruktur des Polymers, das auch als Gel oder Harz bezeichnet wird. Die Abbildung 3.10 zeigt die schematische Gegenüberstellung von Gelen mit kleinen und großen Poren. Letztere können Porenweiten um 10 nm aufweisen und sind somit zur Separation von kleinen und hochmolekularen Verbindungen durch Größenausschlusseffekte geeignet.

Auf Grund des hydrophoben Charakters der Styren-Divinylbenzen-Polymeren, der vor allem durch die zahlreichen Phenylgruppen hervorgerufen wird, sind ihre Anwendungsbereiche mit denen von Reversed-Phase-Materialien vergleichbar.

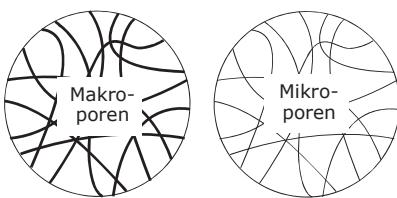


Abb. 3.10 Vergleich von Mikro- und Makroporen im S-DVB

3.2.8.3 Prinzip der Festphasenextraktion

Die Abbildung 3.11 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer SPE-Apparatur. Diese besteht aus einer Glaskammer, in der mit einer Pumpe ein Unterdruck (Vakuum) erzeugt wird. Dadurch werden die Extraktionsröhren, die mit 40 µm-Material gefüllt sind, zügig eluiert. Zur besseren Regulierung der Elutionsprozedur sind Absperrhähne zwischen den einzelnen Röhren und der Abdichtplatte der Vakuumkammer angeordnet. Die überschüssige Flüssigkeit (das Eluat) wird innerhalb der Vakuumkammer aufgefangen. Dazu dienen einzelne kleine Bechergläser oder spezielle Elutionsröhren mit entsprechender Eichmarkierung.

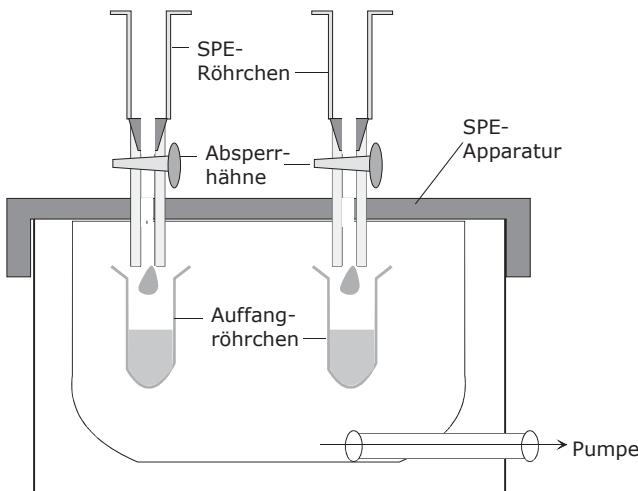


Abb. 3.11 Festphasenextraktions-Apparatur (SPE: *solid phase extraction*)

Die Extraktionsröhren (Länge: ~7 cm, i.D.: 1 cm) bestehen aus Polypropylen oder Glas und enthalten die stationäre Phase (Höhe des „chromatographischen Bettes“ ca. 1,5 cm), die ober- und unterhalb mit Filterfritten (Porengröße: 20 µm) abgedeckt ist (Abbildung 3.12).

Die einzelnen Arbeitsschritte können in der Festphasenextraktion in Abhängigkeit des Analysenproblems variieren bzw. auch relativ unterschiedlich ausfallen und gehandhabt werden.

Eine Optimierung hinsichtlich der geeignetsten Sorbentien (stationäre Phasen), der Auswahl der selektivsten Lösemittel für Elutions-, Wasch- und Desorptionsvorgänge ist fast für jede Substanz-/klasse einschließlich der entsprechenden Matrix (sie enthält meist Verunreinigungen) erforderlich. Die prinzipiellen Abläufe der Festphasenextraktion sind in Abbildung 3.13 zusammenfassend dargestellt.

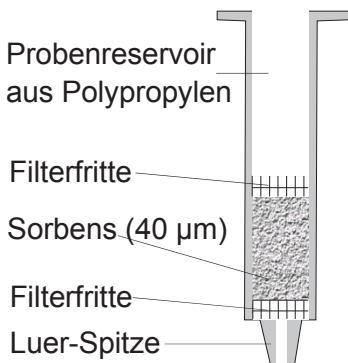


Abb. 3.12 Extraktionssäule für die SPE

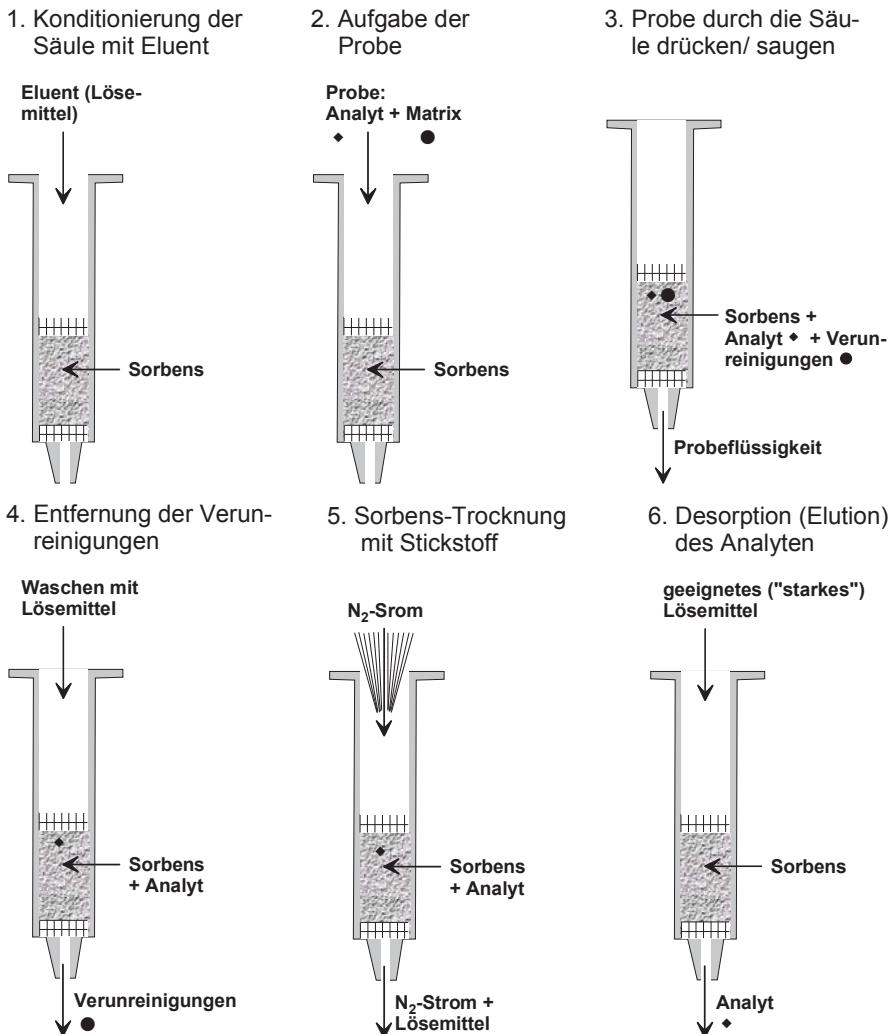


Abb. 3.13 Prinzipielle Abläufe während einer Festphasenextraktion

Zuerst erfolgt das Konditionieren der Elutionssäule (1), um das Gleichgewicht zwischen stationärer (Sorbens) und mobiler Phase einzustellen und ggf. durch die Herstellung bedingte Kontaminationen, die jedoch im Normalfall bei kommerziellen Phasen nicht auftreten, zu entfernen. Danach wird die Probe aufgegeben (2).

Bei der SPE-Probenreinigung (*sample clean up*) kommen ca. 1–3 ml Probevolumen zum Einsatz, das durch die Extraktionssäule befördert wird (3). Innerhalb der stationären Phase werden die Analyte (◆) sowie mögliche Verunreinigungen (●) bzw. unerwünschte Begleitstoffe durch verschiedene Wechselwirkungen zurückgehalten und somit angereichert.

Durch vorsichtiges Waschen der Säulen mit „milden“ Lösungsmitteln (4), die keine Desorption der Analyte auslösen, können Großteile der Kontaminationen entfernt werden. Es schließt sich nun das Trocknen der Säule mit Stickstoff an (5).

Erst bei Anwendung entsprechend „starker“ Lösungsmittel erfolgt eine selektive Desorption der Analyte (6). Meist sind nur wenige hundert Mikroliter Flüssigkeit erforderlich, so dass neben dem erzielten Reinigungseffekt auch eine deutliche Konzentrierung (auf das 10-fache und mehr) der Probe erreicht wird. Diese Probelösung kann durch weitere Operationen (z.B. Einblasen von Stickstoff) eingeengt werden, so dass insgesamt eine bis etwa 100-fache Konzentrierung möglich ist.

Die SPE-Probenkonzentrierung (*sample concentration*) ermöglicht die Aufarbeitung von weitaus größeren Probemengen (1–2 Liter). Diese werden über einen Teflonschlauch und einen Adapter, der mit einer Extraktionssäule fest verbunden ist, mit Hilfe einer kontinuierlich arbeitenden Pumpe durch das „chromatographische Bett“ der Säule gefördert (Abbildung 3.14). Die Technik wird eingesetzt, wenn die Analyte hoch verdünnt in den Probematrizes vorliegen. So können Analyte des Pico- oder Femtogramm-Bereiches (pg/l oder fg/l) um mehrere Zehnerpotenzen angereichert werden. Die so konzentrierten Analyte sind nun im µg/l- oder ng/l-Bereich mit den meisten kommerziellen chromatographischen und spektroskopischen Methoden ausreichend gut nachweisbar.

Nach ihrer Anreicherung in der Festphase schließen sich die beschriebenen Desorptionsschritte (Abbildung 3.13) an.

Entgegengesetzt ist die Zielrichtung bei der sogenannten Matrixentfernung (*matrix removal*). Die Verunreinigungen werden in der stationären Phase zurückgehalten, während die Analyte die Extraktionssäulen gleich im ersten Elutionsschritt passieren und entsprechend abgetrennt werden.

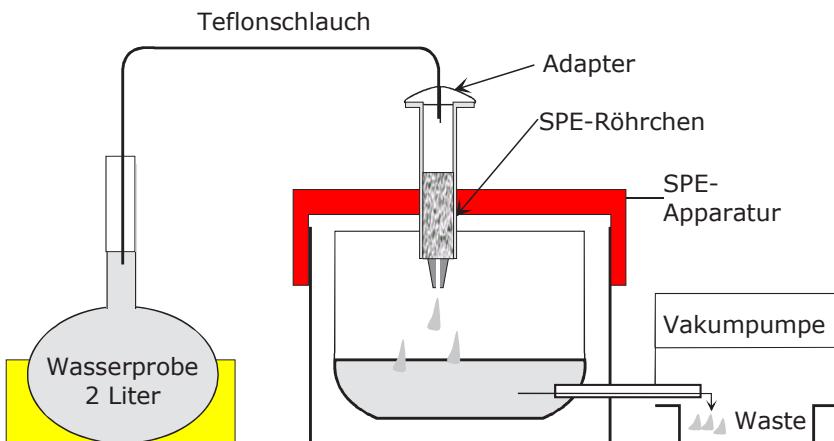


Abb. 3.14 Beladung der RP-18-Extraktionssäule

(z.B. bei der Extraktion eines Wirkstoffes aus einer Wasserprobe)

3.2.8.4 Sorbentien und Trennsysteme in der SPE

Chemisch modifizierte Silicagele sind wie bereits erwähnt die in der SPE am häufigsten angewandten Trennmaterialien. Außerdem kommen Polymerphasen wie das S-DVB sowie reine (nicht modifizierte) Silicagele zum Einsatz.

Grundlage der chemischen Modifizierung ist die Umsetzung der Oberflächensilanolgruppen des Silicagels mit Chlorsilanen, die definierte funktionelle Gruppen (R) enthalten (Abbildung 3.15). Die entstandenen kovalenten Bindungen (Si-O-Si-R) sind sehr stabil. Die gekoppelte funktionelle Gruppierung (R) bestimmt weitestgehend die Selektivität der stationären Phase. Durch Modifizierung der Silanolgruppen mit Octadecylsilanen (ODS, C_{18} -Ketten) entstehen hydrophobe stationäre Phasen, die gegenüber von polaren (hydrophilien) Adsorbentien wie Silicagel als Umkehrphasen (Reversed-Phase-Materialien) bezeichnet werden.

Aus sterischen Gründen werden nur etwa die Hälfte der freien Silanolgruppen mit diesen relativ großen Molekülgruppen umgesetzt. Die Si-OH-Gruppen können jedoch andere Substanzen und Verunreinigungen z.T. irreversibel binden, weshalb ihre „Eliminierung“ angestrebt wird. Mit Hilfe von kleineren Molekülen (z.B. Trimethylchlorsilan) erfolgt eine Nachsilanisierung (engl.: *endcapping*) der restlichen Oberflächensilanolgruppen, wie in Abbildung 3.16 gezeigt wird.

Die hier schematisch aufgeführten Modifizierungen stellen nur sehr einfache Varianten dar. Es gibt zahlreiche weitere chemischen Reaktionen, die u.a. stark vernetzte (polymerisierte) hydrophobe Silicageloberflächen ergeben.



Abb. 3.15 Umsetzung von Silanolgruppen mit Chlorsilanen

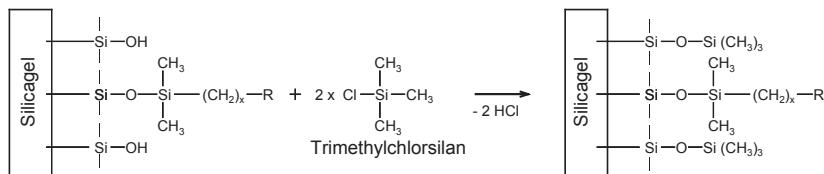


Abb. 3.16 Nachsilanisieren mit Trimethylchlorsilan („endcapping“)

3.2.8.4.1 SPE mit Normalphasen (Adsorptions-SPE)

Auch unmodifiziertes Silicagel ist für die Anreicherung von umweltrelevanten bzw. chemischen und biologischen Substanzen geeignet und wird innerhalb der Festphasenextraktion eingesetzt.

Alkohole und Aldehyde, die in unpolaren Flüssigkeiten wie Hexan/Diethylether (3:1 V/V) gelöst werden, adsorbieren an der Silicageloberfläche bzw. an den Silanolgruppen.

Im Falle von Benzylamin (Abbildung 3.17) sind seine Interaktionen mit den Si-OH-Gruppen stärker, als die zwischen dem Lösemittelgemisch (Hexan/Diethylether, 3:1 V/V) und den Oberflächensilanolgruppen. Dies führt zur Adsorption des Benzylamins am Silicagel innerhalb der SPE-Säule, was auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den entsprechenden Atomen (siehe dick gestrichelte Linien in Abbildung 3.17) zurückgeführt wird. Mit polaren Lösemitteln (Methanol) erfolgt die Desorption des Analyten von der Festphase.

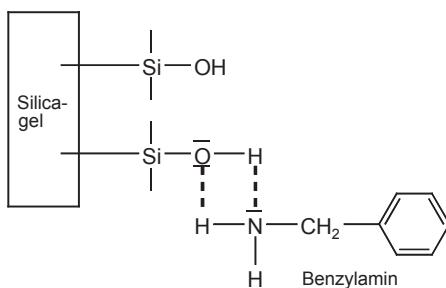


Abb. 3.17 SPE mit Adsorbenzien (Silicagel)

3.2.8.4.2 SPE mit chemisch gebundenen Phasen

Silicagele mit chemisch gebundenen funktionellen Endgruppen (z.B. Nitril-, Diol- oder Aminogruppen) können auch zu den „Normalphasen“ gerechnet werden, die meist mittelpolare Eigenschaften besitzen.

Beispielsweise wird in Hexan gelöstes o-Nitroanilin an der stationären Phase Cyanopropyl-Silicagel sorbiert, da das unpolare Hexan nur eine geringe Lösemittelfähigkeit besitzt. Das Zurückhalten des Analyten basiert auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (siehe dick gestrichelte Linien in Abbildung 3.18).

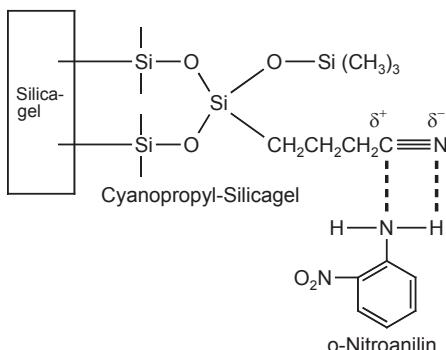


Abb. 3.18 SPE mit Cyanopropyl-Silicagel

3.2.8.4.3 SPE mit Reversed-Phase-Materialien

Reversed-Phase-Materialien binden bevorzugt unpolare Substanzen. Abbildung 3.19 zeigt, wie hydrophobe Bindungen (dick gestrichelte Linien) zwischen den Octadecylgruppen der stationären Phase und den unpolaren Butylgruppen eines Diesters (Dibutylphthalat) entstehen. Für das „Zurückhalten“ derartiger Analyte auf der RP-18-Phase kommen wässrige Matrices bzw. Lösungsmittelgemische wie Methanol/Wasser oder Acetonitril/Wasser zum Einsatz.

Das Ablösen relativ unpolarer Analyte von der RP-Phase kann auch mit dem „mittelpolarem“ Ethanol erfolgen.

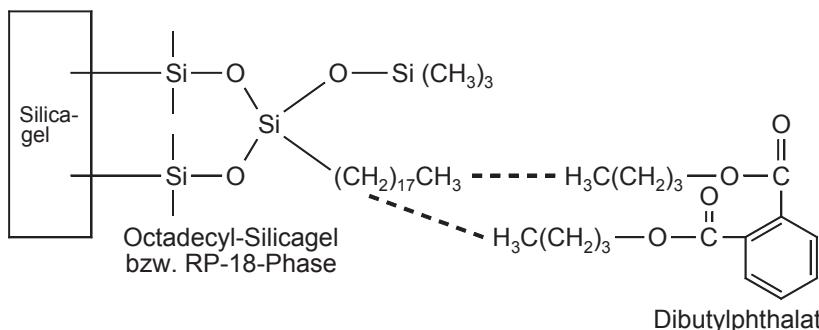


Abb. 3.19 SPE mit hydrophober RP-18-Phase

3.2.8.4.4 SPE mit Anionenaustauschern

Das Arbeiten mit Ionenaustauschern sowohl innerhalb der Flüssigchromatographie als auch bei der Anwendung der SPE-Technik erfordert die Beachtung und Optimierung mehrerer Parameter. Die „Arbeitsweise“ eines Ionenaustauschers ist stark vom eingestellten pH-Wert abhängig. Auch die Art und Konzentration der Gegenionen in den Eluenten (Puffern) sowie der mögliche Zusatz organischer Modifier zum Puffer beeinflussen die Trenneigenschaften signifikant (s. auch Kapitel 5.3.3).

Man unterscheidet zwischen stark sauren Kationenaustauschern (Sulfonsäure als funktionelle Gruppe: $-\text{SO}_3^-$) und stark basischen Anionenaustauschern (quaternäre Aminogruppe: $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Es existieren auch schwach saure Kationenaustauscher (Carboxylgruppe: $-\text{COO}^-$) und schwach basische Anionenaustauscher (Aminogruppe: $-\text{NH}_3^+$).

Die Abbildung 3.20 zeigt die ionische Bindung eines Nucleotides, das in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 7 als negativ geladenes Kation vorliegt, an einem stark basischen Anionenaustauscher. Die sich anschließende Elution der Extraktionssäule mit einem 0,1 M HCl-Puffer, der auf einen sehr sauren pH-Wert von 1 eingestellt ist, bewirkt die Neutralisation der sauren Gruppen und der Analyt (Adenosin-5'-monophosphat) wird vom Anionenaustauscher abgelöst.

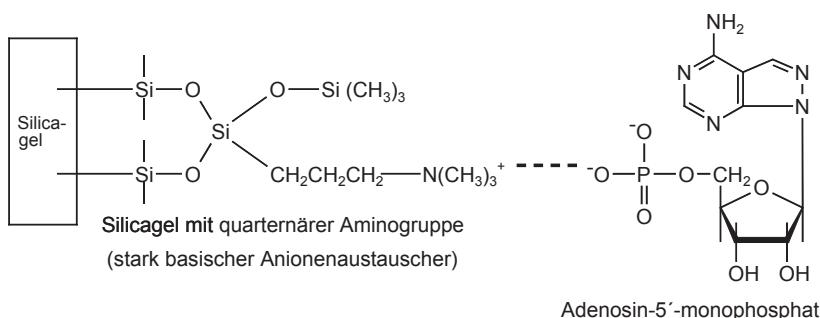


Abb. 3.20 SPE an einem stark basischen Anionenaustauscher

3.2.8.4.5 SPE mit Kationenaustauschern

Unter Verwendung von stark sauren Kationenaustauschern können kationische Substanzen mittels Festphasenextraktion gereinigt und konzentriert werden. Die Abbildung 3.21 zeigt schematisch die Oberfläche eines Silicagels, das mit negativ geladenen aromatischen Sulfonsäuregruppen chemisch modifiziert ist.

Bei Verwendung eines $0,1\text{ M NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ -Puffers im pH-Bereich von 7 bis 7,5 bindet das Adrenalin (ein Catecholamin), das auch als Epinephrin bezeichnet wird, als kationischer Analyt an die aromatische Sulfonsäure.

Um die Ablösung dieses Catecholamins zu erreichen, wird die stationäre Phase mit $2\text{ M }(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ -Puffer ($\text{pH} = 1,5$) eluiert.

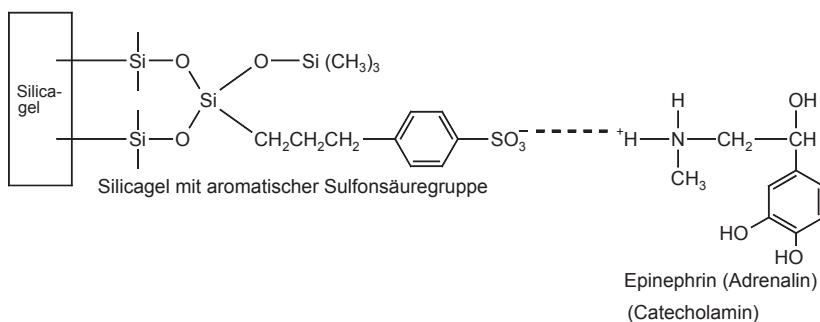


Abb. 3.21 SPE an einem stark sauren Kationenaustauscher

3.2.9 Matrix solid phase dispersion

Die MSPD (*matrix solid phase dispersion*) ist eine neue präanalytische Technik zur Aufarbeitung und Extraktion von festem oder hoch viskosem Probematerial. Sie wird nach Literaturangaben erfolgreich für komplexe (biologische) Proben eingesetzt und erfordert nur wenig Zeit. Allerdings sind auch Sorgfalt und gutes experimentelles Geschick erforderlich, um optimale Extraktionen zu erzielen.

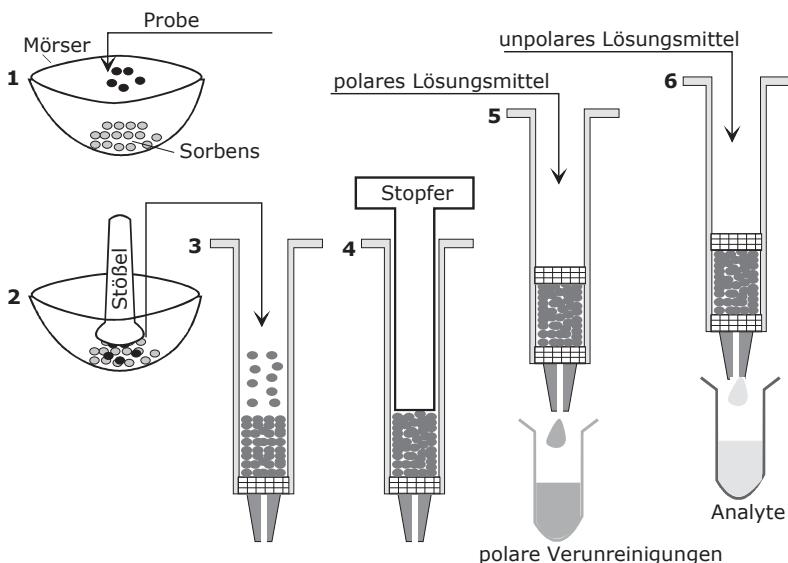


Abb. 3.22 Prinzipieller Verlauf der Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Die Abbildung 3.22 zeigt die Ablaufvorgänge der MSPD schematisch. Das Probematerial (ca. 0,5 g) wird mit dem Sorbens (ca. 1,5 g RP-Phase) in einem Mörser vereinigt (1) und mit einem Stößel (2) gründlich verrieben. (*Dieser ist nicht mit einem Pistill zu verwechseln, der i.d.R. für die Aufarbeitung von Probematerial in einer Reibeschale verwendet wird.*)

Die entstandene Mischphase wird anschließend in eine leere SPE-Kartusche mit eingesetzter Boden-Fritte (3) überführt und mit einem Stopfer verfestigt (4).

Diese Kartusche kann mit Hilfe der Festphasenextraktion in einer herkömmlichen SPE-Apparatur eluiert werden. Wenn der Zielanalyt (z.B. Lycopin aus Tomatenschalen) unpolär ist, erfolgt die Zugabe von polaren Lösungsmitteln (5), um polare Verunreinigungen aus der Mischphase zu eliminieren. Danach schließt sich die Zugabe von unpolaren Lösungen (6) an, so dass gereinigte und auf konzentrierte Analyte für weitere analytische Untersuchungen gewonnen werden.

Im Vergleich zur SPE erfolgt hier eine sehr intensive Durchmischung von Probematerial und Sorbens und die Lösungsmittel können Verunreinigungen bzw. die Analyte selbst intensiv und selektiv extrahieren.

3.2.10 Festphasenmikroextraktion

Die Festphasenmikroextraktion (SPME: *solid phase micro extraction*) ist eine präanalytische Methode in erster Linie zur Probenahme. Im weiteren Sinne gehört sie auch zur Probenvorbereitung. Da die SPME unkompliziert und schnell durchführbar ist, besitzt sie Vorteile gegenüber der Festphasenextraktion.

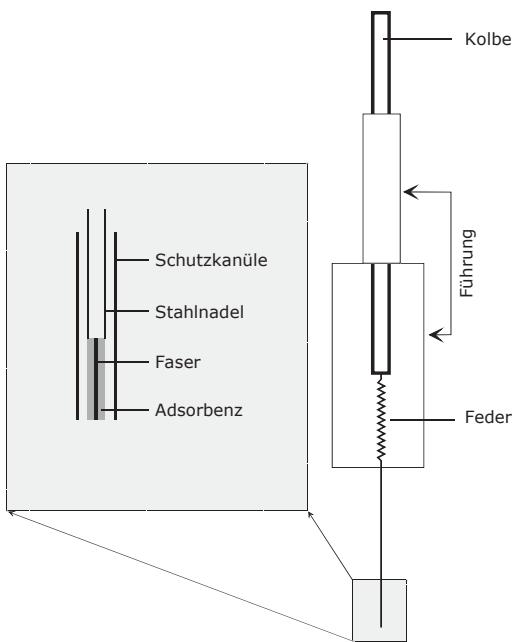


Abb. 3.23 SPME-Technik

Auch im Vergleich zur Methode „Purge and Trap“ zeichnet sie sich durch selektive und direkte Sorptionen von Analyten in komplexen Matrices aus.

Die SPME wurde von Janusz Pawliszyn (ab 1990) entwickelt und heute ist die Firma Supelco weltweit der Lizenzinhaber und der Hersteller für die Festphasen-mikroextraktions-Technologie.

In Abbildung 3.23 ist die prinzipielle Handhabung und Funktion der SPME schematisch dargestellt. Herzstück ist die an einer Stahlnadel befestigte Quarzfaser, die mit einem Adsorbenz – meist mit einem Polymer – beschichtet ist (siehe vergrößerter Ausschnitt im linken Teil der Abbildung). An der Faser finden die Sorptions- und Desorptionsprozesse der Analyte statt. Die chemische Struktur und die Eigenschaften des Polymers bestimmen demzufolge die Selektivität und sind entscheidend dafür, ob sich Analyte aus (komplexen) Matrices anreichern oder nicht (siehe auch Abbildung 3.24).

Die beschichtete Faser befindet sich innerhalb einer Schutzkanüle und kann zur Probennahme aus diesem Schaft heraus bewegt werden. Die Feder erlaubt das Zurücksetzen der Faser in die Kanüle. Diese Vorrichtung ermöglicht auch, zuerst ein Septum zu durchstechen und danach die Faser zur Probennahme auszufahren.

Nach Durchführung der Probennahme und Zurücksetzen der mit Analyt angereicherten Faser in den Schaft, erfolgt die Überführung des SPME-Probenehmers in einen Chromatographen. Beide Geräteteile sind passfähig, so dass der On-line-Betrieb gewährleistet ist.

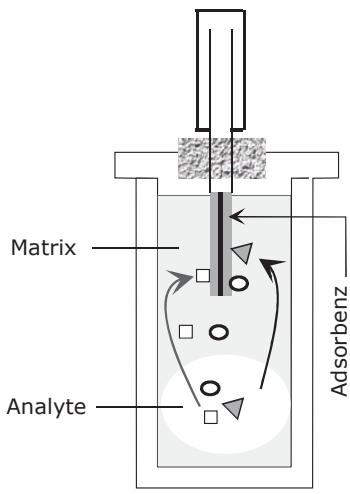


Abb. 3.24 Probennahme

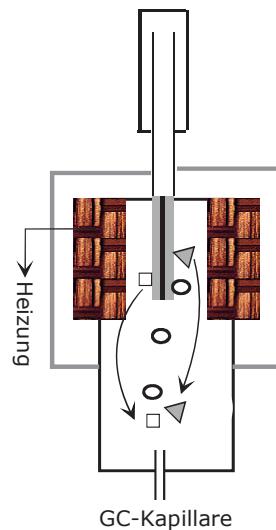


Abb. 3.25 Desorption in den GC

Abbildung 3.25 zeigt den in einem Gaschromatographen (GC) angeordneten Probenehmer. Nach Ausfahren der Faser wird der Innenraum aufgeheizt, so dass die Desorption der Analyte von der Polymerschicht erfolgt. Diese können nun direkt in die GC-Kapillare überführt und chromatographisch getrennt werden.

Vorteilhaft ist, dass die beschichtete Faser für bis zu 100 Analysen und mehr verwendbar ist. Als Polymere kommen u.a. Polyacrylat, Carbowax, Polydivinylbenzen, Carboxen und Polydimethylsiloxan (PDMS) zum Einsatz. Bei näherer Betrachtung ihrer Strukturen resultiert, dass die Polarität in dieser Reihenfolge abnimmt. Diese u.a. Polymere erlauben demzufolge die Einstellung bzw. Anwendung fast jeder beliebigen Polarität, so dass im Prinzip für jeden Analyten die optimalste und selektivste Faserbeschichtung ausgewählt werden kann. Durch Kombinationen verschiedener Polymere können sich weitere spezielle Selektivitäten ergeben.

Auch gilt der Grundsatz „Gleiches löst sich im Gleichen“, d.h., unpolare Analyte binden bevorzugt an unpolares Beschichtungsmaterial und polare Analyte an polare Polymere. Wichtig ist auch die Schichtdicke. So adsorbieren hochmolekulare Verbindungen besser an dünnen Schichten.

Als Applikationsgebiete sind vor allem die Umweltanalytik (Bestimmung von Herbiziden im Trinkwasser), die Lebensmittelanalytik (Analyse von Abbauprodukten der Milch, die durch Licht hervorgerufen wurden) und die Analytik von Aromastoffen (Bestimmung von Geruchsstoffen in Blütenduft) zu nennen. Innerhalb der forensischen Analytik wird die SPME-Technik erfolgreich zur Bestimmung von Amphetaminen in biologischen Flüssigkeiten (z.B. Urin) eingesetzt.

3.2.11 Microextraction by packed sorbents (MEPS)

Bei MEPS handelt es sich um eine Neuentwicklung der Probenvorbereitung auf der Basis des allgemeinen Prinzips von *solid phase extraction* (SPE, vgl. 3.2.8). Charakteristisch ist die Miniaturisierung dieser Technik, die nur wenige Mikroliter Packungsmaterial benötigt.

Die Abbildung 3.26 zeigt den prinzipiellen Aufbau der MEPS-„Spritzen-technik“, die von der Firma SGE Analytical Science (Scientific Glass Engineering, Australien) kommerziell angeboten wird.

Herzstück der Probenvorbereitung ist eine sogenannte „BIN“ (Barrel in Needle), die das Sorbens-Material in einem Volumen von nur etwa $3 \mu\text{l}$ enthält.

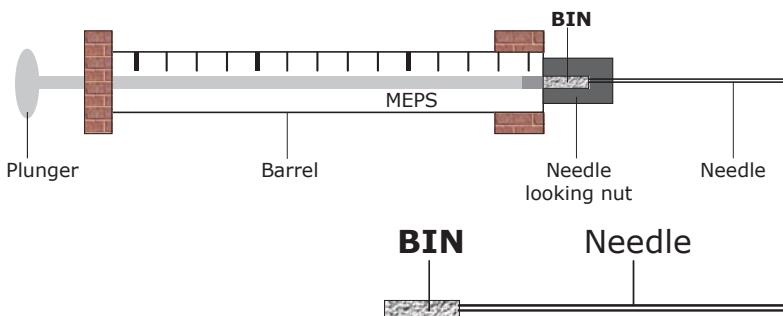


Abb. 3.26 Schematischer Aufbau von MEPS

(siehe oben: Micro Extraction by Packed Sorbents) und austauschbare BIN (s. unten: Barrel in Needle)

Das Basismaterial ist Silicagel mit einem Partikeldurchmesser von $45 \mu\text{m}$ und einer Porengröße von 6 nm bzw. 60 Angström („Silicagel Si 60“) wie es auch in der klassischen SPE zur Anwendung kommt. Die BIN enthält nur ca. 3 mg Sorbens! Für die Probenextraktion kommen als Packungsmaterialien die Typen Reversed Phase, Normalphase, Kationen- und Anionenaustauscher oder auch Mixed Mode Phasen zum Einsatz.

Die BINs sind leicht ausgetauscht und öfters benutzbar. So kann das Sorbensmaterial in den BINs bei Plasmaproben bis zu 40 Mal und mehr wieder verwendet werden. Bei weniger komplexen Matrices erhöht sich die Wiederverwendbarkeit bis ca. 100 Extraktionen.

Damit ist dieses Verfahren gegenüber der SPE kostengünstiger – die Menge der Extraktionsflüssigkeit, die Probenvolumina (oft nur $10 \mu\text{l}$, ggf. $100\text{--}200 \mu\text{l}$ bei Sensitivitätsproblemen) und der Zeitbedarf sind deutlich geringer.

Auch die sehr gute Automatisierbarkeit von MEPS erbringt Vorteile. So können die aufgearbeiteten Proben direkt in einen Gas- oder Flüssigchromatographen appliziert werden – sowohl als „off-line-Variante“ als auch im on-line-Betrieb.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind in der Abbildung 3.27 schematisch zusammengefasst. Diese zeigt auch die einzelnen Bestandteile (Zu- und Ablauf, Dichtringen, Fritten, Sorbens), die in einer BIN angeordnet sind.

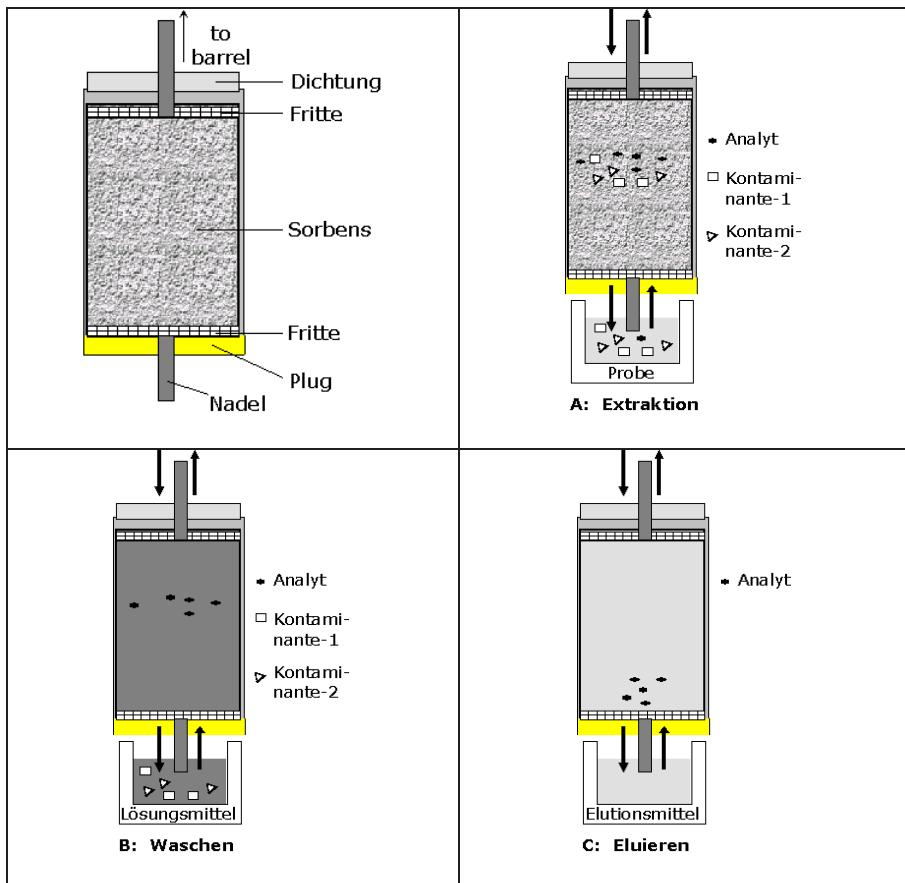


Abb. 3.27 Einzelne Verfahrensschritte der MEPS-Technik

Zuerst erfolgt die Konditionierung der MEPS-Spritze mit einem organischen Lösungsmittel und mit Wasser. Danach wird die Probe extrahiert (Situation A). Das Aufkonzentrieren der Analyte gelingt dabei durch mehrfaches Einziehen und Ausspülen (s. Pfeilrichtungen) der Probeflüssigkeit. In der nächsten Situation (B: Waschen) wird gezeigt, dass Kontaminanten (Matrixbestandteile, Schwebeteilchen, Partikel) mit Hilfe geeigneter Lösungsmittel vom Sorbens eliminiert werden.

Die sorbierten Analyte können in einem weiteren Schritt (C: Eluieren) durch Aufnahme der Elutionsflüssigkeit in der BIN herausgewaschen werden. Anschließend erfolgt das Applizieren in ein GC- oder LC-System.

Weitere Informationen (u.a. Demonstrationen der einzelnen Verfahrensschritte bei MEPS anhand von Videos) stehen auf der Webseite der Firma SGE Analytical Science zur Verfügung. Die Firma Axel Semrau präsentiert auch entsprechende Produktinformationen zu MEPS.

3.2.12 Liquid-phase microextraction (LPME)

In den letzten Jahren ist die Suche nach weiteren einfachen, umweltfreundlichen und vor allem miniaturisierten Extraktionsverfahren verstkt in den Fokus der analytischen Forschung und Entwicklung gerkt. Neben den bereits beschriebenen intelligenten Lösungen wie SPME oder MEPS wurden verschiedene Varianten innerhalb der sogenannten Flsigphasen-Mikroextraktion (LPME) entwickelt und dem Anwender zur Verfügung gestellt.

Das Grundprinzip ist relativ einfach – die Extraktion erfolgt zwischen einigen Mikrolitern von einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel (Extraktionsmittel bzw. Akzeptor-Phase) und einigen Millilitern einer wässrigen Phase („Abgeberphase“ bzw. Donor-Phase). In dieser sind die Analyte gelöst. Es werden sehr gute Anreicherungsfaktoren und damit auch niedrige Nachweisgrenzen (LODs: *limits of detection*) erzielt. LPME konnte erfolgreich in der organischen und anorganischen Spurenanalytik eingesetzt werden – so im Umweltbereich und vor allem bei der Untersuchung von biologischen Proben und Lebensmitteln (Pestizide in Apfeln, Phthaltester in Milch oder Phenole im Wein).

Für die liquid-phase microextraction existieren verschiedene Techniken, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

3.2.12.1 Single-drop microextraction (SDME)

Die SDME-Technik basiert auf dem Prinzip der Verteilung der Analyte zwischen einem einzigen Mikrotropfen des Extraktionsmittels, der an der Spitze einer Mikroliterspritze hängt – die wiederum in die entsprechende wässrige Phase mit den darin gelösten Analyten eintaucht (Abbildung 3.28).

Nachdem die Extraktion stattgefunden hat, wird der Mikrotropfen in die Spritze zurückgezogen, um ggf. weitere Analysen durchzuführen.

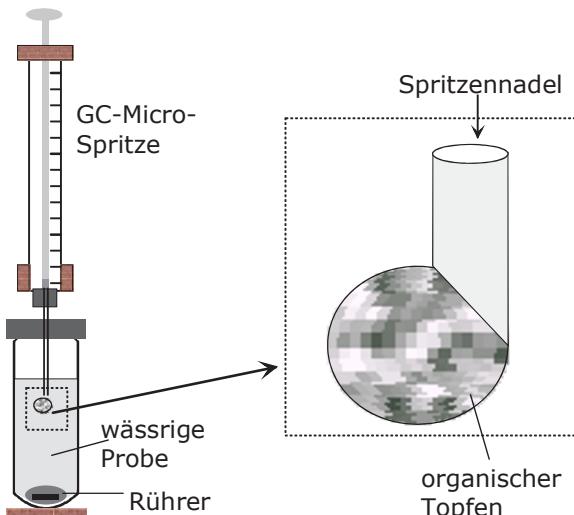


Abb. 3.28 Schematische Darstellung der SDME-Technik

Aufgrund des signifikanten Größenverhältnisses zwischen dem Probevolumen (wässrige Phase) und dem Volumen der organischen Phase (Mikrotropfen) werden hohe Anreicherungsfaktoren erzielt.

Dem Vorteil, nur sehr geringe organische Lösungsmittelmengen einzusetzen, stehen einige Einschränkungen beim Praktizieren der SDME entgegen. So darf das organische Lösungsmittel sich nicht mit Wasser mischen und sollte viskos genug sein, um an der Spritzenadel zu verbleiben. Auch sein Verdampfen während der Extraktion ist auszuschließen und es sollte inbezug auf die nachfolgende (chromatographische) Trenntechnik kompatibel sein. Hexan, Toluol oder auch Octanol wurden erfolgreich eingesetzt; zunehmend kommen ionische Flüssigkeiten mit den geforderten Eigenschaften zur Anwendung.

3.2.12.2 Hollow-fibre LPME (HF-LPME)

Die Hollow-fibre Liquid-phase Microextraction wurde mit dem Ziel entwickelt, Tropfeninstabilitäten der SDME entgegenzuwirken.

In Abbildung 3.29 ist eine Variante der HF-LPME schematisch dargestellt. Die Hohlfaser befindet sich in der Probelösung und die Mikroliterspritze wird in der Hohlfaser positioniert. Zuerst erfolgt die Analytextraktion innerhalb einer abgestützten aus Polypropylen bestehenden Flüssigmembran (SLM: *supported liquid membrane*), die in den Poren einer hydrophoben porösen Hohlfaser (HF) angeordnet ist. Schließlich gelangt der Analyt in die Acceptor-Phase, die sich im Lumen der Hohlfaser befindet.

Die Technik der HF-LPME kann im 2-Phasen- oder im 3-Phasen-Modus praktiziert werden. Im ersten Fall ist die Acceptor-Phase ein mit Wasser nicht mischbares Solvents, das sich sowohl innerhalb der Poren (SLM) als auch im Lumen der Hohlfaser befindet. Diese taucht in die wässrige Probe ein (Donor-Phase).

Bei der 3-Phasen-Variante werden die Analyte extrahiert – von der wässrigen Probe durch die SLM in die Acceptor-Phase –, die aus einer wässrigen (sauer oder basisch) Lösung besteht und sich innerhalb des Lumens der Hohlfaser befindet.

Abbildung 3.30 beinhaltet eine weitere und speziellere Variante der HF-LPME, die für ionische Analyte eingesetzt werden kann.

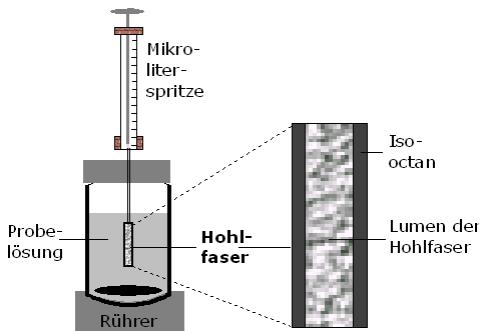


Abb. 3.29 Schematische Darstellung der HF-LPME

Die Hohlfaser wird in die Probelösung (Donor-Phase) platziert; die Acceptor-Phase befindet sich im Innern der Hohlfaser. Als Barriere bzw. Membran zwischen diesen beiden Phasen ist in den Poren der Hohlfaser ein organisches Lösungsmittel immobilisiert. Die Target-Analyte in neutraler Form passieren zuerst die Membran und gelangen in die stagnierende Acceptor-Phase. Auf Grund der hier vorhandenen basischen Bedingungen werden die Analyte ionisiert und liegen somit nicht mehr in extrahierbarer Form vor. Sie können somit anschließend in eine Trennapparatur appliziert werden.

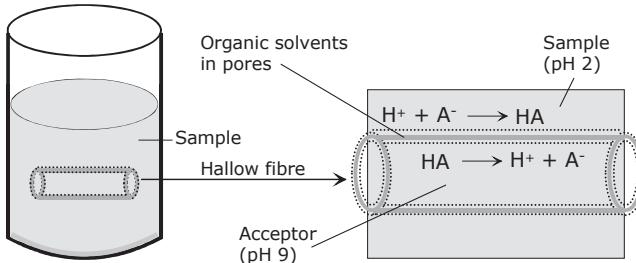


Abb. 3.30 Spezielle HF-LPME-Technik

3.2.12.3 Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)

Diese DLLME-Technik wurde zuerst für die Bestimmung von Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) eingesetzt. Sie ist einfach und schnell durchführbar; die Abfolge der einzelnen Schritte ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

Grundlage der Technik ist eine geeignete Mischung aus einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel („Extractant“) und einem mit Wasser mischbaren Solvens („Disperser“). Es erfolgt eine schnelle Injektion dieser Mischung in die wässrige Probe, die die Analyte enthält (Step 1).

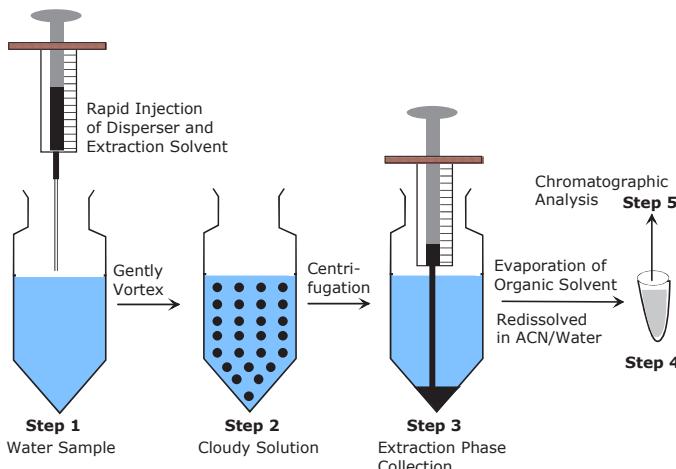


Abb. 3.31 Schematische Darstellung von DLLME

Nach der Ausbildung einer trüben Lösung mit einer großen Kontaktfläche zwischen der Probe und der extrahierten Flüssigkeit (Step 2) wird ein Tropfen des mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittels, in dem die Analyte gelöst sind, erhalten. Nach erfolgter Zentrifugation wird die Extraktionsphase am Boden des Röhrchens gesammelt. Häufig verwendete Extraktionslösungen sind Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform oder 1-Octanol, während Acetonitril, Methanol und Ethanol als Dispersionsmittel eingesetzt werden.

Die Applikation der DLLME ist heutzutage weitverbreitet und wird erfolgreich bei der Analyse biologischer Matrices aus der Futter- und Lebensmittelindustrie eingesetzt (Antioxidantien im Fruchtsaft, Anisole und Phenole im Wein, biogene Amine im Bier, Phthalate im Mineralwasser, Pestizide in Honig und Gemüse).

3.2.13 Stir bar sorptive extraction (SBSE)

Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE: Magnetrührstab [stir bar] und Sorptions-Extraktion) ist ein Probenvorbereitungs-Verfahren, das für nachfolgende GC-Analysen gut geeignet ist.

Es basiert auf der Verwendung eines Sorbens-ummantelten Magnetrührstabes (als Twister bezeichnet), der die zu analysierende Probe durchmischt. Dabei reichern sich die Analyte im Mantelmaterial an.

Der Magnetrührstab besteht aus Glas, das mit einer Sorbens umhüllt ist. Als Sorbens-Material für derartige Twister werden vorrangig Polydimethylsiloxan (PDMS) und Polyethylenglycol (PEG) verwendet.

Bei der Probennahme wird der Twister in die wässrige Probe eingebracht und beginnt diese zu durchmischen. Dabei erfolgt die Anreicherung der Analyte in der PDMS-Schicht. Auf Grund der Unpolarität (Hydrophobizität) des PDMS werden hauptsächlich unpolare Substanzen angereichert. Durch Zugabe von NaCl gelingt auch die Sorption von Stoffen mit polarem Charakter.

Für die Analyse der angereicherten Substanzen müssen diese aus dem PDMS desorbiert werden. Bei Anwendung von GC-Analysen erfolgt das durch thermisches Ausheizen des Twisters in einem Thermodesorptions-Ofen mit anschließender Verdampfung der flüchtigen Analyte und Auf trennung in einer Kapillarsäule.

Andererseits können auch durch selektive Lösungsmittel die angereicherten Substanzen aus dem PDMS eliminiert und mit flüssigchromatographischen Methoden analysiert werden.

Die SBSE ist mir der Festphasenmikroextraktion (SPME, s. 3.2.10) im Aufbau und Funktion vergleichbar. Unterschiede zur SPME bestehen darin, dass bei der SBSE eine deutlich größere Phasenmenge zum Einsatz kommt.

Das bessere Phasenverhältnis führt zu einer um zwei bis drei Größenordnungen höheren Empfindlichkeit der SBSE gegenüber SPME. Durch die gleichzeitige Durchmischung der Probe erfolgt eine schnellere Extraktion.

Allerdings ist der Einsatz der SBSE auf Stoffe begrenzt, die in PDMS ausreichend gut angereichert werden. Für die SPME stehen demgegenüber auch Phasen höherer Polarität zur Verfügung.

SPME-Analytik lässt sich einfach automatisieren. Bei der SBSE wird dagegen immer ein manueller Zusatzschritt zwischen Extraktion und Analyse benötigt; allerdings lässt sich die Extraktion vieler Proben parallel durchführen (Wikipedia).

Erfolgreiche Einsatzgebiete der SBSE sind Analysen von Geruchsverursachern im Trinkwasser oder von Pestiziden in Oberflächenwässern. In der Lebensmittelanalytik werden Bestimmungen von Aromen in Bier oder Veränderungen von Aromastoffen im Mund beschrieben.

3.2.14 Disposable pipette extraction (DPX)

Die DPX-Technik (Abbildung 3.32) wurde 2001 von Dr. W. E. Brewer (University of South Carolina) entwickelt und wird heute von der Firma Gerstel kommerziell angeboten. Es ist eine Methode der Festphasenextraktion, die mit fest gepackten (Wegwerf-)Kartuschen arbeitet. Bei DPX ist dagegen die Festphase innerhalb einer Pipette frei beweglich. Das verbessert den Stoffaustausch mit der flüssigen Probe signifikant. Auch das notwendige Probenvolumen ist geringer im Vergleich zur SPE. Bei dieser können in den gepackten Kartuschen auch Verstopfungsprobleme auftreten – im Falle der DPX hingegen besteht der Vorteil, dass auch dickflüssige Proben wie Blut oder Serum bearbeitet werden können.

In der DPX-Spritze befindet sich das frei bewegliche SPE-Material zwischen einer Fritte und einem Adapter. Es folgen die Konditionierung und die Probenaufnahme (Step 1 und 2). Durch das Ansaugen von Luft (Step 3) kommt es zu einer intensiven Durchmischung von Probeflüssigkeit und Festphase. Nach erfolgter Extraktion wird die Probe entfernt (Step 4). Dem Wasch-Schritt (5) schließt sich die Zugabe des Eluenten an, um die Analyte von der Festphase zu desorbieren. Danach können die üblichen Trennmethoden (LC-MS, GC-MS) in automatisierter Arbeitsweise zur Bestimmung der Analyte eingesetzt werden.

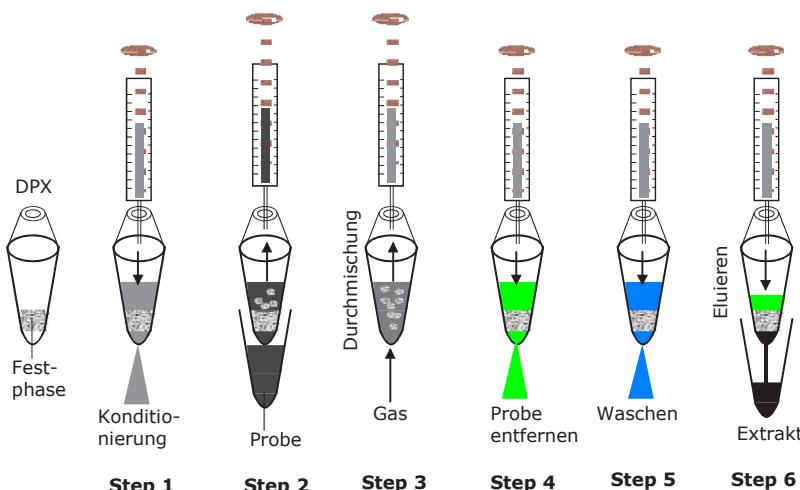


Abb. 3.32 Einzelne Steps der DPX

3.3 Reinigung, Anreicherung von Biomolekülen

Die meisten Proteine sind in Zellen, Geweben und anderen biologischen Materialien lokalisiert. Werden Proteine aus dieser natürlichen Umgebung entfernt, können sie sehr schnell ihre biologische Aktivität verlieren. Sie müssen zur weiteren Aufarbeitung in Lösung gebracht (solvatisiert) werden. Dazu dienen meist Pufferlösungen mit Ionenstärken und pH-Werten, bei denen die Proteine stabil sind.

Zur Isolierung, Aufkonzentrierung und Reinigung der biologischen Moleküle werden präanalytische Methoden wie Lysozymbehandlung, Aussalzen, Lyophilisation, Dialyse, Filtrationen sowie Batch-Adsorptionen und Extraktionsprozesse routinemäßig angewandt. Ihr Einsatz erfolgt nacheinander und wird z.T. nach jeder weiteren (chromatographischen) Aufarbeitungsstufe wiederholt. Sie sind effektiv und gegenüber präparativen Chromatographie-Techniken weniger kostenintensiv, besitzen jedoch nur eine geringe Trennschärfe. Wichtig ist, dass denaturierende Effekte vermieden werden und die biologische Aktivität der Biomoleküle/Proteine (weitgehend) erhalten bleibt. Die Proteine bzw. Enzyme benötigen demzufolge, um aktiv zu bleiben, ihre gewohnte Umgebung bzw. vergleichbare physiologische Bedingungen.

Eine optimierte und sorgfältige Durchführung dieser präanalytischen Methoden ist eine entscheidende Voraussetzung, um sehr empfindliche analytische Methoden wie Flüssigchromatographie (HPLC, BioLC), Kapillarelektrophorese (CE) oder Massenspektrometrie (MS) zur Charakterisierung von Biosubstanzen einzusetzen zu können.

3.3.1 Lysozymbehandlung

Lysozym wurde im Jahre 1922 von A. Fleming entdeckt. Die Vorsilbe *Lyso* bezeichnet die Eigenschaft des Enzyms, Bakterien aufzubrechen und die intrazellulären Inhaltsstoffe freizusetzen.

Bei tierischen Zellen, die durch keine kompakte Zellwand begrenzt sind, erfolgt das „Aufknacken“ relativ leicht durch osmotische Lyse. Dabei werden die Zellen mit einer hypotonischen Lösung versetzt, deren Gesamtkonzentration an gelösten Substanzen gegenüber der in der Zelle gering ist. Durch Osmose diffundieren Wassermoleküle in den höher konzentrierten intrazellulären Raum. Dies führt zum starken Anschwellen der tierischen Zelle, die auf Grund des entstehenden Überdruckes platzt und die Inhaltsstoffe freisetzt.

Zum Aufbrechen von Bakterien und Pflanzenzellen wird Lysozym eingesetzt, das die Zellwandpolysaccharide abbaut. Diese bestehen bei Bakterien aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MNAc), die über eine glycosidische Bindung (s. Abschnitt 2.3.1) zwischen dem C₁-Atom von MNAc und dem C₄-Atom von GlcNAc alternierend verknüpft sind.

Lysozym besitzt als Glucosidase die Fähigkeit, diese $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glycosidische Bindung zu hydrolysieren, wobei dimere Kohlenhydrat-Bausteine aus GlcNAc und MNAc entstehen. Die andere glycosidische Bindung zwischen dem C₁-Atom von GlcNAc und dem C₄-Atom von MNAc wird durch Lysozym nicht gespalten.

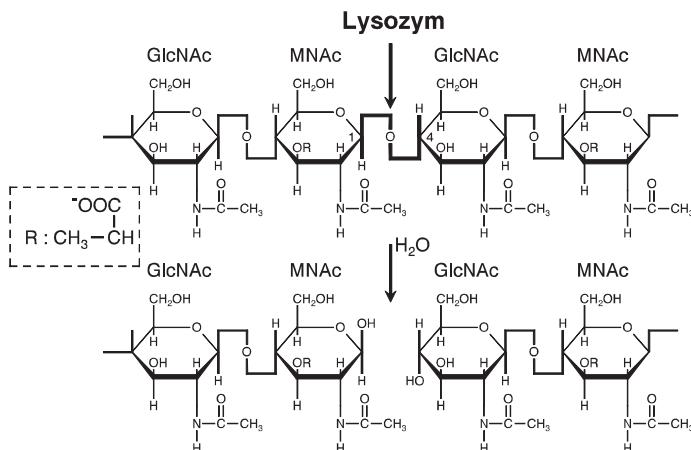


Abb. 3.33 Hydrolyse der glycosidischen Bindung zwischen GlcNAc und MNAc

Zellen können auch mittels Hochgeschwindigkeitsrührern, Ultraschallwellen oder mit verschiedenen Homogenisatoren aufgebrochen werden.

3.3.2 Aussalzen

Proteine zeigen auf Grund ihrer positiven und negativen Ladungen ein sehr unterschiedliches Löslichkeitsverhalten, das hauptsächlich von der Art und Ionenstärke des Puffersalzes, dem pH-Wert und der Temperatur abhängig ist. Die Abbildung 3.34, in der der Logarithmus der Löslichkeit einiger Proteine in Ammoniumsulfat in Abhängigkeit von der Ionenstärke aufgetragen ist, zeigt dieses Verhalten.

Bei sehr geringen Ionenstärken steigt die Löslichkeit der Proteine in der Regel mit zunehmender Salzkonzentration an. Die wird als „Einsalzeffekt“ bezeichnet und kann dadurch erklärt werden, dass mit erhöhter Konzentration der Salzionen die Ladungen in den Proteinen zunehmend abgeschirmt werden, woraus der Anstieg ihrer Löslichkeit resultiert.

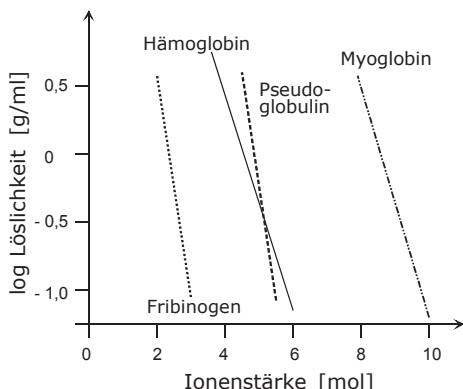


Abb. 3.34 Logarithmus der Löslichkeit der Proteine versus Ionenstärke

Wird die Salzkonzentration weiter erhöht, erfolgt eine verstärkte Konkurrenz zwischen den Salzionen und den anderen gelösten Substanzen um die solvatisierten Moleküle. Wenn nicht mehr ausreichend Lösungsmittelmoleküle zur Verfügung stehen, um die Proteine im gelösten Zustand zu halten, werden sie ausgefällt, was man „Aussalzeffekt“ nennt.

Beide Effekte werden auch aus Abbildung 3.35 deutlich, in der die Löslichkeit von Lactoglobulin bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen gegen den pH-Wert dargestellt ist. Der Aussalzeffekt dient auch zur Fraktionierung, Konzentrierung und Reinigung von Proteinen. Dabei wird die Salzkonzentration einer Proteinlösung direkt unterhalb des Präzipitationspunktes des Proteins eingestellt.

Das interessierende Protein bleibt in Lösung, während andere Proteine und Verunreinigungen ausfallen und durch Filtration abgetrennt werden. Im Rückstand der Proteinlösung wird die Salzkonzentration weiter erhöht, bis das entsprechende Protein ausfällt. Dadurch können auch sehr große Proteinmengen aufgearbeitet und konzentriert werden.

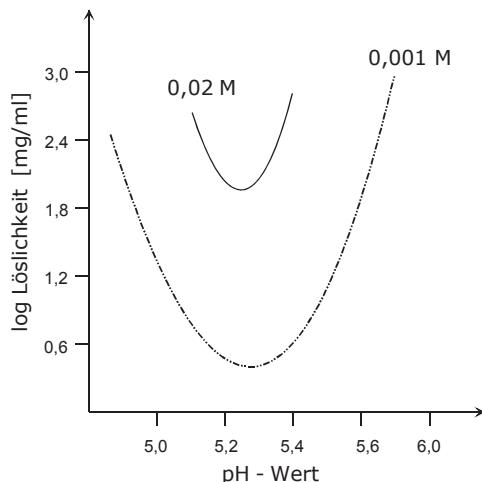


Abb. 3.35 Löslichkeit von Lactoglobulin in Abhängigkeit von NaCl-Konzentration und pH-Wert

3.3.3 Lyophilisation

Mit dieser auch als Gefriertrocknen bezeichneten Methode wird ein deutlicher Konzentrierungseffekt der Probelösung erreicht. Das zu analysierende biologische Material wird in flüssigem Stickstoff oder in einer Alkohol-Trockeneis-Mischung eingefroren, und mit Hilfe einer Ölpumpe wird Vakuum an das Probegefäß angelegt. Dadurch werden die niedermolekularen Probemoleküle „abgezogen“ und die Biomoleküle (Proteine) bleiben aufkonzentriert und gefroren zurück. Auch Salze und andere nicht flüchtige Komponenten sind weiterhin Bestandteile der Probe und können erst danach durch Dialyse (Abschnitt 3.3.4) oder auch mit Hilfe der Gelfiltration bzw. SEC (Abschnitt 5.3.2) entfernt werden.

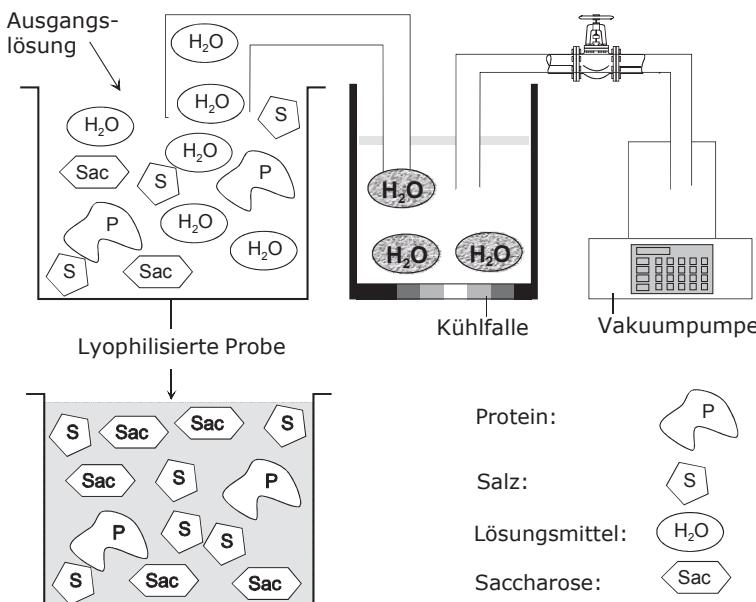


Abb. 3.36 Prinzip der Lyophilisation

Strukturell labile Biomoleküle wie einige Enzyme werden durch Zusatz von Saccharose stabilisiert und damit vor Verlusten ihrer enzymatischen Aktivität geschützt. Die nicht flüchtige Saccharose wird anschließend aus der Probe entfernt.

3.3.4 Dialyse

Durch Dialyse werden hoch- und niedermolekulare Moleküle voneinander getrennt. Als Trennmedium bzw. Filtermaterial dient eine semipermeable Membran, die aus kleinporigen Celluloseacetat oder Nitrocellulose besteht. Es wird mit Dialyseschläuchen gearbeitet, in die die biologische Flüssigkeit hineingefüllt wird. Die geringe Porengröße der Membran ermöglicht nur niedermolekularen Molekülen in die angrenzende Pufferlösung hinein zu diffundieren. Hochmolekulare Substanzen werden im Dialyseschlauch angereichert und behalten unter entsprechenden physiologischen Bedingungen ihre biologische Aktivität.

Ein weiterer Konzentrierungseffekt wird erreicht, wenn der gefüllte Schlauch von einer stark wasseraufnehmenden Substanz wie Polyethylenglycol (PEG) umgeben wird. Das Wasser diffundiert durch die Membran und wird vom PEG aufgenommen. Auch der komplette Austausch des Lösungsmittels bzw. Puffers einer Proteinlösung erfolgt mit dem Dialyseschlauch. Dieser wird in ein großvolumiges Gefäß mit neuem Lösungsmittel eingetaucht. Nach längerem Rühren haben sich beide Flüssigkeiten ausgetauscht und befinden sich im Gleichgewicht. Durch mehrmaliges Wiederholen der Dialyse mit neuem Lösungsmittel kann ein vollständiger Austausch erfolgen.

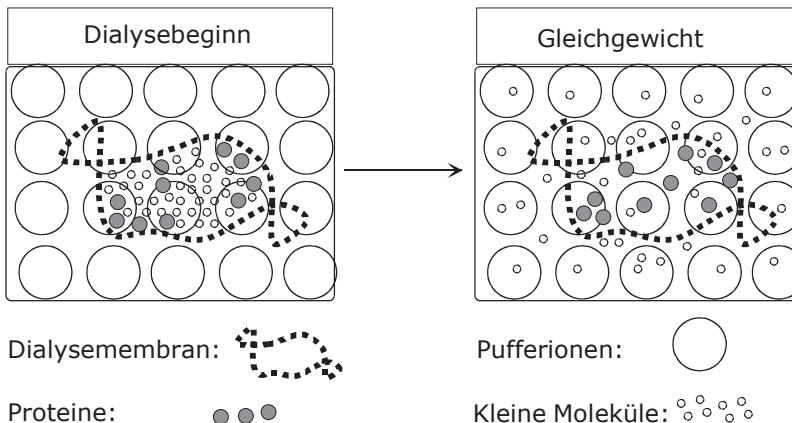


Abb. 3.37 Prinzip der Dialyse

3.3.5 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifuge wurde 1923 von dem schwedischen Biochemiker T. Svedberg entwickelt und dient zur Trennung und Molekulargewichtsbestimmung von Biomolekülen. Das biologische Material befindet sich in Zentrifugenröhren, die im gekühlten und unter Vakuum stehenden Rotationsteil angeordnet sind.

Große Biomoleküle, die sich in Lösungen nicht oder kaum absetzen, werden bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten, die bis zu 80 000 rpm (Umdrehungen bzw. *revolutions per minute*) betragen, sedimentiert (Probesediment).

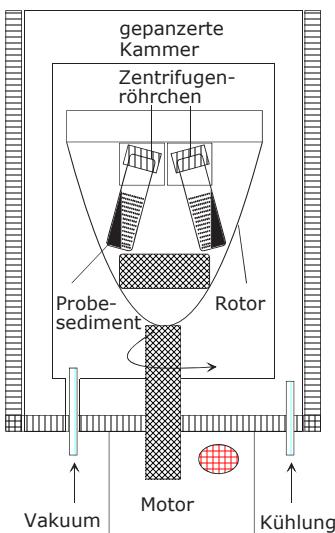


Abb. 3.38 Schematische Darstellung einer Ultrazentrifuge

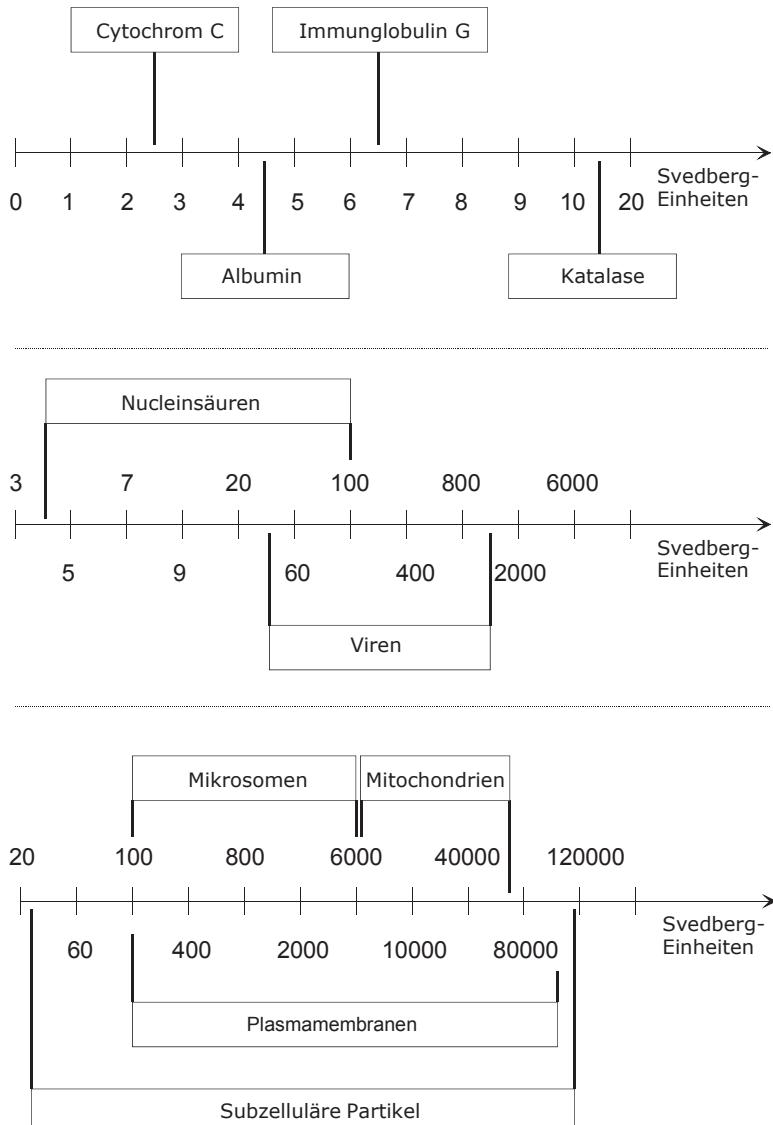


Abb. 3.39 Sedimentationskoeffizienten für biologische Substanzen

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Moleküle und Partikel, die sich mit der Winkelgeschwindigkeit ω im Kreis mit dem Radius r bewegen, ist masseabhängig. Auf diese Teilchen wirkt die Zentrifugalkraft F_s , die die Differenz aus Zentrifugalfeld ($m \cdot \omega^2 \cdot r$) und Auftriebskraft ($V_p \cdot \omega^2 \cdot p$), die von der Lösung ausgeht, darstellt. V_p ist das Teilchenvolumen und p die Dichte der Lösung.

$$F_S = m \cdot \omega^2 \cdot r - V_p \omega^2 \cdot r \cdot p \quad (3.3)$$

Wenn F_S gleich dem Reibungswiderstand $v \cdot f$ entspricht, bewegt sich das Partikel in diesem Feld mit konstanter Sedimentationsgeschwindigkeit v , wobei f der Reibungskoeffizient ist.

Als Maß für die Sedimentation dient der Sedimentationskoeffizient s , der als Quotient aus Geschwindigkeit und dem Zentrifugalfeld definiert wird.

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r} = \frac{m (1 - V_p)}{f} \quad (3.4)$$

Die Sedimentationskoeffizienten werden in Svedberg-Einheiten [S] angegeben, wobei ein Svedberg 10^{-13} Sekunden entspricht. Für einige ausgewählte biologische Substanzklassen sind die Sedimentationskoeffizienten und -bereiche auf den Svedberg-Skalen schematisch dargestellt.

Der Anwendungsmöglichkeiten der Ultrazentrifugation erstrecken sich von niedrigmolekularen Proteinen und von DNA- bzw. RNA-Fragmenten bis zu Viren und Zellen.

3.3.6 Batch-Adsorption

Eine einfache Variante zum Konzentrieren von Proteinmischungen ist die direkte „Adsorption“ an Chromatographiematerialien. Dies können Ionenaustauscher, Affinitätsgele und andere organische oder anorganische Materialien sein.

Die Biomoleküllösung wird mit dem in einer Flüssigkeit (Puffer) befindlichen Adsorbenz gemischt, aufgeschlämmt und einige Minuten bis zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes gerührt. Das zu reinigende Protein wird dabei selektiv und relativ schnell an das Adsorbenz gebunden. Diese Protein-Adsorbenz-Partikel sedimentieren auf den Boden des Gefäßes, während unerwünschte und zu eliminierende Substanzen (S^*) in der Suspension gelöst bleiben.

Nach dem Abdekandieren und/oder Filtrieren wird das Protein mit einem entsprechenden Lösungsmittel (Puffer) vom Adsorptionsmaterial desorbiert und durch weitere Aufarbeitung (Fällung, Gefriertrocknung) isoliert und konzentriert.

Andererseits können auch stationäre Phasen eingesetzt werden, die mit hoher Selektivität Fremdstoffe binden, wobei die Zielproteine in Lösung bleiben.

Die Effektivität einer Batch-Adsorption hängt u. a. von der Menge und Selektivität des Materials sowie vom pH-Wert und der Ionenstärke der verwendeten Flüssigkeit ab. Hauptvorteile des Batch-Verfahrens sind der geringe apparative Aufwand, der Einsatz kostengünstiger grobkörniger Adsorbentien und die Möglichkeit, Biomoleküle in Lösungen in fast unbegrenzten Volumina zu reinigen und aufzukonzentrieren.

Für die Optimierung einer Batch-Adsorption sind einige Vorversuche bezüglich Art und Menge des Adsorbenz sowie pH-Wert, Ionenstärke und organischen Modifier der Flüssigkeit erforderlich, wenn die Eigenschaften des Proteins nicht weitestgehend bekannt sind.

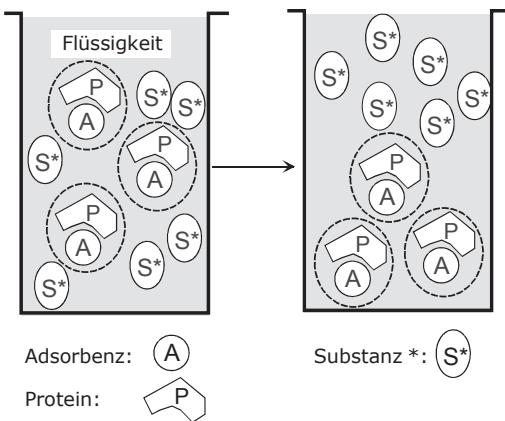


Abb. 3.40 Batch-Adsorption

3.3.7 Flüssig-Flüssig-Extraktion – Erhalt der biologischen Aktivität

Bei Extraktionsprozessen werden die gewünschten Moleküle von einer wässrigen Phase in eine andere wässrige oder organische Phase überführt. Als Zweiphasensysteme für die Anreicherung von Proteinen dienen Polyethylenglycol (PEG) und Dextran, die miteinander nicht mischbar sind. Die PEG-reiche Phase besitzt eine geringere Dichte als die Dextran-haltige Phase.

Die Proteine reichern sich auf Grund ihres unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten K in einer der beiden Phasen an, wobei c_1 die Konzentration in der oberen PEG-Phase und c_2 die Konzentration in der unteren Dextran-Phase ist.

$$K = \frac{c_1}{c_2} \quad (3.5)$$

Polyethylenglycol ist ein nichtionisches Polymer, in dem die Proteine nicht deaktiviert werden und auch keine anderen unspezifischen Wechselwirkungen zeigen. Es steht in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen zur Verfügung, so dass die Anreicherung von Proteinen über einen weiten Bereich ihrer Größe variiert werden kann.

Die Entfernung der Proteine aus dem PEG erfolgt durch Filtration oder Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 5.3.2), bei der das Polyethylenglycol nicht an der stationären Phase gebunden wird.

Flüssig-Flüssig-Extraktionen können auch zur Konzentrierung von sehr großen Proteinmengen im präparativen Maßstab angewandt werden. Dabei muss beachtet werden, dass Extraktionspolymere wie PEG teuer sind, so dass eine Optimierung der Extraktion erforderlich ist. Als Vorteile der Zweiphasensysteme gelten hohe Wiederfindungsraten, geringe apparative Kosten und die einfache Handhabung.

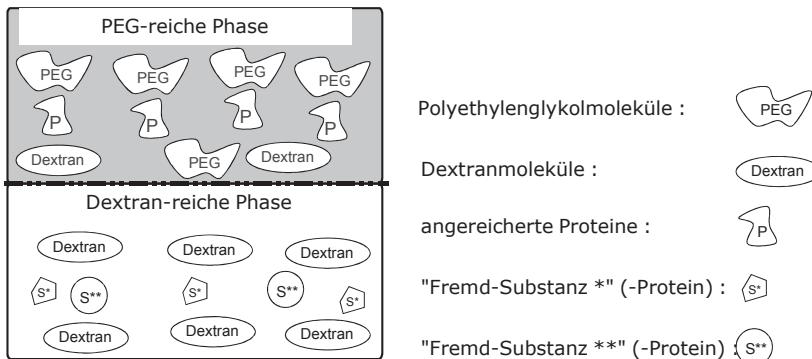


Abb. 3.41 Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion (z.B. Proteine)

3.3.8 Filtration

Durch Filtration werden feste oder kolloidale Partikel von einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen getrennt. Der Anteil, der den Filter passiert, wird als Filtrat bezeichnet, die zurückgehaltenen Substanzen als Filterkuchen.

Die Einteilung und Anwendung der Filter erfolgt u.a. nach dem verwendeten Material (Cellulose, Polymere, Glas, Keramik, gesintertes Metall), der Struktur (Fasern, Partikel) und dem Filtermechanismus (Diffusion, Adsorption).

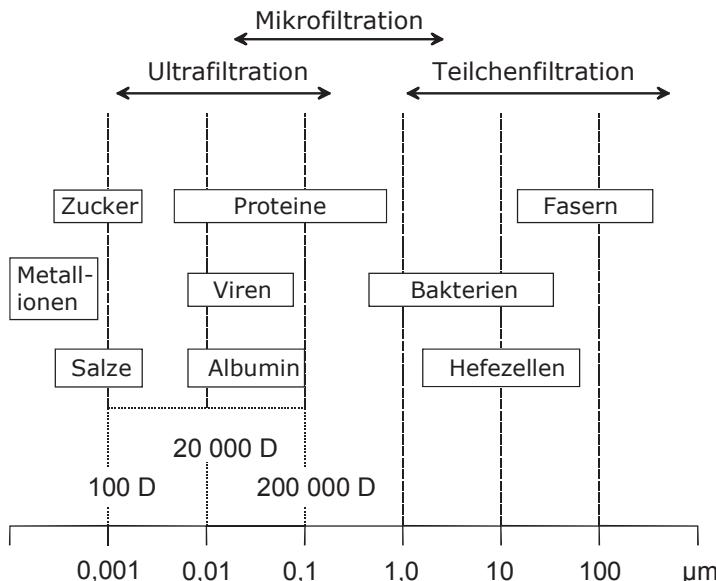


Abb. 3.42 Anwendungsbereiche von Mikro- und Ultrafiltration

Man unterscheidet bei der Aufarbeitung von biologischen Materialien und Proteinen zwischen Ultra- und Mikrofiltration. Diese ermöglichen auf Grund verschiedener Trennmechanismen auch differenzierte Anwendungsmöglichkeiten für eine bestimmte Molekül- oder Partikelgröße.

Der für die Ultrafiltration charakteristische Größenbereich liegt zwischen 0,1 µm und 100–200 nm, während die Mikrofiltration für größere Partikel und Moleküle im Bereich von 0,05 µm–2 µm eingesetzt wird.

3.3.8.1 Mikrofiltration

Bei der Mikrofiltration werden größere suspendierte Partikel oder Molekülverbände, die das Filtermedium nicht passieren können, zurückgehalten, während kleine Substanzen den Filter passieren. Damit werden Zellen aus Fermentationsbrühen oder Lysaten abgetrennt.

Tiefenfilter bestehen aus Fasern oder faserähnlichen Materialien mit labyrinthartigen Durchgängen (Abbildung 3.43, links), in denen sich Partikel und größere Moleküle festsetzen können. Diese Gewebe nehmen während der Filtration immer mehr Substanzen auf und ermöglichen, dass nur kleine Moleküle das Labyrinth des Filters passieren können. Membranfilter besitzen demgegenüber definierte und kontrollierte Porenstrukturen, auf deren Oberfläche sich große Moleküle und Partikel gleichmäßig ansammeln (Abbildung 3.43, rechts), während kleine Substanzen die Poren und Kanäle passieren und sich im Filtrat niederschlagen.

● Partikel, den Filter passieren können ○ zurückgehaltene Partikel

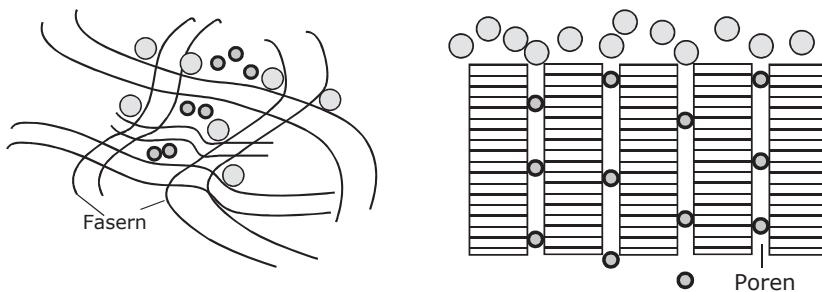


Abb. 3.43 Prinzip der Filtration:
mit Tiefenfilter (links) und mit Membran- bzw. Siebfilter (rechts).

3.3.8.2 Ultrafiltration

Eine wichtige Methode zur Konzentrierung von verdünnten Proteinlösungen ist die Ultrafiltration. Mit Hilfe eines Gases (Luft oder Stickstoff) und etwas Druck (ca. 5 bar) wird die Flüssigkeit durch eine Membran gedrückt. Das kontinuierliche Röhren der Lösung verhindert Verstopfungen der Membran (Abbildung 3.44).

Die Poren der Membranfilter sind klein genug, um Proteine zurückzuhalten und Wasser, Salzionen und Puffer passieren zu lassen.

Die Ultrafiltration ist eine unkomplizierte Methode, die eine Proteinlösung in zwei Fraktionen trennt. Die Proteine können nicht einzeln isoliert werden, sondern nur zusammen mit anderen Biomolekülen in einer gegenüber der Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) relativ breiten Molekulargewichtsverteilung.

Soll z.B. ein Protein mit einem Molekulargewicht von 300 000 Dalton möglichst verlustlos aufkonzentriert werden, empfiehlt sich die Anwendung einer Membran mit einer Durchlässigkeit (z.B. von 200 000 Dalton) für deutlich kleinere Proteine. Bei einer effektiven Arbeitsweise kann ein Volumen von 200 ml Proteinlösung auf ca. 10 ml Ultrafiltrat eingeengt werden.

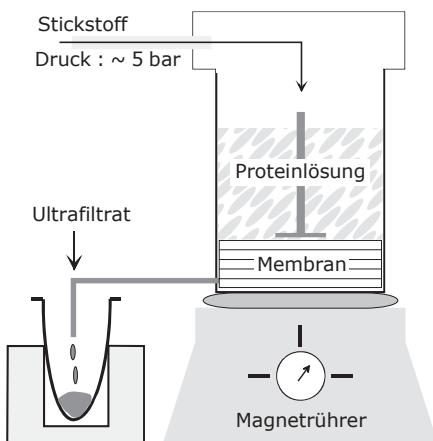


Abb. 3.44 Prinzip der Ultrafiltration einer Proteinlösung

3.3.9 Magnetic Beads

Stofftrennungen mit magnetischen Partikeln (*biomagnetic separations*) sind etablierte Reinigungs- und Konzentrierungstechniken vor allem für hochmolekulare Analyte wie Proteine, Glycoproteine oder Nucleinsäuren in komplexen Matrices.

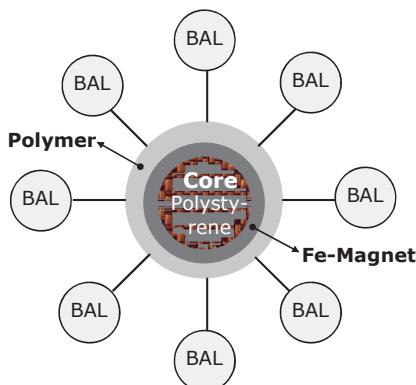


Abb. 3.45 Schematischer Aufbau von Magnetic Beads
BAL: bioaffine Liganden

Aus Abbildung 3.45 geht hervor, dass Magnetic Beads aus einem festen Core (z.B. Polystyrene), einer magnetischen Schicht und einem (hydrophoben) Polymer, an das bioaffine Liganden (BAL) gebunden sind, aufgebaut sind. Somit können diese Beads einerseits biospezifische Bindungen mit Antikörpern oder Antigenen (z.B. AK-AG-Wechselwirkungen) in komplexen (biologischen) Lösungen eingehen. Dabei werden nur die Zielanalyte spezifisch gebunden; andere Substanzen (Kontaminanten) verbleiben in der Probelösung.

Die magnetischen Eigenschaften der Beads können nun andererseits für ihre Konzentrierung in der entsprechenden Suspension ausgenutzt werden – dies erfolgt mit Hilfe von Magneten. Die restliche Suspension wird nun entfernt (z.B. abdekandierte) und die Magnetic Beads können weiter aufgearbeitet werden. Dabei müssen u.a. die Beads und die Biosubstanz wieder getrennt werden.

In Abbildung 3.46 sind die einzelnen Schritte einer Biomolekülreinigung mit Magnetic Beads anschaulich dargestellt. Die wässrige Probe mit dem Zielanalyt (Target) wird mit den Magnetic Beads versetzt (Situation A). Diese binden nur mit den Zielmolekülen spezifisch (Situation B). Durch Anlegen eines Magneten werden die gebildeten Bead-Analyt-Komplexe fokussiert (Situation C) und der Rest der Suspension kann abdekandiert werden.

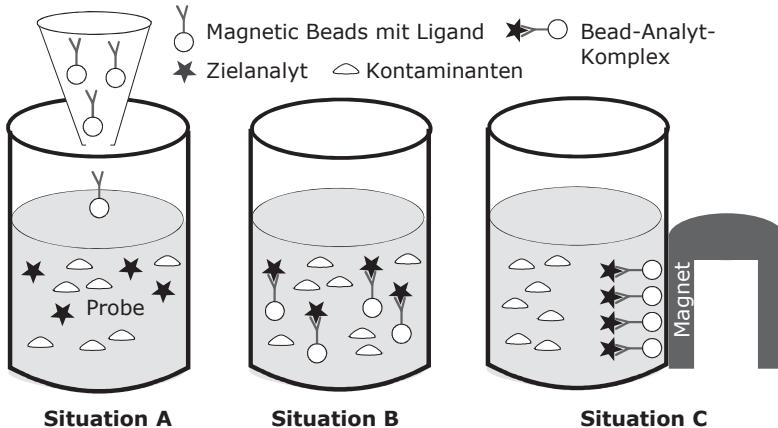


Abb. 3.46 Prinzipielle Abläufe bei einer biomagnetischen Separation

3.3.10 Restricted access material (RAM)

Restricted access materials ermöglichen extractive Aufreinigungen von biologischen Flüssigkeiten (Serum, Urin) unter Ausnutzung physikalischer und chemischer Diffusionsbarrieren.

RAM besteht aus porösem Material, das eine eingeschränkte hydrophile Außenoberfläche besitzt. Diese kann von großen Biomolekülen (Proteinen) weitestgehend ungehindert passiert werden. Derartige Moleküle werden hier nicht retardiert – sie können als Matrix von den niedermolekularen Zielanalyten abgetrennt werden.

Außerdem beinhaltet das RAM kleine innere Poren mit hydrophoben Oberflächen. In diese können nur niedermolekulare Analyte eindringen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen retardiert werden.

Ein anschauliches Beispiel ist die Analyse eines Pharmakons im Blut. Die hochmolekularen Serumproteine können die hydrophile Außenoberfläche der RAM-Phase passieren, während das niedermolekulare Pharmakon in die Poren eindringen kann und somit abgetrennt wird. Die störenden Matrixbestandteile können dadurch vor einer LC-MS-Analyse elegant abgetrennt werden. In derart komplexen Proben sind somit schnelle Analysen von Pharmaka möglich. Dies kann auch im on-line-Betrieb (RAM-SPE – LC-MS) realisiert werden.

In Abbildung 3.47 wird das Arbeiten einer SPE mit RAM gezeigt. In der Situation A erfolgt die Aufgabe der biologischen Flüssigkeit auf die RAM-SPE. In Situation B wird die Trennung von niedermolekularen Stoffen demonstriert. Weiterhin können andere SPE-Säulen (Kartuschen) in nachfolgende Trennoperationen einbezogen werden. Ionenaustauscher oder Mixed-Mode-Phasen dienen der Abtrennung niedermolekularer Matrixbestandteile (Situation C) vom Zielanalyt (z.B. Pharmakon).

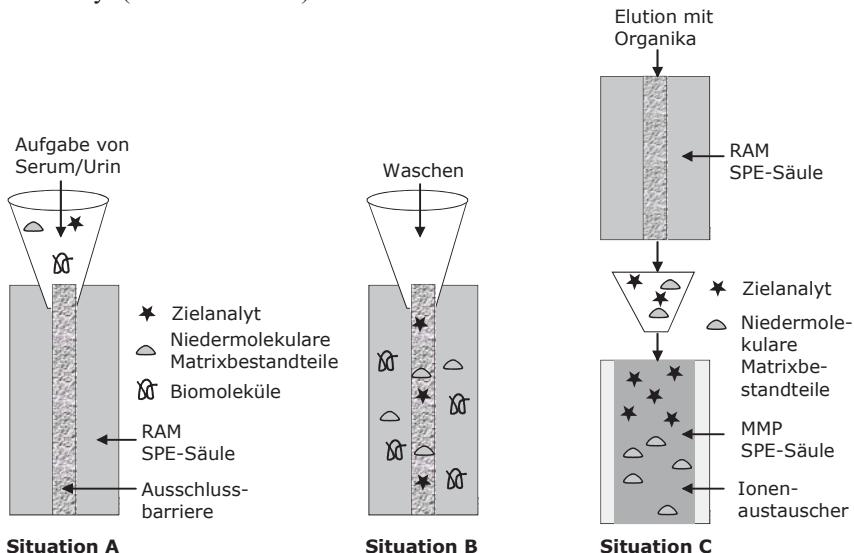


Abb. 3.47 Restricted access material

3.3.11 Molecular imprinting polymers (MIP)

Durch Molecular Imprinting („molekulares Prägen“) von Polymerpartikeln können zielgerichtet vollsynthetische Affinitätsmaterialien hergestellt werden, die spezifische chromatographische Trennungen ermöglichen und Grundlage für neue biotechnologische und biomédizinische Entwicklungen (z.B. Biosensoren) bieten. Molekulare Erkennung spielt bei biologischen Prozessen in der Natur eine entscheidende Rolle für die jeweilige biospezifische Wirkung.

Abbildung 3.48 zeigt das Prinzip von Molecular imprinting polymers. Funktionelle Monomere ordnen sich selbst um das Templat an und treten mit diesem in spezifische Wechselwirkungen (Situation 1). In einer Polymerisationsreaktion werden die funktionellen Monomere mit dem Templat vernetzt. Anders ausgedrückt, um ein als Matrize oder Schablone wirkendes Molekül herum wird durch vernetzende Polymerisation ein Polymernetzwerk hergestellt. Die Vorlage für das Molekül, das später selektiv erkannt werden soll, wird dabei vom Polymer umschlossen (Situation 2).

Anschließend wird die Vorlage wieder aus dem vernetzten Polymer herausgewaschen. Zurück bleibt ein Hohlraum im Polymer (Situation 3), der als *imprint* bezeichnet wird und dessen Form und Polaritätsverteilung (Dipole, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen) zur Vorlage komplementär sind. Die Umgebung dieses Hohlraums geht somit spezifische Wechselwirkungen mit dem Template-Molekül ein und zeigt für dieses Molekül eine ausgeprägte Affinität. Mit dem Molecular Imprinting lassen sich spezifische Bindungsstellen, ähnlich denen in Enzymen oder Antikörpern, in vernetzten, synthetischen Polymeren erzeugen.

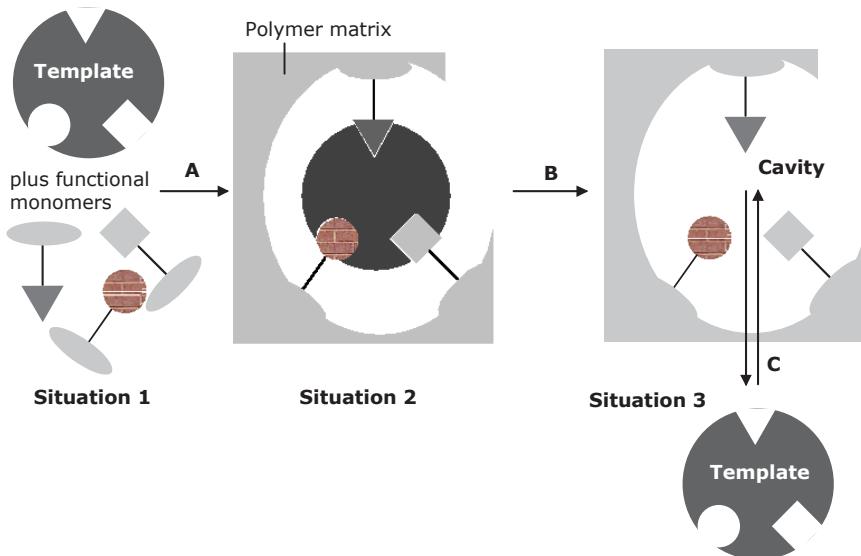


Abb. 3.48 Molecular imprinting polymers (MIP)

3.4 Literatur

- Dose K (1994) Biochemie, Springer-Verlag Heidelberg
 Gey MH (1998) Instrumentelle Bioanalytik, Springer-Verlag Braunschweig/Wiesbaden
 Kleber H-P, Schlee D, Schöpp W (1997) Biochemisches Praktikum, Gustav Fischer Verlag
 Meyer VR (1990) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Otto Salle Verlag
 Oetjen GW (1997) Gefriertrocknen, VCH-Verlag Weinheim

- Otto M (2006) Analytische Chemie, WILEY-VCH
Pawlizsyn J (1997) Solid phase microextraction, WILEY-VCH
Pohl T (1980) Methods Enzymol 182:68
Rehm H (1996) Der Experimentator: Proteinbiochemie, Georg Fischer Verlag Stuttgart
Ripperger S (1992) Mikrofiltration mit Membranen, VCH-Verlag Weinheim
Schachmann HK (1959) Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press
Scopes RK (1994) Protein Purification, Springer-Verlag Heidelberg
Stryer L (1990) Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Heidelberg
Valcarcel M, Luque de Castro MD (1991) Non-chromatographic continuous separation techniques, The Royal Society of Chemistry Cambridge
SGE Analytical Science, MEPS – Fast Miniaturized SPE
Häfeli UO et al. (1997) Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, New York
Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C (1999) J Microcolumn Sep 11:737
Mitra S (2003) Sample preparation techniques in analytical chemistry, Wiley-IEEE
Bruheim I, Liu X, Pawliszyn J (2003) Anal Chem 75: 1002
Wayne M (2006) Stir Bar Sorptive Extraction Based on Restricted Access Material for the Direct Extraction of Drugs and Metabolites in Biological Fluids, Gerstel AppNote 5/2006
Semrau A (2013) MEPS – Microextraction by Packed Sorbent, Produktdokumentation
Brewer WE, US patent 6, 566, 145 B2
Mohamed AR (2011), Mikroextraktion von gepackten Sorbenz, Anal Chim Acta 701:119
Stalikas C (2007) Pak J Anal Environ Chem 8 :72
Farajzadeh MA (2009) J Sep Sci 32: 3191

Niemals und auf keine Weise sollten
wir uns entmutigen lassen. Gerade
dann, wenn wir unsere Mängel und
Fehler zu erkennen in der Lage sind,
haben wir den allerwenigsten Grund,
unzufrieden zu sein.

Francois Fénelon

4 Chromatographie-1: LC – HPLC – UHPLC

4.1 Einführung und Systematik

Die Chromatographie gehört wie die Elektrophorese zu den analytischen Trennmethoden, die auch im (semi)-präparativen Maßstab durchgeführt werden können.

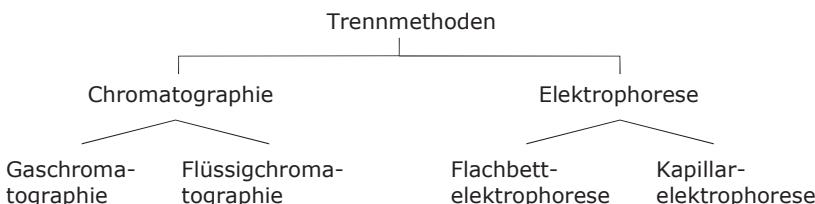


Abb. 4.1 Methodeneinteilung -I (Chromatographie versus Elektrophorese)

Unter Chromatographie versteht man die Wechselwirkungen von Analyten mit einer mobilen und stationären Phase. Das Resultat einer chromatographischen Trennung ist ein Chromatogramm, in dem auf der Ordinate ein Signal (z.B. UV-Absorption) und auf der Abszisse die Zeit aufgetragen ist. Die einzelnen Analyte werden in Form von Peaks registriert. Dabei sind die unterschiedlichen Zeiten (Retentionszeiten) ein qualitatives Merkmal für diese Substanzen. So wird z.B. Benzol bei der Retentionszeit 1 (t_{R1}) und Naphthalin bei der Retentionszeit 2 (t_{R2}) eluiert. Die Peakhöhen bzw. Peakflächen repräsentieren quantitative Merkmale und dienen zur Ermittlung der Analyt-Konzentration in einer Probe.

Die Elektrophorese basiert dagegen auf der Wanderung von geladenen Analyten in einem elektrischen Feld und beinhaltet Techniken der Flachbettelektrophorese (*slab gel electrophoresis*) und Kapillarelektrophorese (CE: *capillary electrophoresis*). Das Ergebnis sind einzelne Banden, die in einem Gel oder auf einer Folie visualisiert werden bzw. ein Elektropherogramm, in dem ein Signal gegen die Migrationszeit dargestellt ist (CE).

Die Chromatographie nutzt zum großen Teil die verschiedensten Techniken der Flüssig- und Gaschromatographie (*gas chromatography*). Die LC (*liquid chromatography*) unterteilt man in sogenannte Flachbettverfahren (TLC: *thin layer chromatography*) und in die Flüssigchromatographie in Säulen, die die klassische Säulenchromatographie nach Tswett, die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC: *high performance liquid chromatography*) und die Biochromatographie (BioLC bzw. FPLC: *fast protein liquid chromatography*) umfasst.

4.2 Säulenflüssigchromatographie

Die Säulenflüssigchromatographie (LC) gehört neben der Gas- (GC) und Dünn-schichtchromatographie (DC) zu den wichtigsten und leistungsfähigsten Trennme-thoden. Seit mehreren Jahren etabliert sich die Kapillarelektrophorese (CE) als ein weiteres sehr effizientes Trennverfahren. Durch die Entwicklung der Hochlei-stungsflüssigchromatographie (HPLC) vor ca. 40 Jahren wurde die klassische Säulenflüssigchromatographie revolutioniert. Zu den Wegbereitern der HPLC ge-hören Giddings, Snyder, Knox, Kirkland, Huber, Engelhardt und Unger.

Charakteristisch für die HPLC im Vergleich zur Klassischen LC ist die Minia-turisierung und Optimierung der Trennapparatur und -materialien (Tabelle 4.1).

Die Entwicklung sehr kleiner und monodisperser Partikel im Bereich um $5\text{ }\mu\text{m}$, spezieller Säulenfülltechniken unter Hochdruck, empfindlicher Detektoren mit nur geringem Volumen (ca. $10\text{ }\mu\text{l}$) der Durchflusssküetten und pulsarmer Hochdruck-pumpen ermöglichte die Durchführung von chromatographischen Trennungen kleinster Substanzmengen im Nanogramm- und Picogramm-Bereich innerhalb weniger Minuten mit hoher Trennleistung.

Tabelle 4.1 Vergleiche zwischen klassischer LC und HPLC

	Klassische LC	HPLC
Entwicklungsbeginn	1906: M. Tswett Trennung von Pflanzenfarbstoffen	1965: Theroretische Grundlagen 1970: Erste kommerzielle Geräte
Säulendimension	m- bis cm-Bereich (z.B. $1\text{ m}\cdot 5\text{ cm}$)	cm- bis mm-Bereich ($25\text{ cm}\cdot 4,6\text{ mm}$)
Säulenmaterial	Glas	Stahl, stabiles Glas, Polymere (PEEK)
Stationäre Phasen	Silicagel, Aluminiumoxid	Silicagel, Polymere
Teilchengröße	oberer μm -Bereich ($100\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$)	unterer μm -Bereich ($3\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$)
Eluentförderung	Hydrostatisch, Schlauchpumpen	Hochdruckpumpen
Säulenvordruck	bis ca. $0,5\text{ MPa}$ (5 bar)	1 bis ca. 20 MPa
Säulenfülldruck	Hydrostatisch, wenige Bar	$40\text{--}80\text{ MPa}$ für Silicagel 1 bis ca. 12 MPa für Polymere
Flussrate	mehrere ml/Stunde	$0,3\text{--}2\text{ ml/min}$
Analysenzeit	Stundenbereich (Tage)	Minuten-/(Sekunden)bereich
Probemenge	mg- bis g-Bereich	pg- bis μg -Bereich
Bodenzahl	$1\text{--}100/\text{m}$	$5000\text{--}100\,000/\text{m}$
Anzahl der Peaks	2–10	5–50 und mehr

4.2.1 Grundlagen des Trennprozesses

Unter Chromatographie versteht man einen Trennprozess, bei dem das Probege misch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Die eine Hilfsphase, die stationäre Phase, ruht. Die andere Hilfsphase, die mobile Phase, strömt daran im chromatographischen Bett vorbei.

Als stationäre Phasen werden kleine Teilchen fester, poröser und oberflächenaktiver Materialien oder Trägermaterialien, die mit einem physikalisch oder chemisch gebundenen „Flüssigkeitsfilm“ bedeckt sind, eingesetzt. In der Gaschromatographie ist die mobile Phase gasförmig (Stickstoff, Wasserstoff). LC-, HPLC- oder DC-Trenntechniken verwenden dagegen Flüssigkeiten als mobile Phasen.

4.2.1.1 Darstellung des Trenneffektes in einer Chromatographiesäule

Zwei verschiedene Probesubstanzen A und B werden auf eine Trennsäule appliziert und beginnen mit der mobilen und stationären Phase in verschiedene Wechselwirkungen zu treten (Situation 1 im Abbildung 4.2).

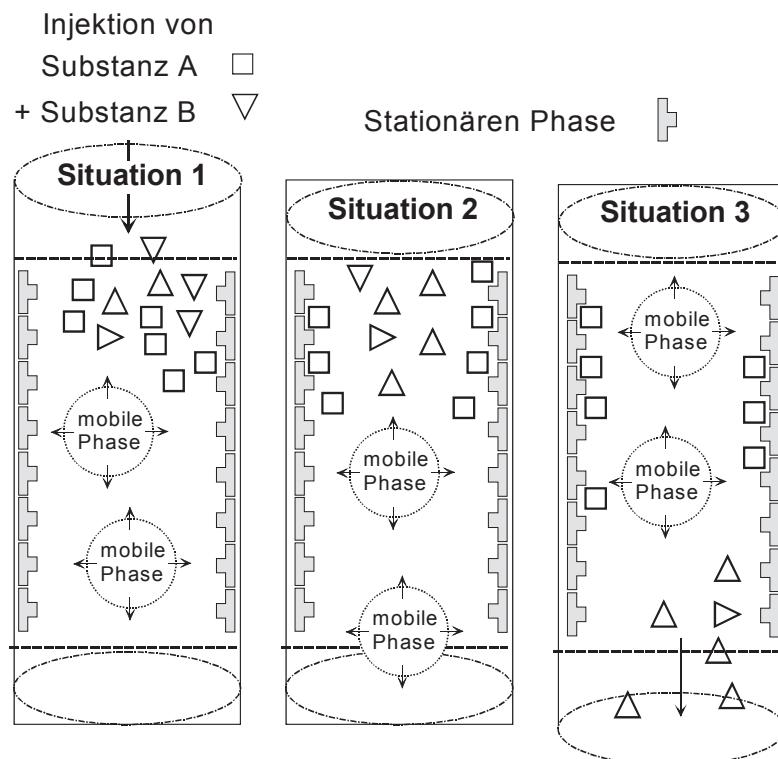


Abb. 4.2 Darstellung der flüssigchromatographischen Trennung in Säulen (schematisch)

In diesem Beispiel besitzt Substanz A auf Grund seiner physiko-chemischen Eigenschaften eine höhere „Affinität“ bzw. ein intensiveres Bindungsvermögen zu den Oberflächengruppen der stationären Phase. Substanz B wird im Gegensatz dazu von der Trennphase weniger stark angezogen bzw. gebunden und hält sich bevorzugt in der mobilen Phase auf (Situation 2).

Diese Wechselwirkungen der Probemoleküle zwischen beiden Phasen wiederholen sich ständig und werden an Hand des Verteilungskoeffizienten K , dem Quotienten der Konzentration einer Substanz in der stationären (c_{stat}) und mobilen Phase (c_{mob}), beschrieben.

$$K = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}} \quad (4.1)$$

Dieser drückt aus, ob sich eine Substanz bevorzugt in der mobilen oder stationären Phase aufhält. Die Substanz B mit stärkerer „Affinität“ zur mobilen Phasen gelangt zuerst zum Säulenausgang, während Substanz A von der stationären Phase zurückgehalten (retardiert) wird (Situation 3) und mit größerer zeitlicher Verzögerung die Trennsäule verlässt.

4.2.1.2 Peakverbreiterung in der Säule und Van-Deemter-Gleichung

Aufgrund dieser Wechselwirkungen erfolgt eine zunehmende Verdünnung der Probemoleküle innerhalb der Trennsäule. Die resultierende Verbreiterung der Substanzpfropfen, die man als Peak- oder Bandenverbreiterung bezeichnet, wird durch verschiedene Phänomene (Ursache 1 bis 4) hervorgerufen.

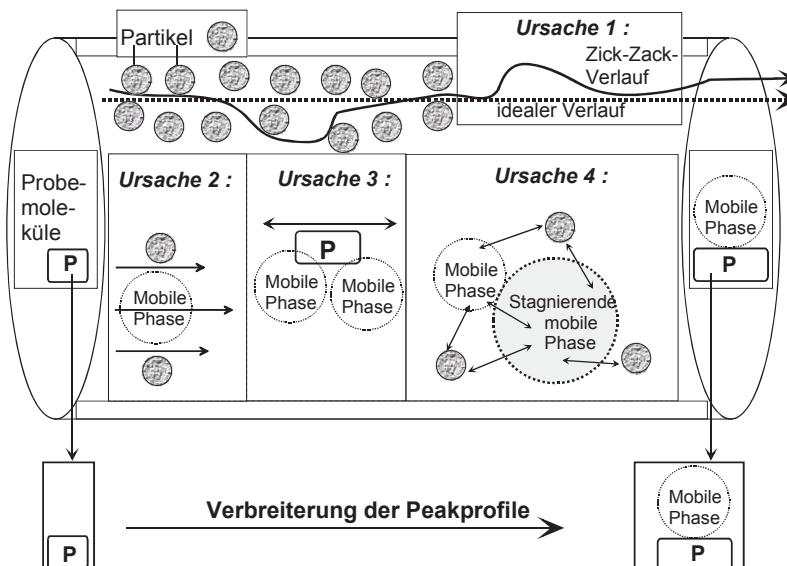


Abb. 4.3 Ursachen der Peakverbreiterung innerhalb der Trennsäule

Ursache 1:

Die *Streu- oder Eddy-Diffusion* beinhaltet, dass die Probemoleküle nicht linear (gestrichelte Linie), sondern auf „Zick-Zack-Wegen“ in der Säule wandern und sich verbreitern.

Ursache 2:

Die Moleküle bewegen sich in der Mitte zweier Säulenpartikel schneller als in ihrer unmittelbaren Nähe, wodurch eine *Strömungsverteilung* entsteht.

Ursache 3:

Ein weiterer Beitrag zur Peakverbreiterung resultiert durch die Diffusion der Probemoleküle in der mobilen Phase selbst, was als *Längsdiffusion* bezeichnet wird.

Ursache 4:

Außerdem finden *Stoffaustauschphänomene* zwischen mobiler, stationärer Phase und der in den Poren eingeschlossenen „stagnierenden“ mobilen Phase statt.

All diese Effekte bewirken, dass die Peakprofile nach der Trennung breiter als zu Beginn der Probeinjektion sind.

Diese Ursachen der internen Peakverbreiterung von Substanzen innerhalb einer Säule sind in den Termen der Van-Deemter-Gleichung enthalten.

$$H_{(\text{HETP})} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (4.2)$$

Danach ist die theoretische Trennstufenhöhe (theoretische Bodenhöhe) H ein Maß für die Bandenverbreiterung eines Peaks. Der A-Term steht für die Streudiffusion, der B-Term repräsentiert die Strömungsverteilung und der C-Term beinhaltet alle Stoffaustauschphänomene der mobilen und stationären Phase. Je kleiner H ist, desto schmäler werden die Peaks im Chromatogramm und um so größer ist die theoretische Trennstufen- oder Bodenzahl N . Es gilt die folgende Beziehung,

$$N = \frac{L}{H} , \quad (4.3)$$

wobei L die Länge der Trennsäule (cm) ist.

Die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe H von der linearen Strömungsgeschwindigkeit u (Van-Deemter-Kurve) zeigt die Abbildung 4.4.

Der Beitrag der *Eddy-Diffusion* (1) ist unabhängig von der linearen Geschwindigkeit u . Mit steigender linearer Geschwindigkeit geht die *Längsdiffusion* (2) gegen null und die *Stoffaustauschphänomene* (3) nehmen linear zu. Aus allen drei Beiträgen setzt sich der Verlauf der Van-Deemter-Kurve (4) zusammen.

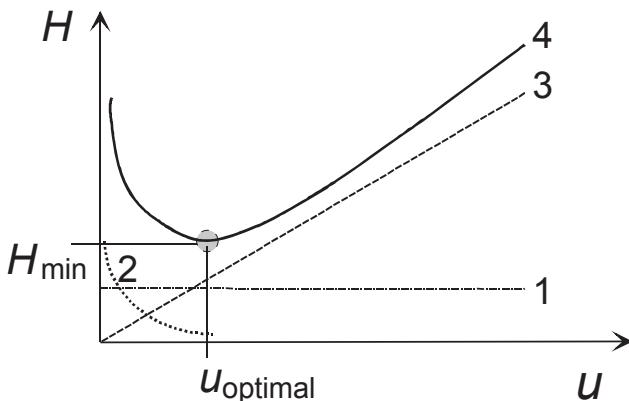


Abb. 4.4 Beiträge zur Peakverbreiterung (Van-Deemter-Kurve)

Diese enthält eine optimale Fließgeschwindigkeit (u_{optimal}), bei der die Trennstufenhöhe minimal ist (H_{\min}). Die HPLC-Säulen sollten im Bereich dieses Flusses eluiert werden, da die günstigsten Auf trennungen mit den schmalsten Peakprofilen in diesem Fall erreicht werden.

Ein Vergleich zwischen Partikeln unterschiedlicher Teilchengröße hinsichtlich der zu erzielenden Trennstufenhöhen zeigt das folgende Bild. Mit 3- und 5- μm -Materialien werden sehr niedrige H -Werte bzw. hohe Bodenzahlen und sehr effiziente Trennungen mit schmalen Peakformen erreicht.

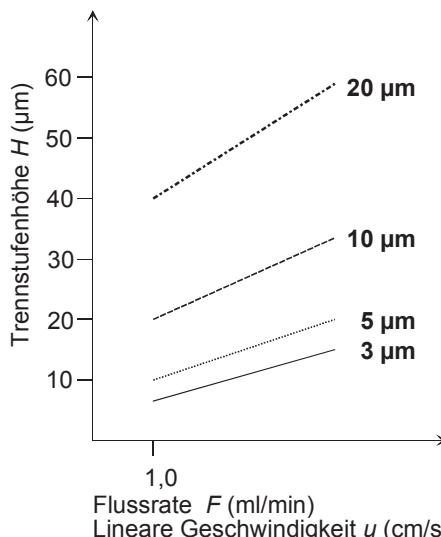


Abb. 4.5 Einfluss der Teilchengröße auf die Trennstufenhöhe H

4.2.1.3 Peakverbreiterung außerhalb der Säule

Zur Peakverbreiterung tragen auch Totvolumina bei, die außerhalb der Chromatographiesäule durch die Verbindungskapillaren zwischen Injektor und Säule bzw. Säule und Detektor sowie innerhalb der Detektorzelle selbst entstehen (s. Abbildungen 4.8 und 4.13). Diese Verbindungskapillaren sollten einen kleinen Innendurchmesser (ca. 0,15 bis 0,25 mm) haben. Zu kleine Querschnitte der Kapillaren können jedoch zu Verstopfungen durch Probeverunreinigungen, Partikel der Trennsäule oder Auskristallisieren von Salzen aus der mobilen Phase, was in der Praxis nie auszuschließen ist, führen. Daraus würden Druckanstiege resultieren, die den Bruch der Küvettenfenster der Durchflusszelle bewirken können.

Der Kapillarquerschnitt nach der Detektorzelle, wo die externe Bandenverbreiterung keine Rolle mehr spielt, kann deshalb größer (ca. 0,5 bis 1,0 mm) gewählt werden.

4.2.1.4 Kenngrößen und Aussagen des Chromatogramms

In einem Chromatogramm ist ein bestimmtes Signal (z.B. die UV-Absorption) und dessen Intensität gegen die Zeit aufgetragen. Zwei verschiedene Substanzen (S_1 und S_2) werden in einer Trennsäule zeitlich verzögert aufgetrennt und erscheinen nach den für sie charakteristischen Retentionszeiten t_R im Chromatogramm.

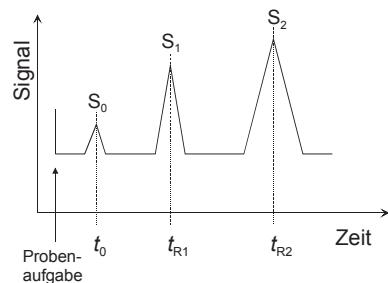


Abb. 4.6a Chromatogramm (qualitativ)

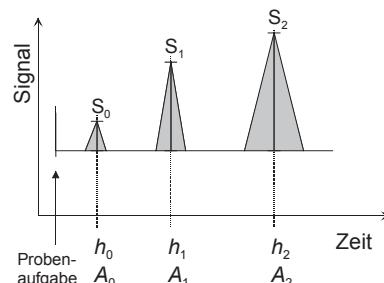


Abb. 4.6b Chromatogramm (quantitativ)

Die Zeit t_0 der Substanz S_0 wird als Totzeit bezeichnet und repräsentiert eine Verbindung, die mit der stationären Phase in keinerlei Wechselwirkungen tritt. Identisch ist die Zeit mit der Wanderungsdauer eines Moleküls der mobilen Phase vom Säulenbeginn bis zur Registrierung des Peakmaximums in der Detektorzelle.

Grundlage der quantitativen Bestimmung ist die chromatographische Analyse einer entsprechenden Referenzsubstanz mit bekannter Konzentration und die Ermittlung ihrer Peakfläche oder -höhe (s. Abbildung 4.6b).

Nach einem zweiten Chromatographie-Lauf, in dem diese Substanz mit unbekannter Konzentration aus einer Probe unter identischen Bedingungen analysiert wird, erfolgt die Quantifizierung mit Hilfe des Dreisatzes.

$$\frac{c_{\text{Probe}}}{A(h)_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Test}}}{A(h)_{\text{Test}}} \quad (4.4)$$

Aus dem Chromatogramm und den aufgezeichneten Peaks lassen sich weitere Kenngrößen wie die Peakbasisbreite w_b oder die Peakbreite in halber Höhe w_h (früher $b_{1/2}$) ermitteln, die zur Charakterisierung einer chromatographischen Trennung erforderlich sind (s. Abbildung 4.7).

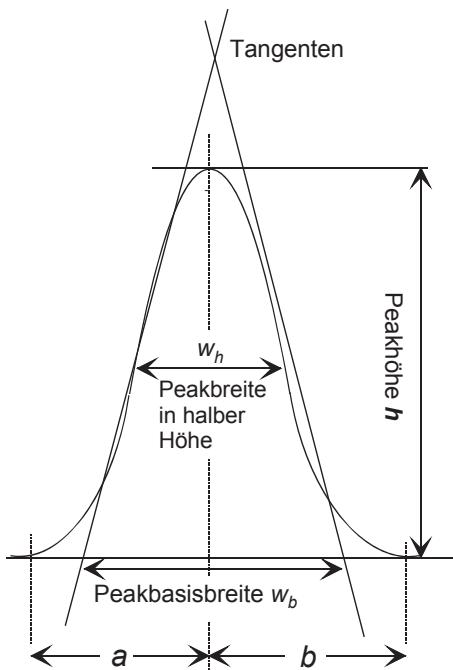


Abb. 4.7 Peakprofil und Kenngrößen

Als Maß für das Trennvermögen der Säule wird die auf ein benachbartes Peakpaar bezogene Auflösung R herangezogen, die in der Praxis durch die Bildung des Quotienten aus dem Abstand beider Peakmaxima (Differenz der Retentionszeiten t_{R2} und t_{R1}) und dem arithmetischen Mittel aus den dazugehörigen Peakbasisbreiten w_1 und w_2 (4.5) oder genauer auf der Basis der Retentionszeit und Peakbreite in halber Höhe (4.6) berechnet wird.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (4.5)$$

Angestrebgt werden optimale chromatographische Auflösungen. Bei $R = 1,5$, was auch als 6σ -Trennung bezeichnet wird, erfolgt Basislinientrennung zwischen beiden Peaks. Für quantitative Peakauswertungen sind R -Werte $\leq 0,8$ unzureichend.

Die mathematische Formulierung der Auflösung erfolgt nach unterschiedlichen Näherungen bzw. Vereinfachungen, weshalb verschiedene „Auflösungsformeln“ in der Literatur existieren. Eine in der Flüssigchromatographie häufig verwendete Form ist in der folgenden Gleichung enthalten.

$$R = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \sqrt{N} \frac{k'}{1 + k'} \quad (4.6)$$

Diese Gleichung kombiniert die auf der Trennung beruhenden Faktoren der Selektivität α , auch als Trennfaktor oder relative Retention bezeichnet, und den Verteilungs- oder Kapazitätsfaktor k' mit dem der Trennung entgegenwirkenden Faktor der Bandenverbreiterung, die durch die theoretischen Trennstufenzahl (oder Bodenzahl) N charakterisiert wird.

Dabei ist die Selektivität α ein Maß für die Trennung der Peakmaxima zweier Substanzen mit den Kapazitätsfaktoren k_1' und k_2' .

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (4.7)$$

Der Kapazitätsfaktor ist wiederum ein Maß für die gegenüber einer nicht retardierten Substanz erfahrenen Verzögerung.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4.8)$$

Die theoretische Trennstufenzahl N dient als Maß für die während der Retentionszeit t_R erfolgte Peakdispersion σ^2 oder als Quotient der Trennsäulenlänge L (cm) und der Trennstufenhöhe H (μm).

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} = \frac{L}{H} \quad (4.9)$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4.10)$$

Zur Angabe der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase dienen die Volumengeschwindigkeit F (cm^3/s) oder die lineare Geschwindigkeit u (cm/s). Gegenüber F besitzt die lineare Geschwindigkeit den Vorteil, dass sie unabhängig vom Querschnitt der Säule und dem Druckabfall längs der Säule proportional ist. Sie wird definiert als Quotient aus Säulenlänge L und Totzeit t_0 .

$$u = \frac{L}{t_0} = \frac{F}{q} = \frac{F}{r^2 \pi \varepsilon_T} \quad (4.11)$$

ε_T ist der Bruchteil des freien Querschnittes der ungefüllten Säule, der der flüssigen Phase zur Verfügung steht, und wird als Porosität bezeichnet.

Bei Verwendung von unporösen Partikeln beträgt $\varepsilon_T = 0,4$, da nur ca. 40% des Säulenquerschnittes zur Verfügung stehen. Für poröses Säulenfüllmaterial wie Silicagel betragen die Porositäten ca. 0,8. Bei diesem Wert befindet sich eine Hälfte der gesamten flüssigen Phase in den Partikelporen.

Die Abhängigkeit der theoretischen Trennstufenhöhe von der linearen Geschwindigkeit wurde bereits in Abbildung 4.4 dargestellt. Um HPLC-Säulen, die stationäre Phasen mit verschiedenen großen Partikeln (z.B. 3, 5 oder 10 µm) enthalten, auch untereinander vergleichen zu können, leiteten Bristow und Knox auf der Grundlage umfangreicher Messungen sogenannte dimensionslose Größen, auch als reduzierte Größen bezeichnet, für die Van-Deemter-Gleichung ab. Der folgende Ausdruck zeigt die Verknüpfung von reduzierter theoretischer Trennstufenhöhe h und reduzierter linearer Geschwindigkeit v .

$$h = a^{1/3} v + \frac{b}{v} + c v \quad (4.12)$$

Die dimensionslosen Konstanten a , b und c repräsentieren die Peakverbreiterungsphänomene in der Trennsäule. Eine HPLC-Säule besitzt gute Chromatographie-Parameter, wenn der Faktor a für die Packungsqualität der Säule zwischen 2 und 4 liegt, der die Eddy-Diffusion charakterisierende Koeffizient b ca. 1,3–1,5 beträgt und der Faktor c , der die Stoffaustauschphänomene erfasst, zwischen 0,01 und 0,05 liegt. Die Ermittlung von h und v erfolgt nach folgenden Gleichungen:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (4.13)$$

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m} \quad (4.14)$$

Als besonders geeignetes Qualitätsmerkmal einer Säule wurde die dimensionslose Trennimpedanz E (auch Effizienz genannt) definiert, die von der Retentionszeit t_R , dem Druckverlust Δp , der Bodenzahl N , der Viskosität η der mobilen Phase und dem Kapazitätsfaktor k' abhängen. Sie kann auch aus dem Produkt $h^2 \cdot \varphi$ berechnet werden, wobei φ als dimensionsloser Strömungswiderstand bezeichnet und anstelle der Permeabilität K_F einer Säule verwendet wird.

$$E = \frac{t_R \cdot \Delta p}{N \cdot \eta \cdot (1 + k')} = h^2 \cdot \varphi \quad (4.15)$$

Durch die Angabe aller vier dimensionslosen Größen h , η , φ und E wird die Qualität einer gefüllten HPLC-Säule charakterisiert. Üblich sind jedoch meist die H - und N -Werte für eine HPLC-Säule. Folgende Parameter bezogen auf die Substanz Biphenyl wurden z.B. für eine mit Reversed-Phase-Material (Abschnitte 3.2.8.4.3 und 4.2.3.2) selbst hergestellte HPLC-Glassäule erzielt: $N=83\,000/\text{m}$, $H=12\,\mu\text{m}$, $h=2,2\,\text{dp}$, $\varphi=8500$, $u=1,3\,\text{mm}/\text{s}$, $v=4,3$, $\varepsilon=40\,800$.

Der Slurry für diese Säulenfüllung bestand aus Tetrachlorethan/Dioxan 17:3 V/V (20 ml) und ca. 1,2 g LiChrosorb RP18 mit einer Korngröße von 5 μm . Die Flussrate betrug 0,7 ml/min, die Säulendimension 150 mm · 3,8 mm i.D. und die mobile Phase bestand aus einem Acetonitril-/Wassergemisch 70:30 V/V.

4.2.2 Apparativ-methodische Grundlagen

4.2.2.1 Aufbau einer HPLC-Apparatur

Die Abbildung 4.8 zeigt den apparativen Aufbau eines Hochleistungsflüssigchromatographen. Die mobile Phase befindet sich in einem Elutionsmittelvorratsgefäß und wird mit Hilfe einer Hochdruckpumpe bei einem Druck von ca. 2 bis 20 MPa über eine Pulsationsdämpfung und einen Filter zum Injektor gefördert. Dort erfolgt die Aufgabe der Probe (Volumen 5–20 μl), ohne dass eine Druckreduzierung notwendig wird.

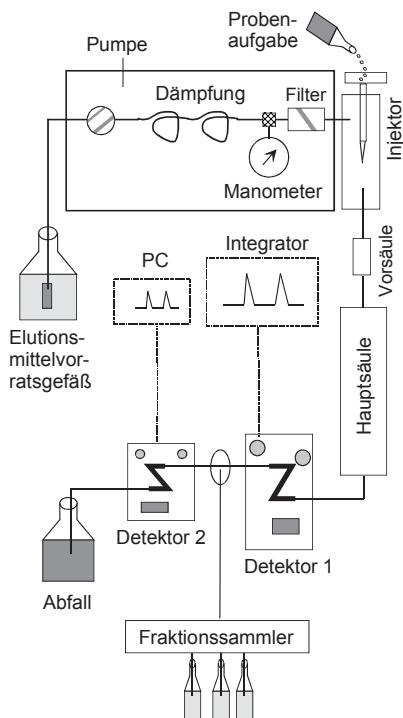


Abb. 4.8 HPLC-Apparatur

Die Vorsäule dient zum Zurückhalten von möglichen Probekontaminationen und damit zur Schonung der Hauptsäule, in der die einzelnen Substanzen durch Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase aufgetrennt werden. Danach erfolgt ihrer Registrierung mit Hilfe eines Detektors oder mehrerer hintereinander geschalteter Detektoren, die mit Integratoren oder Computern verbunden sind. Ein Fraktionssammler dient zum „Auffangen“ der getrennten Substanzen.

4.2.2.1.1 Hochdruckpumpen

Zur Förderung des Elutionsmittels werden meist Kurzhub-Kolbenpumpen eingesetzt, aber auch Membran- und Spritzenpumpen finden in der HPLC Anwendung. Abbildung 4.9 zeigt das Förderprinzip einer Hochdruck-Kolbenpumpe. Der Pumpenkopf besteht aus zwei Saphirkolben und je einem Ein- und Auslassventil.

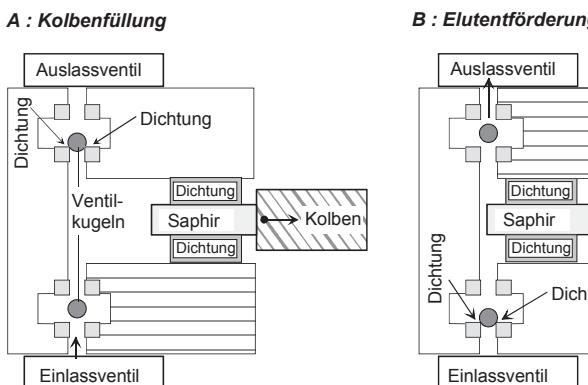


Abb. 4.9 Förderprinzip einer Hochdruck-Kolbenpumpe

Ein Kolben fördert die mobile Phase vom Reservoir in den Pumpenkopfraum (Situation A), der zweite Kolben drückt die zuvor „angezogene“ (geförderte) Flüssigkeit über das Injektionsventil zur HPLC-Säule (Situation B).

Die Ventile enthalten kleine Rubinkugeln, die ober- und unterhalb des Ventilylinders abgedichtet sind. Auch die Saphirkolben sind so mit Dichtungen umgeben, dass bei Drücken um 40 bis 60 MPa keine Flüssigkeit aus der Pumpe entweichen kann. Bei der Kolbenfüllung (A) bewegt sich der Kolben aus dem Pumpenkopf heraus und erzeugt dadurch einen Unterdruck, der das Öffnen des Einlassventils hervorruft. Dabei wird die Rubinkugel etwa in die Mitte des Ventilylinders gedrückt, und die Flüssigkeit strömt in den Pumpenkopf, während das Auslassventil geschlossen bleibt.

Innerhalb dieses Vorganges drückt der andere Kolben die von ihm bereits geförderte Flüssigkeit durch sein entsprechendes Auslassventil in das Trennsystem (Elutionsmittelförderung), wobei das Einlassventil durch den entstehenden Druck geschlossen wird (Situation B). Wenn beide Kolben exakt gegenläufig Flüssigkeit fördern, wird die Pulsation jedes einzelnen Kolbenhubes kompensiert.

Meist sind der Pumpe Dämpfungsglieder (Manometer mit Widerstandskapazitätselementen) nachgeschaltet, so dass noch verbliebene Pumpenpulsationen weiter gedämpft werden. Nicht gedämpfte Pulsationen ergeben „reissverschlussartige“ und verrauschte Basislinien und Peakprofile bei der Registrierung des Chromatogramms, die u.a. die Nachweisgrenze einer Substanz herabsetzen und die quantitative Bestimmung der Peaks verfälschen. Bereits kleine Luftblasen im Pumpenkopf, die z.B. durch ungenügend entgaste mobile Phasen entstehen, bewirken drastische Pulsationen. Schmutzpartikel und feiner Abrieb der Dichtungsmaterialien können zu Verstopfungen des HPLC-Systems führen. Die Elutionsmittelförderung erfolgt isokratisch, d.h., die Zusammensetzung der mobilen Phase bleibt während der Elution konstant und nur eine HPLC-Pumpe ist erforderlich.

Eine kontinuierliche Veränderung der Elutionsmittelkraft tritt bei der Gradientenelution (Hoch- oder Niederdruckgradient) ein. Dabei werden zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher Polarität (Elutionsmittelkraft) kontinuierlich gemischt und durch die Säule gepumpt. Man unterscheidet zwischen linearen, stufenförmigen, konkaven und konvexen Gradientenverläufen. Neben binären Gradienten werden z.T. auch ternäre und quarternäre (3 bzw. 4 verschiedene Lösungsmittel-/gemische) Gradienten in der HPLC verwendet.

Die Eluentenmischung innerhalb einer Mischkammer (T-Stück) erfolgt häufig auf der Hochdruckseite, d.h., für jedes Lösungsmittel ist eine separate Hochdruckpumpe erforderlich. Für ternäre oder quarternäre Gradienten werden demzufolge eine dritte bzw. vierte Pumpe benötigt.

Bei der Niederdruckgradiententechnik ist dagegen nur eine Hochdruckpumpe zur Elution notwendig. Mit Hilfe eines programmierbaren und automatisch gesteuerten Mischungsventils werden die einzelnen Eluenten in entsprechenden Volumenverhältnissen stets kontinuierlich neu eingestellt, gefördert und zu einem Elutionsstrom wechselnder Zusammensetzung vereinigt.

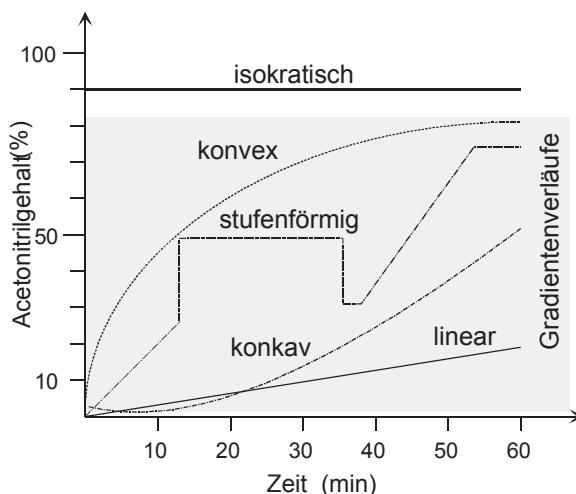


Abb. 4.10 Isokratische Elution und binäre Gradientenverläufe

4.2.2.1.2 Injektionssysteme

Sogenannte Septuminjektoren werden heute kaum noch eingesetzt. Probeschleifenventile wie das Rheodyneventil sind Bestandteil fast aller HPLC-Systeme. Die Probeaufgabetechnik unter Hochdruck zeigt Abbildung 4.11. In der Situation A wird die Probeflüssigkeit mit Hilfe einer Dosierspritze in das Injektionsventil unter Normaldruck (dünne Linie) appliziert.

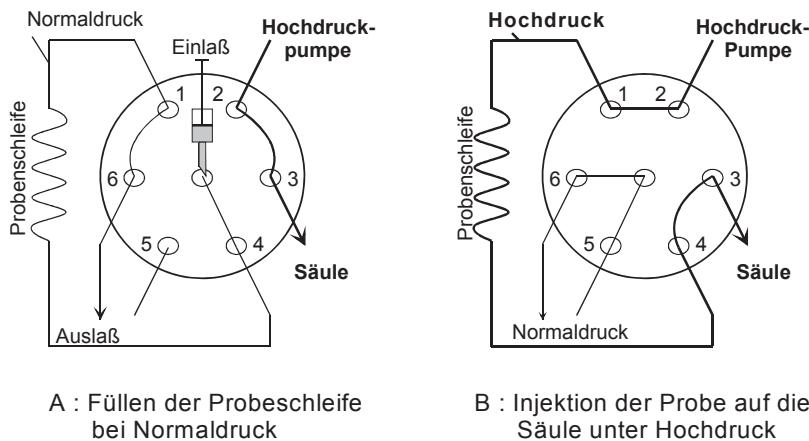


Abb. 4.11 Schematische Darstellung des HPLC-Injektionsventils

Um eine Probeschleife (Volumen: 20 µl) zu füllen, ohne dass Restsubstanzen der vorangegangenen Dosierung noch vorhanden sind, sollte das Aufgabevolumen ca. 50 bis 100 µl betragen, wenn zuvor keine Schleifenspülung z.B. mit der mobilen Phase erfolgte. Die Förderung der mobilen Phase von der Pumpe zur Trennsäule erfolgt zu dieser Zeit unter Hochdruck (dicke Verbindungslinie).

Bei der Injektion der Probe auf die Säule werden durch Drehen des Dosierventsils die Kapillarwege, wie in der Situation B dargestellt, positioniert. Die Probeschleife wird schlagartig in das Hochdruck-Kapillarsystem eingeschaltet, so dass die Probe auf die Trennsäule appliziert wird. Die Injektionswege (dünne Linie) befinden sich jetzt unter Normaldruck.

4.2.2.1.3 Trennsäulen und stationäre Phasen

Die Trennsäulen bestehen meist aus Edelstahl, aber auch Säulen aus Titan, Polymeren (PEEK) oder druckverfestigtem Glas werden eingesetzt. Die Säulenenden sind mit feinmaschigen Filtersieben (ca. 0,45 µm) verschlossen, so dass die kleinen Partikel (3, 5 µm) beim Durchpressen der mobilen Phase unter hohem Druck nicht aus der Trennsäule gespült werden. Die Säulenenden und Verbindungskapillaren zum Injektor und zur Detektorzelle müssen wie erwähnt sehr totvolumenarm sein, um externe Peakverbreiterungen zu vermeiden.

Die Korngrößenverteilung eines Füllmaterials sollte möglichst eng sein. Feiner Abrieb ($dp < 1 \mu\text{m}$) muss auf jeden Fall vermieden werden. Dies kann durch Windsichten und/oder Sedimentieren der Partikel in einer entsprechenden Flüssigkeit innerhalb eines Standzylinders erfolgen. Die gewünschten größeren Partikel setzen sich zuerst auf dem Boden des Gefäßes ab, während der feine Abrieb durch Abließen des oberen Flüssigkeitsvolumens entfernt werden kann.

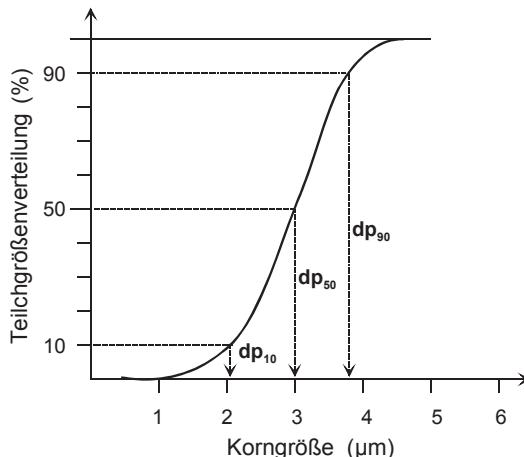


Abb. 4.12 Teilchengrößenverteilung, 3 μm -Material

In Abbildung 4.12 ist eine Verteilungskurve der Teilchengrößen eines geeigneten Trennmaterials am Beispiel einer 3- μm -Silicagelfraktion dargestellt. Die Werte dp_{10} und dp_{90} entsprechen mittleren dp -Werten bei 10 bzw. 90% der Teilchenverteilung. Die Differenz vom Mittelwert dp_{50} soll das 0,5 bzw. 1,5-fache nicht übersteigen. Bezogen auf das Beispiel in diesem Bild geht hervor, dass die dp_{10} - und dp_{90} -Werte zwischen einem Partikeldurchmesser von 1,5 und 4,5 liegen könnten. Der Kurvenverlauf zeigt, dass die Verteilung eng ist und den Anforderungen genügt.

4.2.2.1.4 Säulenfülltechnik

Abbildung 4.13 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer Apparatur zum Füllen von HPLC-Säulen unter Hochdruck. Die stationäre Phase (Silicagel) wird zuerst in einer Flüssigkeit aufgeschlämmt und mit Hilfe von Ultraschall möglichst homogen verteilt. Ein Zusammenklumpen von Partikeln ergibt schlecht gefüllte Säulen, deren Packung nachrutschen kann. Dadurch entstehen Hohlräume und es resultieren Peakverbreiterungen, so dass die Säule niedrige Bodenzahlen und hohe Trennstufenhöhen aufweist. Bereits geringe Totvolumina in der Säule können bewirken, dass alle Komponenten in einem Peak erscheinen und keine Trennung möglich ist.

Das Gemisch aus dieser meist viskosen Flüssigkeit und der Trennphase wird als Slurry bezeichnet. Ideal ist, wenn jedes Teilchen einzeln von Flüssigkeitsmolekülen in dieser Suspension umgeben ist.

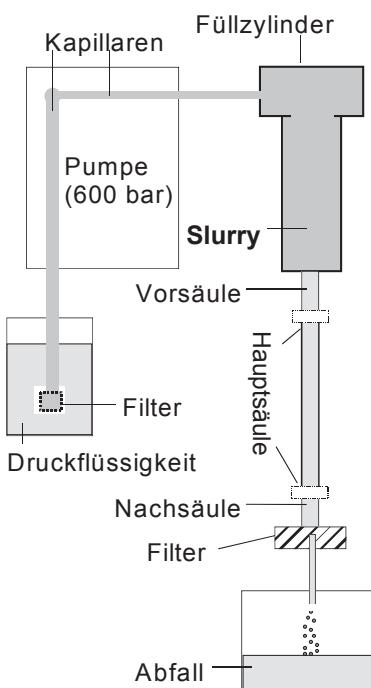


Abb. 4.13 HPLC-Säulen-Füllapparatur

Verwendet werden u.a. halogenierte Kohlenwasserstoffe (Tetrachlorethan) hoher Dichte, die durch Zusatz anderer Flüssigkeiten (Dioxan, Ethanol, Isopropanol) so eingestellt werden, dass die resultierende Dichte γ der Trennphase (Silicagel, $\gamma=2,2 \text{ g/cm}^3$) möglichst genau entspricht (*Balanced Density Method*). Das Aufschlämmen der Trennphase in einer hochviskosen Flüssigkeit wie Paraffinöl wird als *Viscosity Method* bezeichnet. Beide Varianten verhindern ein schnelles Absinken und Agglomerieren des Trennmaterials und sind eine Voraussetzung, dass die HPLC-Säule nach ihrer Füllung eine möglichst dichte (Kugel)packung aufweist.

Nach Präparation des Slurry's wird dieser in den Füllzylinder eingebracht, der sofort dicht verschlossen wird. Mit hoher Pumpenleistung (10 ml/min und mehr) wird eine Druckflüssigkeit (Methanol) zum Füllzylinder gefördert, die den Slurry durch eine kleine Vorsäule in die Hauptsäule presst. Vor- und Nachsäule werden bei dieser Druckfiltration mit gepackt, da Anfang und Ende der Hauptsäule weniger dicht gefüllt sein können.

Der Filter am Ende der Säulenkopplung verhindert den Austritt der Partikel. Die Druck- und Slurry-Flüssigkeiten passieren den Filter und gelangen in ein Abfallgefäß. In der Regel ist eine HPLC-Säule nach ca. 10 Minuten vollständig gefüllt, wobei der Enddruck dieser Pumpe bei einem 5 μm -Material z.B. 40 bis 60 MPa beträgt. Meist erfolgt noch ein Nachkonditionieren (10–20 Minuten) der Säule bei diesem Druck.

Hydrophile Trennphasen für die Biochromatographie (Abschnitt 4.4) werden meist nur mit Wasser oder Pufferlösungen aufgeschlämmt und bei einem niedrigen Druck (5–50 bar) in die Säule gefüllt.

4.2.2.1.5 Detektoren mit Mikrodurchflussküvette

Als Detektoren dienen hauptsächlich UV- bzw. UV/VIS-Spektralphotometer sowie Refraktometer (RI-Detektoren). Für spezielle Trennungen werden Fluoreszenzspektrometer und elektrochemische Detektoren eingesetzt.

Zur Registrierung der Elutionskurve (Chromatogramm-Peaks) sind in der HPLC möglichst hohe Empfindlichkeiten erforderlich. Bei der UV-Detektion, die für die meisten Analysen angewandt wird, kann die Schichtdicke der Küvette bedingt durch die Zusammenhänge im Lambert-Beer'schen Gesetzes (s. Abschnitt 10.2.6) nicht beliebig klein gewählt werden, wenn ausreichend große Extinktionen (Empfindlichkeiten) für die Probekomponenten gemessen werden sollen. Zur Minimierung der Peakverbreiterung sind jedoch die Volumina der Verbindungs-kapillare zur Trennsäule und das Küvettenvolumen selbst möglichst klein zu halten. In Abbildung 4.14 ist die Konstruktion einer Mikrodurchflussküvette für ein UV-Spektrometer in schematischer Form enthalten.

Diese Mikrodurchflussküvette ist nach der „Z-Form“ konstruiert und weist ein Volumen von ca. 10 µl auf. Der Innendurchmesser der Zulaufkapillare beträgt meist 0,15 mm. Die Ablaufkapillare kann, wenn keine weiteren Detektoren nachgeschaltet werden, einen größeren Querschnitt (ca. 0,5 mm) besitzen. Die optische Weglänge beträgt 1 cm und der verfügbare Querschnitt des Küvettenfensters, auf das die UV-Strahlung trifft, hat eine Fläche von ca. 1 mm².

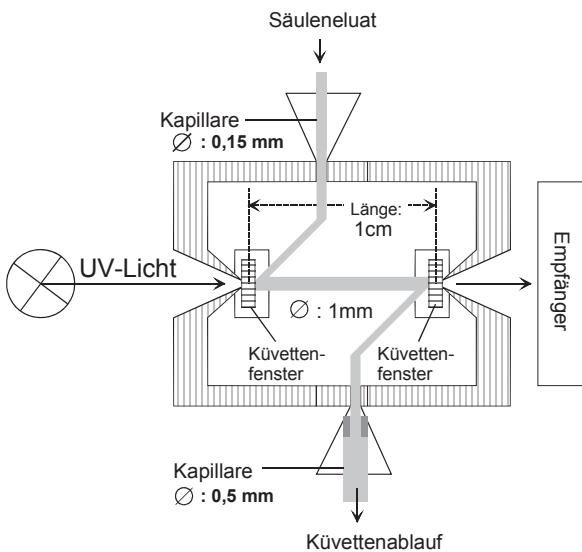


Abb. 4.14 HPLC-Mikrodurchflussküvette

Nach dem Abfluss der mobilen Phase aus der Trennsäule und beim Passieren der Durchflussküvette befindet sie sich wieder unter Normaldruck. Die Küvettenfenster sind abgedichtet und können in der Regel mit Drucken bis maximal 2 und 5 bar belastet werden. Seit einigen Jahren existieren spezielle Küvettenkonstruktionen, die auch den Hochdruckbedingungen standhalten.

4.2.2.2 Praktische Probleme der HPLC-Trennungen

Nachdem die Grundlagen der HPLC erläutert worden und bevor die selektiven stationären Phasen zur Analyse von kleinen Biosubstanzen und Biopolymeren näher vorgestellt werden, stehen einige praktische Probleme von HPLC-Trennungen im Mittelpunkt.

Zuerst wird gezeigt, dass Chromatogramm-Peaks, die zur Totzeit gemeinsam mit den Molekülen der mobilen Phase oder anderer nichtretardierter Verbindungen eluiert werden, in der Regel nicht quantifiziert werden sollten. In Abhängigkeit von der Detektion und Konzentration leisten meist alle Substanzen, die gleichzeitig und überlappend in dieser Durchbruchsfront auftreten, einen bestimmten Beitrag zur Größe des Gesamtpeaks.

Abbildung 4.15 zeigt fünf übereinander gelegte Chromatographie-Läufe, die unter identischen experimentellen Bedingungen entstanden. Zur Trennung diente eine Reversed-Phase-Säule (vgl. Abschnitt 4.3.2) und die Elution erfolgte mit 0,1% Trifluoressigsäure, die sich für eine vollständige Auftrennung von Glutathion (GSH) und γ -Glutamyl-Cystein (γ -EC) als besonders geeignet erwies (siehe auch Abb. 15.38 bis 15.40 im Abschnitt 15.5.2). Die Registrierung der Elutionskurve erfolgte im nahen UV-Bereich bei 210 nm.

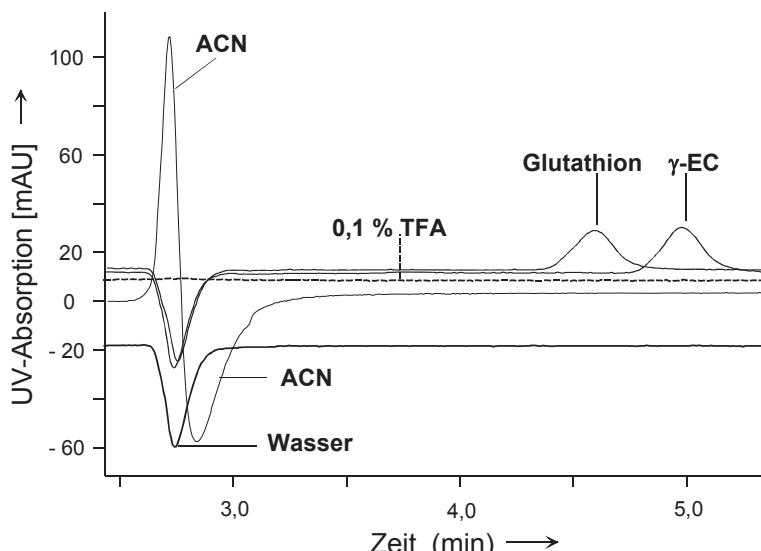


Abb. 4.15 Beiträge von Acetonitril, Wasser und 0,1%-iger TFA während der Detektion bei 210 nm

Nacheinander wurden reines Acetonitril, Wasser, 0,1%-ige Trifluoressigsäure und das in dieser mobilen Phase gelöste Glutathion bzw. γ -EC einzeln auf die Säule appliziert.

Das aufgegebene ACN ($V=20 \mu\text{l}$) ergibt bei 210 nm auf Grund seines relativ hohen Absorptionsvermögens einen positiven Peak. Bevor die Durchflussküvette des UV-Detektors vollständig mit mobiler Phase (0,1% TFA) wieder gefüllt ist, „driftet“ die Elutionskurve kurz in den negativen Absorptionsbereich, was u.a. auf eine verzögerte Gleichgewichtseinstellung zurückgeführt werden kann.

Reines Wasser besitzt gegenüber dem TFA-haltigen wässrigen Eluenten ein geringeres Absorptionsvermögen, d.h., es ist für das UV-Licht transparenter und ergibt einen Peak im negativen Bereich der Durchbruchsfront.

Das Applizieren der mobilen Phase selbst (gestrichelte Linie) führt in der Regel zu keiner Veränderung der Elutionskurve. Dies könnte z.B. nur durch Druckstöße während der Ventilschaltung hervorgerufen werden.

Auch wenn die zu trennenden Substanzen wie GSH oder γ -EC im Eluenten gelöst und appliziert wurden, können zusätzliche Peaks, z.B. durch Verunreinigungen aus der Ursubstanz, auch in der Durchbruchsfront auftreten.

In dieser sollten jedoch, wie eingangs gefordert und in Abbildung 4.16 dargestellt, interessierende Peaks wie Cystein nicht quantifiziert werden. Die Aminosäure wurde in relativ hoher Konzentration appliziert, so dass ein positives Peak-Signal resultiert. Bei geringen Cysteinn Mengen könnten andere in der Durchbruchsfront registrierte Peaks die wahre Fläche oder Höhe des Cysteins drastisch verändern.

Ziel der Chromatographie ist es deshalb, die Selektivität der stationären bzw. mobilen Phase so zu wählen, dass die Substanzen retardiert, getrennt und erst nach der Durchbruchsfront eluiert werden.

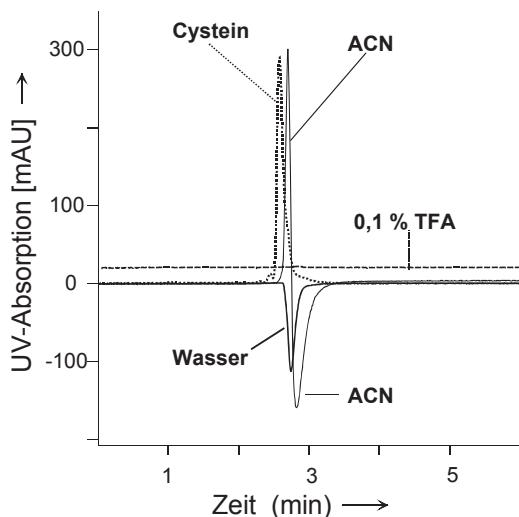


Abb. 4.16 Elution von Cystein in der Durchbruchsfront

Ein weiteres praktisches Problem, was zur Verfälschung von chromatographischen Trennungen führen kann, sind Peakverbreiterungen innerhalb und außerhalb der Säule.

Bereits geringe Totvolumina am Kopf der Trennsäule, die u.a. durch das Nachrutschen der Säulenpackung bei schlecht bzw. mit zu geringem Packungsdruck gefüllten Säulen oder durch Hydrolyseerscheinungen des Silicagels entstehen können, führen zu extremen Peakverbreiterungen und -profiländerungen oder auch zu sogenannten Doppelpeaks.

Die folgenden Chromatogramm-Ausschnitte von drei HPLC-Trennungen sollen diesen Effekt veranschaulichen. Zu Beginn der Trennung A (dünne Linie) von GSH ($t_R = 4,58$ min) und γ -EC ($t_R = 4,98$ min) zeigt die HPLC-Säule ausreichend hohe Auflösungen. Nach ca. 200 Injektionen (B) sind Doppelpeaks entstanden, die auf Veränderungen der Packungsdichte der Säule hinweisen. Derartig unbrauchbar gewordene Trennsäulen können durch Nachfüllen mit stationärer Phase oft wieder regeneriert werden.

Eine Umkehr der Flussrichtung wird für die meisten Säulen, insbesondere in der Biochromatographie, nicht empfohlen. Für die Schonung von Säulen ist ein konstanter Fluss stets in gleicher Richtung günstig und zu bevorzugen.

Wie die Elutionskurve im Beispiel C (dicke Linie) jedoch zeigt, führt ein Richtungswechsel dieser Säule zum Verschwinden der Doppelpeaks, und es resultiert eine chromatographische Auflösung der Peaks wie zu Beginn (A). Die Retentionszeiten haben sich nur geringfügig verändert. Die Trennung wird nach weiteren Injektionen wieder schlechter, wenn z.B. die Säulenpackung erneut nachrutscht. Meist sind das Nachfüllen der Säule, das allerdings sehr fachgerecht erfolgen muss, oder sogar ihr Austausch unvermeidbar.

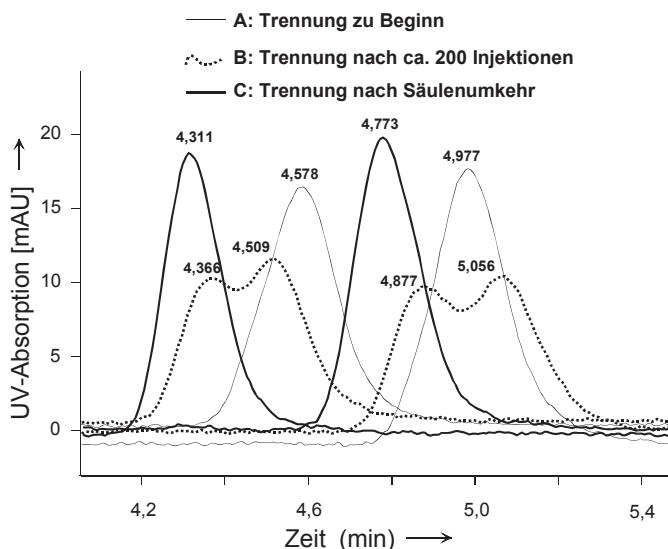


Abb. 4.17 Entstehung von Doppelpeaks durch Nachrutschen der Säulenpackung

Hinweise auf schlecht gepackte Säulen ergeben sich auch, wenn die Chromatogramm-Peaks von ihrer Gaußform abweichen. Bei asymmetrischen Peaks unterscheidet man zwischen *Peak-Tailing* und *Peak-Fronting* (Abbildung 4.18). Aber auch unspezifische Wechselwirkungen der Probemoleküle mit der Oberfläche der stationären Phase können die Ursache für asymmetrische Peakprofile sein. Insbesondere Bandenverbreiterungen durch zu großvolumige Verbindungskapillaren mit der HPLC-Säule können die Peakauflösung dramatisch verschlechtern und bis zum Ausbleiben der Trennung führen.

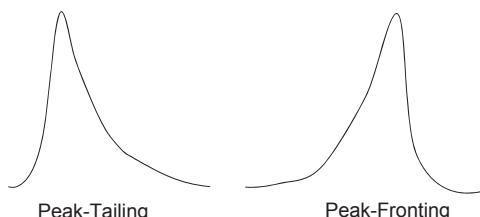


Abb. 4.18 Asymmetrische Peakformen

Die folgenden Versuche wurden so gestaltet, dass das Ende der Trennsäule mit der Detektorzelle einmal durch eine kleinervolumige Kapillare ($V=20\mu\text{l}$) und zum anderen mit einer großen 1-ml-Schleife verbunden wurde. Im ersten Fall erfolgte kaum eine Verschlechterung der Auflösung zwischen GSH (Peak 1) und γ -EC (2), während innerhalb des großen Volumens nach der Säule die zuvor getrennten Peakpfopfen wieder ineinander „liefen“ und als ungewöhnlich breiter Substanzpeak im Chromatogramm (gestrichelte Linie) erscheinen.

Außer diesen Beispielen sind weitere Phänomene und Fehlermöglichkeiten bekannt, die in der einschlägigen Literatur über *Troubleshooting* nachgelesen werden können.

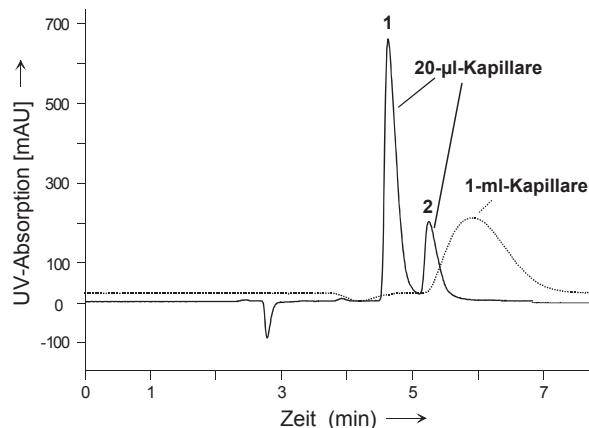


Abb. 4.19 Peakverbreiterung außerhalb der Trennsäule durch externe Volumina

4.3 Trennsysteme – stationäre Phasen

Das Herzstück eines Flüssigchromatographen ist die Trennsäule mit der darin enthaltenen stationären Phase.

Insbesondere die Entwicklung druckstabiler hydrophiler Trennphasen, die nicht denaturierend auf Proteine wirken, haben zu den Fortschritten in der Biochromatographie (s. Abschnitt 4.4) geführt. Aber auch spezielle Polymerphasen für ionische bzw. polare Verbindungen wie organische Säuren oder Kohlenhydrate (s. Abschnitt 4.3) waren für die Erschließung ganz neuer Aufgabengebiete innerhalb der modernen Flüssigchromatographie von entscheidender Bedeutung.

Zu Beginn der HPLC-Entwicklung standen jedoch die Herstellung kleiner und einheitlicher Korngrößen von Adsorbentien und die chemische Modifizierung insbesondere von Silicagelen mit organischen Gruppen im Mittelpunkt. Damit konnte die Selektivität der stationären Phase in einem breiten Bereich variiert werden, woraus auch die überaus erfolgreiche Entwicklung der Reversed-Phase-Chromatographie resultiert. Dies wird an einigen Beispielen in den folgenden Abschnitten demonstriert.

4.3.1 Normalphasenchromatographie

Adsorptionschromatographische Trennungen, die durch eine höhere Polarität der stationären Phase (Adsorbentien) im Vergleich zur mobilen Phase gekennzeichnet sind, stellen die typischste Form einer Normalphasenchromatographie (NPC) dar. Diese Adsorbentien sind durch aktive Zentren auf ihrer Oberfläche charakterisiert. So verfügen Silicagele sphärischer (kugelförmiger) oder irregulärer (gebrochene Partikel) Gestalt über freie Silanolgruppen und Aluminiumoxide besitzen adsorpтивne Eigenschaften auf Grund von Aluminium- und Sauerstoffionen an ihrer Peripherie (Oberfläche). Probemoleküle mit freien Elektronenpaaren, funktionellen Gruppen oder Doppelbindungen können mit diesen Adsorbentien Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und induzierte Dipole sowie π -Komplexbindungen ausbilden. Adsorptionssäulen werden meist mit unpolaren Flüssigkeiten (Hexan, Isooctan) eluiert und kommen außer in der Kohlenwasserstoff-Analytik relativ wenig zum Einsatz.

4.3.2 Chemisch modifizierte stationäre Phasen

Die Oberflächensilanolgruppen von Silicagelen können mit unterschiedlichen polaren oder hydrophoben funktionellen Gruppen chemisch modifiziert werden. Physikalisch modifizierte Silicagele, die z.B. mit Polyethylenglykolen imprägniert werden, sind weniger stabil und können im Verlauf ihrer Elution „ausbluten“.

In den Abbildungen 4.20 und 4.21 sind Möglichkeiten der chemischen Modifizierung von Silicagelen dargestellt. Die durch Veresterung mit Alkoholen (1.) oder durch Umsetzung mit Thionylchlorid und Aminen (2.) synthetisierten Trennphasen besitzen jedoch nur geringe Langzeitstabilitäten und werden kaum noch eingesetzt.

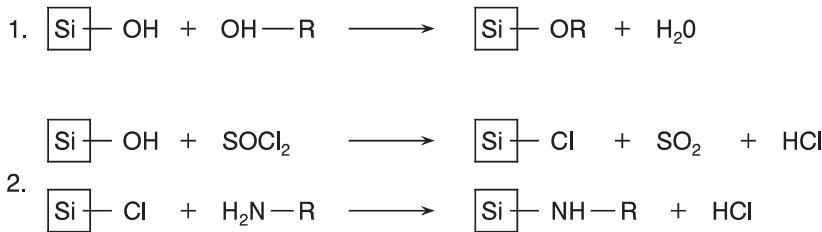


Abb. 4.20 Modifizierung von Silicagel
(1. Veresterung mit Alkohol, 2. Umsetzung mit Thionylchlorid/Aminen)

Eine besonders geeignete Methode zur Funktionalisierung der Silanolgruppen des Silicagels ist die Silylierung. Am Anfang wurden vorrangig alkylsubstituierte Silane eingesetzt. Der Oberflächencharakter der stationären Phase wird dadurch überwiegend hydrophob.

Die chemischen Modifizierungen der Silanolgruppen erfolgen meist mit mono-, bi- oder trifunktionellen Reagenzien, wobei in der Regel Chlorsilane verwendet werden (vgl. auch Abschnitt 3.2.8.4).

Am stabilsten sind Si-O-Si-C-Verknüpfungen, wie im Beispiel der ersten Reaktionsgleichung in Abbildung 4.21 dargestellt ist.

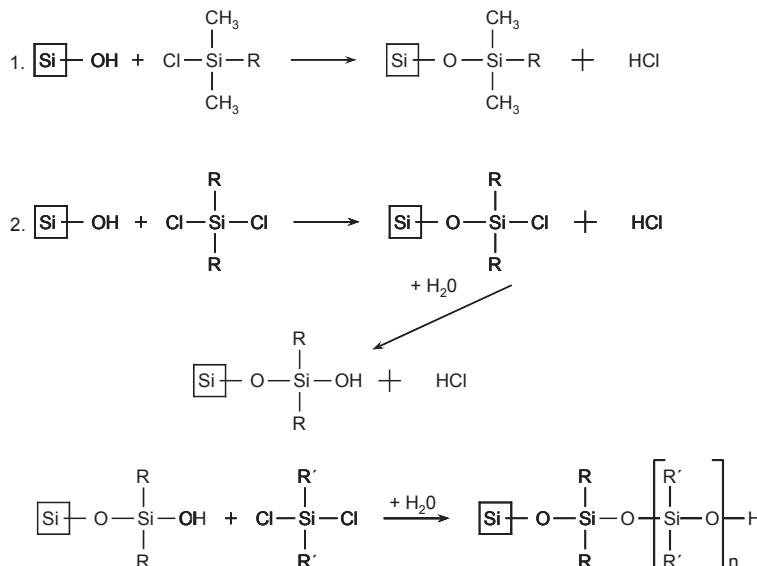


Abb. 4.21 Modifizierung von Silicagel mit Chlorsilanen

Mit Hilfe der Reaktionen im zweiten Teil des Bildes ergeben sich hydrophobe Polymerstrukturen, die als Polysiloxane bezeichnet werden. Die Dicke der Polymerschicht auf der Silicageloberfläche kann fast beliebig variiert werden. Dicke Schichten schützen den „Silicagelunterbau“ vor irreversiblen Adsorptionen und führen zu einer verbesserten pH-Beständigkeit der RP-Phasen.

Diese hydrophoben Umkehrphasen (Reversed-Phase-Materialien, C8- oder C18-Trennphasen) werden mit polaren mobilen Phasen (Methanol- oder Acetonitril/Wasser-Gemische) eluiert. Günstig sind oft isokratische Elutionen, bei denen die Eluentzusammensetzung konstant bleibt. Allerdings ist die Peakauflösung oft unzureichend und deshalb ist in diesem Fall die Gradientenelution anzuwenden. Die mobile Phase enthält bei Beginn einen bestimmten Wasseranteil (ca. 20 ... 50%), der auch mit Pufferionen angereichert sein kann (s. Pharmaka-Analytik in Kapitel 15.1), und einen überwiegend organischen Anteil (ACN, MeOH). Dieser wird am Ende der Gradientenelution i.d.R. auf 100% erhöht, wodurch auch die stark hydrophoben Analyte von der RP-Säule eliminiert werden. Nach Einstellung der Ausgangsbedingungen muss die Säule gründlich equilibriert werden.

Zu beachten ist bei der RP-Chromatographie, dass etwa nur die Hälfte der Oberflächensilanolgruppen (ca. $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) mit den Alkylgruppen (C18) aus sterischen Gründen besetzt werden, so dass irreversible Adsorptionen an den nicht modifizierten polaren Gruppen auftreten können. Die weitestgehende Verringerung der Silanolgruppen erfolgt durch Substitution mit Trimethylchlorsilan (TMCS) oder Hexamethyldisilazan (HMDS). Diese nachträgliche Modifizierung wird als „*endcapping*“ bezeichnet. Auf der Basis verschiedener bzw. unterschiedlich bezeichneter Silicagelen (LiChrosorb, Silasorb, Nucleosil, Spherisorb, Zorbax, Hypersil u.a.) finden diese stationären Phasen als RP-Materialien die breiteste Anwendung in der HPLC kleiner Moleküle. Durch Silylierung des Silicagels mit Chlorsilanen polarer Struktur werden auch (polare) chemisch gebundene Trennmaterialien erhalten, die als Amino-, Diol- oder Nitrilphasen bezeichnet werden. Diese stationären Phasen besitzen gegenüber unmodifizierten Silicagelen meist eine höhere Selektivität und werden z.B. bevorzugt in der Kohlenhydratanalytik eingesetzt. Tabelle 4.2 gibt einen allgemeinen Überblick zu den chemisch modifizierten Silicagelen.

Tabelle 4.2 Funktionelle Gruppen chemisch modifizierter Silicagelen

Octadecyl (ODS, C18)	- $(\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$
Octyl	- $(\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$
Hexyl	- $(\text{CH}_2)_5 - \text{CH}_3$
Trimethyl	- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$
Phenyl	- C_6H_5
Dimethylamino	- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Aminopropyl	- $(\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$
Nitro	- NO_2
Nitril	- CN
Alkylnitril	- $(\text{CH}_2)_n - \text{CN}$
Hydroxyl (Diol)	- $\text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2(\text{OH})$

4.3.4 Chirale Trennsysteme

Chromatographische Trennsysteme werden als chiral bezeichnet, wenn sie Moleküle mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen besitzen. Mit Hilfe von chiralen Trennsystemen können Enantiomere bzw. Spiegelbildisomere (Abbildung 2.10 in Abschnitt 2.1.1.3) von biologisch und pharmakologisch aktiven Substanzen getrennt werden. Insbesondere synthetisierte Pharmaka liegen als sogenannte racemische Gemische vor, deren Enantiomere ganz unterschiedliche biologische und physiologische Eigenschaften besitzen können. Prädestiniertes Beispiel dafür ist das Thalidomid, das unter der Bezeichnung *Contergan* tragische Bekanntheit erhalten hat. Der Wirkstoff Thalidomid ist eine chirale Verbindung, die in Form des racemischen Gemisches der beiden Enantiomeren als Schlaf- und Beruhigungsmittel Ende der 50-er Jahre auf den Markt kam. Zunächst nahm man an, dass die Fehlbildungen durch das (*S*)-Enantiomere verursacht werden und das (*R*)-Enantiomere die gewünschte Schlafwirkung hervorruft. Da jedoch die Thalidomid-Enantiomeren im menschlichen Körper racemisieren, treten sowohl beruhigende als auch teratogene Wirkung auf. Demzufolge hätte auch die Gabe eines reinen Thalidomid-Enantiomers die *Contergan*-Katastrophe nicht verhindern können.

Enantioselektive Trennungen basieren auf verschiedenen Interaktionen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-, Van-der-Waals-, π - π -Wechselwirkungen und Einschlussmechanismen. Es sollten mindestens drei unterschiedliche Bindungen zwischen der chiralen Phase und einem der Enantiomere möglich sein, die seine Stereoselektivität signifikant beeinflussen können (3-Punkt-Kontakttheorie). Man unterscheidet zwischen Trennungen mit chiralen stationären oder chiralen mobilen Phasen sowie Trennungen von Enantiomeren, die mit chiralen Reagenzien derivatisiert wurden.

Derivatisierungsreaktionen der Enantiomere mit chiralen Substanzen führen zu leicht trennbaren Diastereomeren. Dies sind Substanzen, die mehr als ein chirales Zentrum besitzen. Beide Diastereomere sind dann keine Spiegelbildisomeren mehr. Sie verfügen über unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften und können an normalen RP-Säulen getrennt werden. Die Derivatisierungsreagenzien sind kostenintensiv, da sie nur in hochreiner optischer Form einsetzbar sind.

Durch den Zusatz einer chiralen Verbindung zur mobilen Phase werden mit den Enantiomeren diastereomere Komplexe ausgebildet, die in den chromatographischen Trennsystemen durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen sowohl innerhalb der mobilen als auch mit der stationären Phase retardiert und somit getrennt werden können.

Chirale stationäre Phasen (CSP: *chiral stationary phase*) enthalten in den funktionellen Gruppen, die an Trägermaterialien wie Silicagel ionisch oder kovalent gebunden sind, ein (Abbildung 4.22) oder auch mehrere asymmetrische C-Atome (C*). Derartige stationäre Phasen wurden zuerst von Pirkle entwickelt und werden heute nach ihm benannt.

Das an Silicagel gekoppelte 3,5-DNB-Phenylglycin ist ein π -Elektronen-Akzeptor. Die enantioselektiven Wechselwirkungen erfolgen bei diesem chiralen Molekül über π -Elektronen und Wasserstoffbrücken.

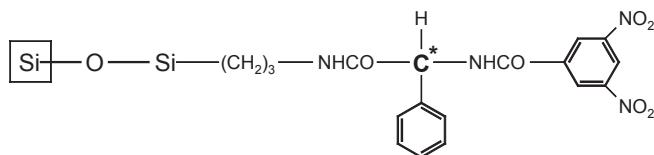


Abb. 4.22 PIRKLE-Phase, 3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin

Von besonderer Bedeutung sind Trennsysteme mit chiralen Kavitäten, die unter der Bezeichnung Cyclodextrine (CD) bekannt sind. Man unterscheidet zwischen α -, β - und γ -Cyclodextrinen, die aus 6, 7 oder 8 Glucosidbausteinen bestehen. Die Glucoseeinheiten sind durch glycosidische α -1,4-Bindungen verknüpft (s. Abschnitt 2.3), wobei das β -Cyclodextrin der bekannteste Vertreter ist.

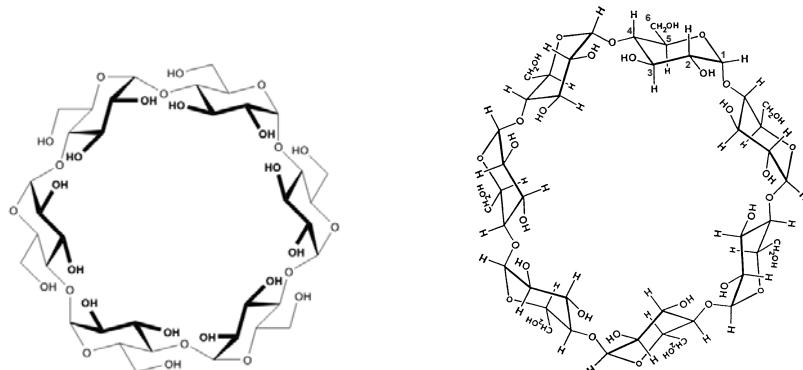


Abb. 4.23 Strukturen α -Cyclodextrin (links) und β -Cyclodextrin (rechts)

Die Kohlenstoffatome der Glucosemoleküle sind in den Innenraum der Cyclodextrine gerichtet, so dass das Innere dieses „Käfigs“ hydrophob ist. Die Hydroxylgruppen sind dagegen an der Peripherie dieses Cyclodextrin-Kegels angeordnet. Die hydrophoben Gruppen eines Analyten bzw. Enantiomers können in den Kegel eindringen und Einschluskomplexe (Wirt-Gast-Komplexe) ausbilden. Dabei führen die Wechselwirkungen zwischen den chiralen Zentren der Enantiomeren und den hydrophilen Zentren am Cyclodextrinrand zur chiralen Erkennung und damit zur Trennung dieser Moleküle.

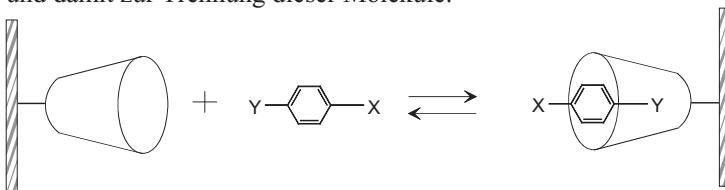


Abb. 4.24 Prinzip der chiralen Trennung an Cyclodextrinen

4.4 Neue Entwicklungen in der Flüssigchromatographie

Neue Entwicklungen in der Flüssigchromatographie zielen vor allem auf schnelle und effiziente chromatographische Trennungen ab. Zeitgewinn erhöht die Wirtschaftlichkeit eines analytischen Labors, insbesondere, wenn täglich hohe Probenzahlen abzuarbeiten sind. Dies betrifft vor allem den Pharma- und Umweltbereich oder auch Proben aus der Lebensmittelüberwachung, der Qualitätskontrolle und der forensischen Toxikologie.

Schnelle chromatographische Trennungen werden mit kleinen Partikeln und kurzen Säulen erzielt. In der „klassischen“ HPLC wurden die Teilchengrößen der stationären Phasen von anfangs 10 µm (Säulenlänge: 25 cm), dann auf 5 µm (SL: 15 cm) und schließlich auf 3 µm (SL: 5 bzw. 3 cm) reduziert. Die Säulenvordrucke lagen bei den kleineren Teilchen meist nicht über 100 bar. Die Analysenzeiten betragen i.d.R. unter 30 Minuten – aber meist über 10 Minuten.

In Abbildung 4.25 ist die systematische Entwicklung bzw. Herstellung zu immer kleineren Teilchen innerhalb der letzten Jahrzehnte zusammengefasst.

Neben irregulären (gebrochenen) Partikeln, die in der klassischen Festphasenextraktion Verwendung finden, geht der Trend in der heutigen Flüssigchromatographie in Richtung sphärisches (kugelförmiges) Material. Poröse Partikel hingegen sind die Basis für SEC-Trennungen und für RAM-Separationen (s. 3.3.10).

Kurze HPLC-Säulen (50 mm x 3 mm i.D.) stellten schon deutliche Verbesserungen hinsichtlich Trennzeit und Trenneffizienz gegenüber der HPLC in größerer Dimension dar. Aber auch die Einsparung von (organischen) Eluenten und das Erzielen höherer Sensitivitäten für die Analyte zeigen die Fortschritte.

Diese werden durch die Einführung der ultra fast HPLC noch viel deutlicher und sollen im Folgenden näher diskutiert werden. Weiterhin stellen die Core Shell Materialien und die HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) bemerkenswerte Weiterentwicklungen innerhalb der HPLC dar.

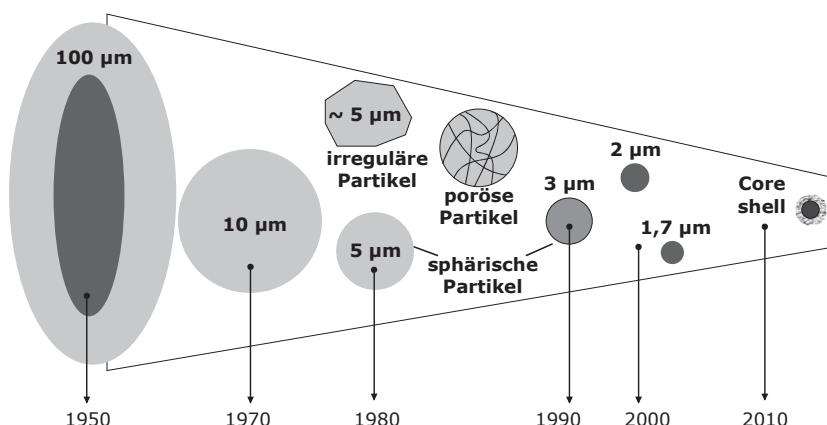


Abb. 4.25 Entwicklung zu kleineren Teilchen in den letzten Jahrzehnten

4.4.1 Ultra fast HPLC (UHPLC)

Die Bezeichnung UHPLC ist ein Begriff, der für die schnelle und hocheffiziente Flüssigchromatographie geprägt wurde und dieser soll auch in diesem Kapitel die dominierende Bezeichnung sein. Verschiedene HPLC-Firmen und Autoren verwenden andere Abkürzungen und Begriffe (UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography, RRLC: Rapid Resolution Liquid Chromatography, RSLC: Rapid Separation Liquid Chromatography, UFC: Ultra Fast Liquid Chromatography).

In der Ultra fast HPLC werden Säulen mit Partikelgrößen um 2 µm und z.T. noch kleiner (1,3 µm, 1,7 µm) eingesetzt, die den Säulenvordruck auf mehrere Hundert Bar erhöhen. Die Säulenlängen liegen im cm-Bereich und die Analysenzeiten können sogar nur Sekunden betragen; meist sind es nur wenige Minuten.

Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Anlagen sind bei UHPLC-Trennungen höhere apparative Anforderungen an die einzelnen Baugruppen zu stellen. Hauptgründe sind vor allem die höheren Drücke, die durch die kleineren Säulenpartikel (um 2 µm und kleiner) resultieren und durch die Realisierung kleiner Totvolumina außerhalb der Trennsäule. Die notwendigen Änderungen für das UHPLC-Equipment sollen im Folgenden erläutert werden. Dafür ist in der Abbildung 4.26 eine entsprechende Apparatur zur Orientierung schematisch dargestellt.

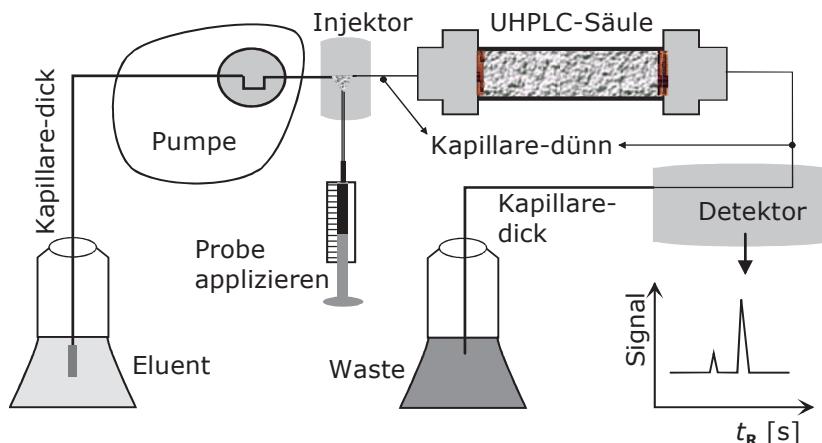


Abb. 4.26 Schematischer Aufbau einer UHPLC-Apparatur

4.4.1.1 Pumpen in der UHPLC

Kommerzielle analytische HPLC-Pumpen können meist bis zu einem Druck von 400 bar betrieben werden. Die Flussraten betragen um 1 ml/min; seltener werden 3 ml/min und mehr eingestellt. Die Pumpen sollen möglichst pulsationsarm oder besser pulsationsfrei die Eluenten fördern. In der Biochromatographie (BioLC, FPLC) werden inerte Materialien für die Pumpen verwendet, um schonende Proteintrennungen und -reinigungen zu garantieren.

Zur Füllung normaler HPLC-Säulen muss die Pumpenanlage jedoch bis zu 800 bar und mehr ausgelegt sein.

Derartig hohe Drucke (1000 bar bzw. 15.000 Psi und höher) sind nun Voraussetzung, um schnelle flüssigchromatografische in der UHPLC zu erzielen. Pumpenventile müssen dabei exakt und reproduzierbar arbeiten; alle Verschraubungen, Verbindungen und Kolbenführungen müssen eine hohe Dichtheit und Robustheit aufweisen.

Die Viskosität der Eluenten sollte eher gering sein, damit der Druck bei hohen Flussraten nicht übermäßig ansteigt. Andererseits sind auch Eluenten mit komplexeren Eigenschaften (saurer oder basischer pH-Wert, höhere Ionenstärken) für viele Applikationen essentiell und nicht auszuschließen.

Neben isokratischer Arbeitsweise müssen bei derart hohen Drucken auch reproduzierbare Gradientenelutionen durchführbar sein.

4.4.1.2 Injektoren in der UHPLC

Undenkbar sind sogenannte Septuminjektoren, die zu Beginn der klassischen HPLC-Entwicklung ausprobiert wurden und ohne jeglichen Erfolg blieben. Dagegen erfüllen die mit hoher Präzision hergestellten Rheodyne-Ventile schon sehr gut die Forderung nach hoher Druckstabilität und Reproduzierbarkeit bei den zahlreichen Schaltvorgängen. Permanente Injektionen aufgrund der sehr kurzen Analysenzeiten in der ultra fast HPLC können schnell zu Undichtigkeiten führen. Die betrifft natürlich sowohl manuelle Applikationen als auch automatisierte Injektionsvorgänge mittels Probengeber.

Die Probenaufgabe ist somit als kritisch einzuschätzen. Der Injektionsprozess sollte auch weitestgehend pulsfrei erfolgen. Zu beachten ist auch, dass im Vergleich zur klassischen HPLC oft noch sehr kleinere Probevolumina reproduzierbar appliziert werden müssen.

4.4.1.3 Säulen und Trennphasen in der UHPLC

Auch das Herzstück einer UHPLC-Apparatur ist die Trennsäule. Seine hohe Effizienz basiert auf der Kleinheit seiner Partikel um 2 µm. Allein nur dieses Kriterium ist nicht ausreichend – die stationäre Phase muss eine hohe Einheitlichkeit in der Teilchengröße aufweisen und soll eine absolut sphärische (kugelförmige) Gestalt besitzen. Die Partikel müssen außerdem nach dem Füllvorgang (Druckfiltration bei ca. 1000 bar oder mehr) als dichteste Kugelpackung in der Säule angeordnet sein. Nur in diesem Fall sind ganz minimale Peakverbreiterungen in der Trennsäule noch vorhanden.

In Abbildung 4.27 ist dieses Phänomen schematisch dargestellt. In der oberen Ansicht enthält die Trennsäule Partikel, die in ihrer Größe deutlich voneinander abweichen. Dadurch entstehen größere Hohlräume in der Säule, in denen sich der Analyt stärker ausbreiten bzw. verdünnen kann. Somit werden auch unterschiedlich lange Wege der einzelnen „Substanz-Propfen“ zurückgelegt. Dadurch kommt es zur Peakverbreiterung (oben rechts).

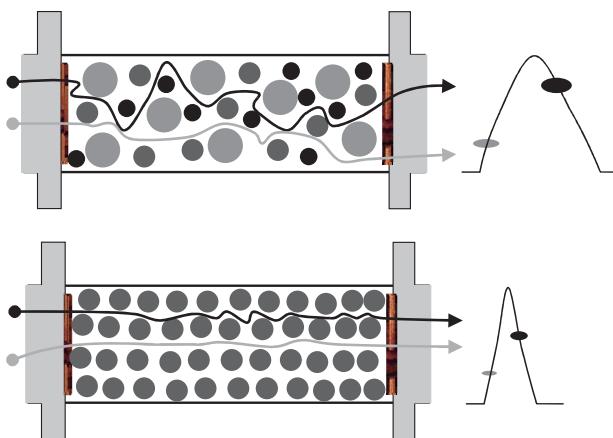


Abb. 4.27 Peakverbreiterung in der Trennsäule (oben: unterschiedlich große Partikel; unten: relativ einheitliche Teilchengrößen)

Anders ist die Situation, wenn die Partikel in einheitlicher Größe und als dichteste Kugelpackung in der Säule angeordnet sind. Der Analyt passiert das Säulenmaterial ohne größere Umwege und die einzelnen „Substanz-Pfropfen“ erreichen kurz hintereinander den Säulenausgang. Resultat der Peakregistrierung sind schmale Profile (Abb. 4.27, unten rechts) und damit nur geringe Banden- bzw. Peakverbreiterungen innerhalb der Trennsäule.

Derartige Trennphänomene gehen auch aus der Van-Deemter-Gleichung und den Van-Deemter-Kurven (H-u-Kurven) hervor (s. Gleichung 4.2, Abb. 4.4 und 4.5). Bei der UHPLC werden auch bei hohen Flussraten (linearen Strömungsgeschwindigkeiten) niedrige theoretische Trennstufenhöhen erzielt. Somit sind effiziente Trennungen auch in sehr kurzen Analysenzeiten möglich (Abb. 4.28).

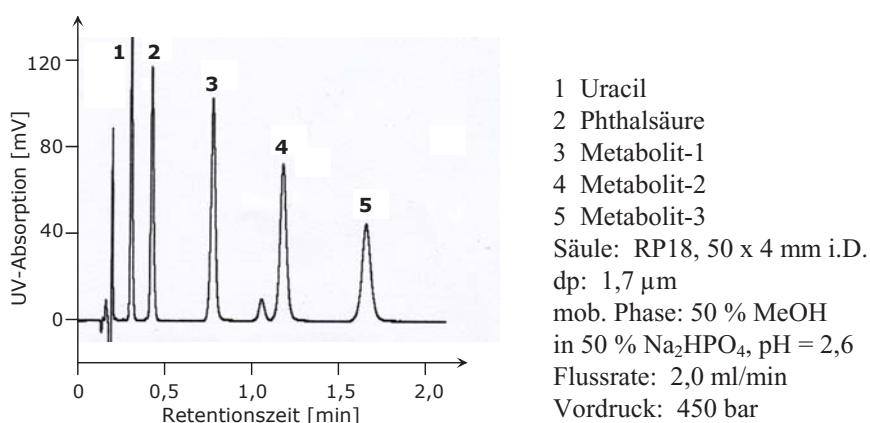


Abb. 4.28 UHPLC-Chromatogramm (schematisch)

Vergleicht man nun die H-u-Kurven von Säulen, die mit Partikeln um $1,7 \mu\text{m}$ gefüllt sind, mit Säulen größerer Teilchendimension (Abb. 4.29), so werden die Trennvorteile bei den sehr kleinen Partikeln signifikant deutlich.

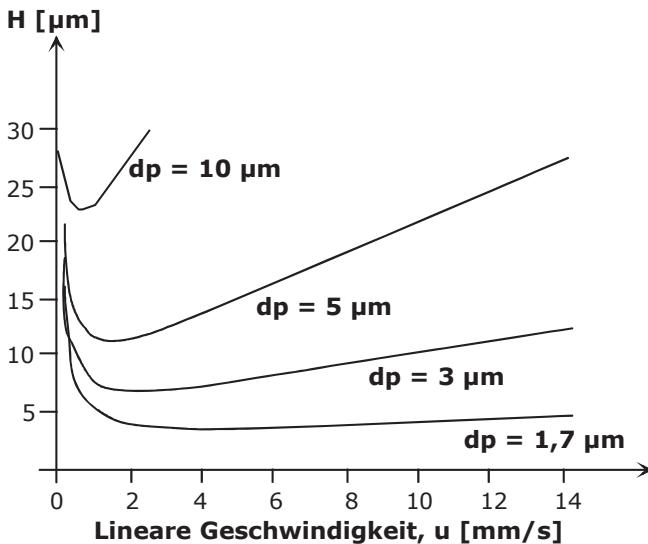


Abb. 4.29 H-u-Kurven unterschiedlich großer Partikel im Vergleich

Demgegenüber resultieren beim Chromatographieren mit sehr kleinen Partikeln auch gewisse Nachteile, die aber apparativ weitestgehend gelöst sind. Der Säulenvordruck steigt mit zunehmender Trenngeschwindigkeit signifikant an und kann bis ca. 1000 bar betragen.

In Abbildung 4.30 sind Partikelgrößen und Flussraten im Vergleich zum Druckanstieg in der Säule aufgezeigt. Es wurden Trennsäulen mit 100 mm Länge mit inneren Durchmessern von 2,0 mm eingesetzt.

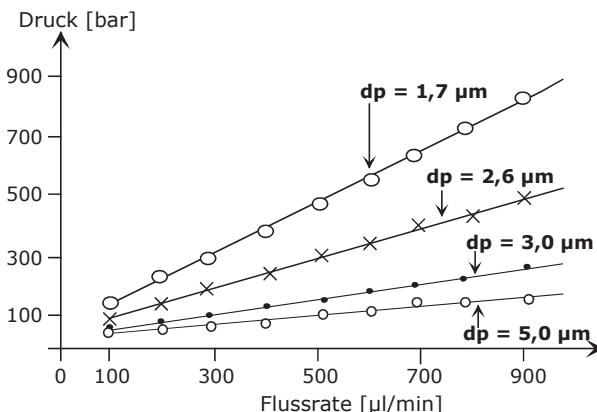


Abb. 4.30 Druckanstieg in Abhängigkeit der Partikelgröße und Flussrate

Für die Ultra Fast HPLC erfolgte die Anwendung ganz spezieller Technologien, um sehr druckstabile und sphärische Partikel < 2 µm zu synthetisieren. So wurden Partikel auf der Basis der BEH-Technologie (Ethylene Bridged Hybrid) für die UHPLC verfügbar (Abbildung 4.31). Dazu gehören Trennphasen mit geradkettigen Alkylgruppen (A/B: UPLC BEH C18 und C8), Materialien mit integrierten Phenylgruppen (C: UPLC BEH Phenyl) oder Phasen, in die polare Gruppen eingebettet sind (D: UPLC BEH Shield RP 18). Jede Trennsäulentechologie ist charakterisiert durch verschiedene Kombinationen zwischen Hydrophobizität, Silanolaktivität, hydrolytischer Stabilität und chemischer Wechselwirkungen mit den Analyten.

Weitere Fortschritte in der Entwicklung geeigneter Trennmaterialien für die UHPLC sind zu verzeichnen. Diese beinhalten die CSH-Partikel-Technologie (Charged Surface Hybrid) oder die HSS-Partikel-Technologie (High Strength Silica). Mit diesen robusten Materialien werden sehr schnelle Trennungen mit ausgezeichneten sehr schmalen Peakprofilen erzielt.

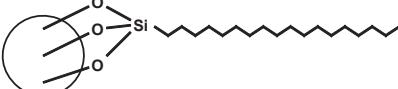
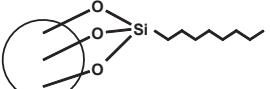
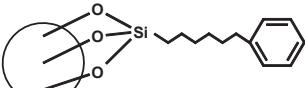
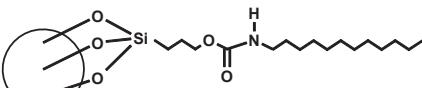
	A: ACQUITY UPLC BEH C18
	B: ACQUITY UPLC BEH C8
	C: ACQUITY UPLC BEH Phenyl
	D: ACQUITY UPLC BEH Shield RP 18

Abb. 4.31 Trennphasen für die UHPLC

4.4.1.4 Detektoren in der UHPLC

Die Detektionsprinzipien der klassischen HPLC sind auch die Grundlage für die Detektoren in der UHPLC. Dominierend sind UV/VIS-Detektoren, der DAD (*Diode Array Detector*) und Kopplungen mit der Massenspektrometrie (LC-MS).

Bei den spektralphotometrischen Detektoren sind vor allem nur geringe externe Totvolumina (Totvolumina außerhalb der Trennsäule) zu realisieren.

Abbildung 4.32 zeigt schematisch einen derartigen Aufbau. Die Kapillare der Quarzglasküvette hat ein Volumen von ca. $13 \mu\text{l}$ und das Volumen der Zulaufkapillare von der Säule beträgt um $19 \mu\text{l}$.

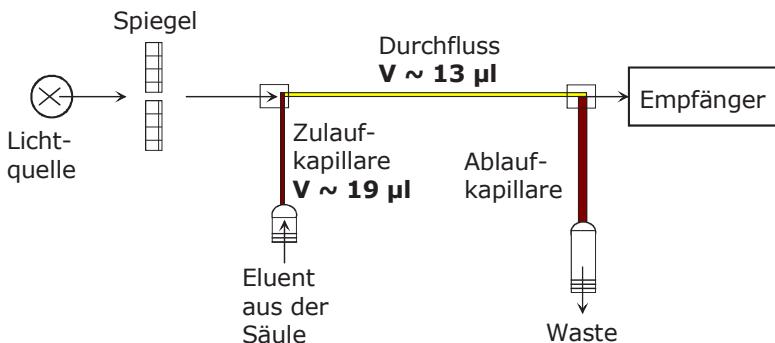


Abb. 4.32 Detektion in der UHPLC

4.4.2 Core Shell Materialien

Core-Shell-Partikel (*core*: Kern; *shell*: Schale, Hülle) bestehen aus einem festen Kern (Siliziumdioxid) und einer porösen Hülle (Abbildung 4.33). Mit Hilfe einer Sol-Gel-Prozesstechnik erfolgt das Aufbringen einer homogenen, porösen und fest anhaftenden Hülle auf dem Siliziumdioxid-Kern.

Der Kern ist inert und den Analyten ist es nicht möglich, beim Elutionsprozess diesen festen Core zu durchdringen. Sie können nur relativ kurzzeitig in den Bereich der porösen Hülle eindringen und „prallen“ vom Kern wieder aus dem Core-Shell-Partikel heraus. Somit resultieren sehr geringe Diffusionswege, die nur eine geringe Peakverbreiterung (vgl. Van-Deemter-Gleichung) der Analyte innerhalb dieser Trennsäulen zulassen.

Anders verläuft die Diffusion von Analyten in Säulen, die mit total porösen Partikeln gefüllt sind (Abbildung 4.33, rechts). Auf Grund der Möglichkeit, das gesamte Teilchen komplett zu durchdringen, resultieren lange Diffusionswege für die Analyte und damit eine größere Verbreiterung der Peaks in der Trennsäule.

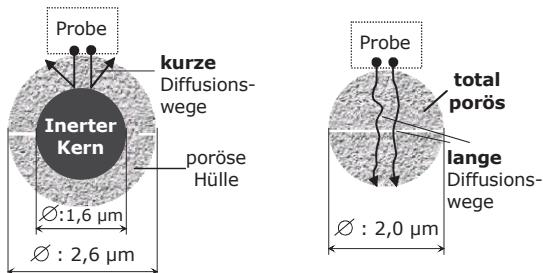


Abb. 4.33 Core Shell Material für die schnelle HPLC

4.4.3 Monolithische Trennsäulen

Monolithische (monolithisch: „ein Objekt aus einem Stück“) Trennsäulen kommen ca. seit dem Jahr 2000 in der modernen Flüssigchromatografie zum Einsatz. Die Säulen sind nicht mit einzelnen Partikeln gefüllt. Sie enthalten eine Art porösen „Silicagel-Stab“ (Abbildung 4.34). Dieser durchzieht kompakt das Innere der Säule und weist zwei verschiedene Porensysteme auf.

Große Makroporen dienen dem schnellen Durchfluss der Proben. Die Großporigkeit verleiht den Säulen eine hohe Permeabilität, damit geringe Säulenvordrucke und schnelle Trennungen erzielt werden.

Kleine Mesoporen im Silicagel-Gerüst vergrößern die spezifische Oberfläche und dienen der Verbesserung des Trennprozesses bei höheren Flussraten.



Abb. 4.34 Monolithische Trennsäule auf der Basis poröser Silicagele

4.4.4 Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)

Hydrophilic interaction liquid chromatography ist eine neue Trenntechnik (insbesondere für polare Substanzen), die auf dem Einsatz polarer stationärer Phasen und organisch-wässriger mobiler Phasen basiert. Ein minimaler Wasseranteil (um 2%) ist essentiell, um eine permanente Wasserschicht zwischen der Adsorptionsfläche der stationären Phase und dem organischen Anteil der mobilen Phase (des Eluenten) zu erzeugen (Abbildung 4.35).

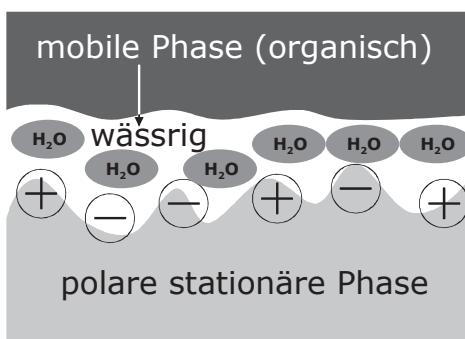


Abb. 4.35 Schematische Darstellung der Verteilungschromatographie bei HILIC

Der Trennmechanismus von HILIC ist somit eine Art Verteilungschromatographie. Polare Analyte werden stärker retardiert als Analyte mit geringerem hydrophilen Charakter. Durch weitere geringe Erhöhung des Wasseranteils im Eluenten erfolgt eine Verkürzung der Retentionszeit polarer Analyte. Somit ist HILIC eine Art Pendant zur Reversed-Phase-LC.

In der Abbildung 4.36 ist eine Auswahl einzelner Strukturen der bei HILIC verwendeten stationären Phasen aufgelistet.

Amino-, Nitril- und Diolphasen sind bereits länger aus der Normalphasenchromatographie bekannt. Aminphasen mit Acetonitril/Wasser-Gemischen (75:25 V/V) als Eluent wurden bereits Ende der 1975-Jahre für die Trennung von Zuckern eingesetzt.

Auch Mixe-Mode-Phasen finden Anwendung in der Hydrophilic interaction liquid chromatography (Abb. 4.37).

	Zwitterionische Sulfobetain-Phase (ZIC-HILIC)
	Aminophase
	Nitrilphase
	Diolphase
	Polyethyleneglycolphase (PEG auf Silicagel)
	Alkylamidphase

Abb. 4.36 Stationäre Phasen für HILIC (Teil A)

		Mixed-Mode Reversed phase/ Anion exchange
--	--	---

Abb. 4.37 Stationäre Phasen für HILIC (Teil B)

4.5 Literatur

- Meyer VR (1990) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Otto Salle Verlag, Frankfurt
- Meyer VR (1996) Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, Hüthig Verlag Heidelberg
- Anspach B, Gierlich HU, Unger KK (1988) J Chromatogr 443:45
- Engelhardt H (1986) Practice of high performance liquid chromatography, Springer-Verlag, Berlin
- Gey MH (1988) Acta Biotechnol 8:197
- Gey MH, Rietzschel A, Nattermüller W (1991) Acta Biotechnol 11:105
- Gey MH, Unger KK, Battermann G (1996) Fresenius J Anal Chem 356:339
- Gey MH, Unger KK (1996) Fresenius J Anal Chem 356:488
- Kabzinski AKM, Takagi T (1995) Biomed Chromatogr 9:123
- Kabzinski AKM (1997) J Chromatogr 766:121
- Kirkland JJ (1975) Chromatographia 8:661
- Knox JH, Saleem M (1969) J Chromatog Sci 7:614
- Regnier FE (1991) Nature 350:634
- Pirkle WH, Pochapsky TC (1989) Chem Rev 89:347
- Schwedt G (1995) Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Snyder LR, Kirkland JJ (1979) Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons New York
- Turkelson VT, Richards H (1978) Anal Chem 50:1420
- Tswett MS (1906) Ber dtsch bot Ges 24:385
- Vonk N, Baars BGJ, Schaller H (1990) Troubleshooting in der HPLC, Birkhäuser Verlag, Basel
- Weiß J (1991) Ionenchromatographie, VCH-Verlag Weinheim

- Eppert GJ (1996) Flüssigchromatographie, Vieweg Verlag Braunschweig/Wiesbaden
- Otto M et al. (2004) Analytical Chemistry, Wiley-VCH
- Gey MH (2006) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag Berlin
- Kuss H-J, Kromidas S (2009) Quantification in LC and GC, Wiley-VCH
- Lindsay S (1992) Einführung in die HPLC, Vieweg Verlag Braunschweig
- Wintermeyer U (1989) Die Wurzeln der Chromatographie, GIT Verlag
- Latscha HP, Klein HA (1995) Analytische Chemie, Springer Verlag Berlin
- Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag
- Xu QA (2013) Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Application, John Wiley & Sons

Die Chromatographie trennt Substanzen
und
verbindet Menschen !

Rudolf Kaiser

5 Chromatographie-2: Ionen vs. Biomoleküle

5.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Diese beiden Substanzklassen wurden bewusst in diesem Kapitel zusammengelegt, obwohl ein Protein und ein organisches oder anorganisches Ion gravierend andere Eigenschaften besitzen und ganz andere chromatographische Trennsysteme erfordern. Somit sollen die Unterschiede signifikanter gegenübergestellt werden, ohne gewisse Gemeinsamkeiten zu vernachlässigen.

Proteine sind hochmolekulare Eiweiße, die aus einzelnen Aminosäuren bestehen und eine knäuelartige (räumliche) Struktur besitzen. Im nativen Zustand weisen Proteine bzw. Enzyme eine biologische Aktivität auf, die sie durch Denaturierung (Hitze, Organika, stark hydrophobe Interaktionen u.a.) verlieren können.

Für Trenn- und Reinigungsprozesse dieser Species sind also physiologische Bedingungen zu schaffen und konstant zu halten. Als mobile Phasen in der Chromatographie sind wässrige Pufferlösungen einzusetzen, die eine definierte Ionenstärke und einen für das Protein geeigneten pH-Wert aufweisen (z.B. 50 mM Phosphatpuffer, pH = 7,5). Die stationäre Phase sollte nicht (zu) hydrophob sein, sondern eher lipophile Eigenschaften besitzen. Gut geeignet sind druckstabile Polymere auf Kohlenhydrat-Basis. Auch irreversible Adsorptionsphänomene an den Trennphasen müssen vermieden werden. Auf Grund der strukturellen Vielfalt der Aminosäuren im Biomolekül, sind mehrere verschiedene ionische oder auch biospezifische Wechselwirkungen für den Trennprozess nutzbar (Kapitel 5.3 ff.).

Für organische und anorganische Ionen kommen robuste stationäre Phasen z.B. aus Styren-Divinylbenzen zum Einsatz, deren Grundgerüst hydrophob ist und die auch mit stärkeren Laugen oder Säuren eluiert werden können. Hier spielen Denaturierungen natürlich keine Rolle – vor allem gute Löslichkeit der Analyte und signifikante (meist ionische) Wechselwirkungen sind für die Auftrennung der Ionen zu realisieren. Hauptsächlich An- und Kationenaustauscher mit pH-Stabilitäten zwischen 1(2) und 12(13) decken einen Großteil der Ionentrennungen ab. Wichtig ist auch die Kapazität eines Ionenaustauschers – bei nur geringen Kapazitäten können Ionen mit der Ionenchromatographie (IC) im Spurenbereich detektiert werden. Ionenaustauscher hoher Kapazität ermöglichen dagegen präparative Isolierungen ionischer Spezies. Dies trifft auch für Proteinreinigungen zu.

Das Equipment für beide Substanzklassen ist vergleichbar – abgesehen von den Trennsystemen. Die Diskussion über eine erforderliche Inertheit von Chromatographie-Anlagen für Proteinreinigungen ist permanent, aber nicht für jede Trennung erforderlich.

5.2 Flüssigchromatographie von Ionen

Sowohl anorganische als auch organische Ionen können mit den verschiedensten flüssigchromatographischen Trennsystemen analysiert werden. Abbildung 5.1 zeigt, dass für anorganische und organische Ionen die Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Ionenchromatographie (IC) geeignet sind. Ionenausschluss (ICE), Ionenpaar- (IPC)chromatographie sowie die HPAEC-PAD sind dagegen für die Trennung von organischen Ionen prädestiniert.

Bei der HPAEC-PAD werden anionische Zucker getrennt; die Ligandenaustauschchromatographie (LEC) nimmt unter diesen Methoden eine Sonderstellung ein, da hier die Zucker oder auch Alkohole im neutralen (nicht ionischen) Zustand chromatographiert werden.

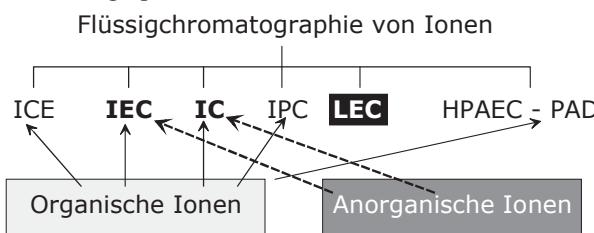


Abb. 5.1 Methodeneinteilung-II, LC-Trennsysteme für Ionen

5.2.1 Ionenausschlusschromatographie

Der Mechanismus der ICE (*ion chromatography exclusion*, Abbildung 5.2) basiert auf dem „Ausschluss“ von anorganischen Ionen, während organische Species wie Essig- oder Ascorbinsäure an der stationären Phase retardiert werden. Diese besteht aus dem organischen Polymer Styren-Divinylbenzen (S-DVB), das sulfoniert (negative Ladungen) ist und hydrophobe Zentren in seiner Molekülstruktur für die Analyt-Interaktionen besitzt.

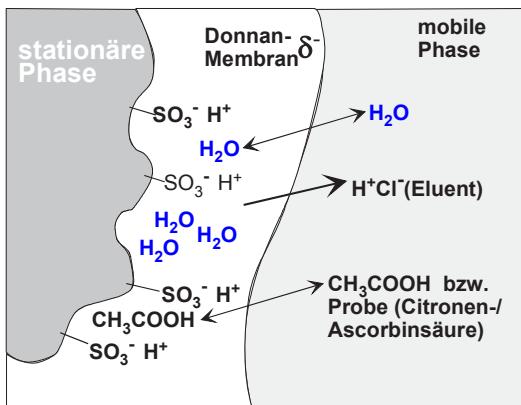


Abb. 5.2 Schematische Darstellung des Ausschluss-Effektes

Als Eluent dient reines Wasser mit einem pH-Wert um 3. Unter diesen sauren Elutionsbedingungen liegen die organischen Säuren (s.o.) im undissoziertem Zustand vor, während die zum Ansäuern des Eluenten verwendeten starken Säuren (Schwefelsäure oder Salzsäure) dissoziiert vorliegen. Ihre Anionen (SO_4^{2-} , Cl^-) werden von den negativ geladenen Sulfonsäuregruppen abgestoßen und mit der Durchbruchsfront (t_0) eluiert („Ionenausschluss“). Die neutralen Moleküle der organischen Säuren hingegen, können die gedachte sogenannte „Donnan-Membran“ durchdringen und mit dem S-DVB interagieren. Dies erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alkylgruppen der Säuren und den Benzenstrukturen der stationären Phase. Allein das Vordringen der ungeladenen Analyte in die S-DVB-Phase („Einschluss-Effekte“) führt zu Verzögerungen der Elution. Das ermöglicht die Trennung organischer Säuren wie z.B. von Citronensäure und Ascorbinsäure (Vitamin C).

5.2.2 Ionenaustauschchromatographie

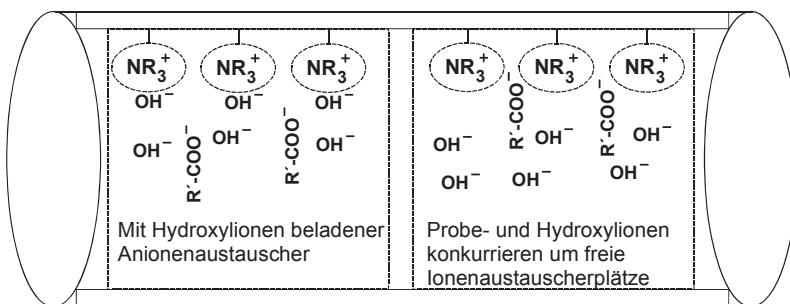
In der Ionenaustauschchromatographie (IEC: *ion exchange chromatography*) werden stationäre Phasen verwendet, die an ihrer Oberfläche elektrische Ladungen tragen. Das sind anionische SO_3^- - oder COO^- -Gruppen und kationische NH_3^+ - oder NR_3^+ -Gruppen, die an das Ionenaustauscherharz oder -gel kovalent oder elektrostatisch gebunden sind. Neben Polymeren werden auch Silicagele als Ionenaustauscher-Matrix verwendet. Für Proteine sind, wie in Tabelle 5.1 gezeigt wird, hydrophile Basismaterialien, die keine unerwünschten Adsorptionen erlauben, anzuwenden. Die folgenden Erklärungen zum Ionenaustausch innerhalb dieses Kapitels beziehen sich auf Anionen und Kationen, die auch als negativ oder positiv geladene Proteine angesehen werden können.

Die Ladungen am Ionenaustauscher werden durch entgegengesetzt geladene Ionen, die beweglich sind, besetzt und können gegen andere Ionen ausgetauscht werden. Daher resultiert der Name „Ionenaustausch“, bei dem ionische Probemoleküle die Gegenionen, die die Ionenaustauscherplätze der Matrix besetzt halten, verdrängen müssen, um selbst gebunden zu werden.

Ionenaustauscher-Säulen können im Vergleich zur Gelfiltration mit wesentlich größeren Proteinmengen beladen werden. Je mehr funktionelle Gruppen an diese Trennphasen gekoppelt sind, desto größere Mengen an Proteinen können gebunden und chromatographiert werden. Diese Ionenaustauscher besitzen eine hohe Austauschkapazität (einige meq/g: *Milliäquivalent pro Gramm Ionenaustauscher*).

Demgegenüber sind die Austauscherkapazitäten in der Ionenchromatographie (Abschnitt 5.2.3) deutlich geringer (ca. 10–50 µeq/g).

Man unterscheidet zwischen stark und schwach sauren Kationenaustauschern (Kopplung mit Sulfonsäure- bzw. Carboxylsäuregruppen) sowie zwischen stark und schwach basischen Anionenaustauschern (Kopplung mit tertiären Aminogruppen bzw. Diethylaminoethylgruppen, DEAE).

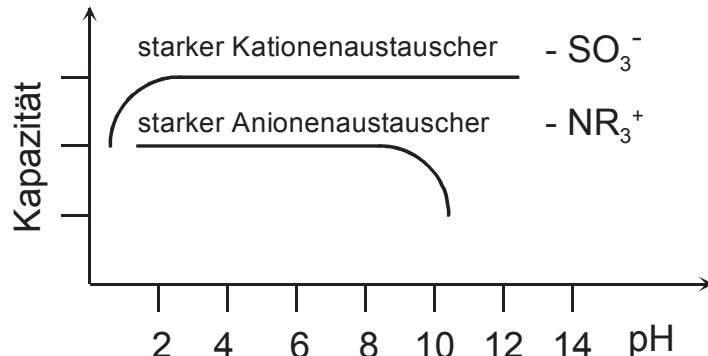
**Abb. 5.3** Trennung an einem Anionenaustauscher

Im Säulen-Modell (Abbildung 5.3) ist das Trennprinzip an einem stark basischen Anionenaustauscher dargestellt.

An die Ionenaustauscher-Partikel sind NR_3^+ -Gruppen kovalent gebunden und die Hydroxylionen (OH^-), die z.B. aus dem Equilibrierungs-Puffer stammen, besetzen die freien Ionenaustauscherplätze. Der Ionenaustauscher ist mit diesen Gegenionen beladen und befindet sich im Gleichgewichtszustand (linke Seite der Abbildung). Nach Applizieren von Probemolekülen (Proteinen) mit negativer Ladung ($\text{R}'\text{COO}^-$) auf die Trennsäule beginnen diese mit den OH^- -Ionen um die Ionenaustauscherplätze zu konkurrieren (rechte Seite). Dadurch wird die Elution der anionischen Species verzögert. Je länger und intensiver diese ionischen Wechselwirkungen sind, desto später werden die Ionen von der Säule eluiert.

Demgegenüber trägt ein stark saurer Kationenaustauscher SO_3^- -Gruppen auf seiner Oberfläche, die z.B. mit Na^+ -Ionen (Gegenionen) belegt sind. Die zu trennenden Kationen ($\text{R}''\text{-X}^+$) würden in diesem Fall mit den Natriumionen um die freien Plätze an den SO_3^- -Gruppen konkurrieren.

Wie in Abbildung 5.4 gezeigt, besitzen stark saure Kationenaustauscher hohe Austauschkapazitäten zwischen pH = 2 bis 12 (13). Stark basische Anionenaustauscher zeigen schon ab pH = 8 Verkleinerungen in der Kapazität.

**Abb. 5.4** Kapazitäten starker Kationen- und Anionenaustauscher in Abhängigkeit vom pH-Wert

In Abbildung 5.5 ist das Trennprinzip an einem schwach sauren Kationenaustauscher dargestellt. Die gebundenen Carboxylgruppen sind schwache Säuren, die unterhalb eines pH-Wertes von 4, der durch den Elutions-Puffer eingestellt wird, in nicht dissoziierter Form vorliegen. In diesem Ladungszustand kann an diesen funktionellen Gruppen kein Ionenaustausch und damit auch keine Trennung stattfinden. Im Bereich zwischen pH-Werten von 4 und 8 beginnt die Dissoziation des Ionenaustauschers, so dass positiv geladene Probemoleküle an den Ionenaustauscher binden können. Maximale Austauschkapazitäten werden erst im stark basischen pH-Bereich ($> 8 - 10$) erzielt, wie auch aus Abbildung 5.6 hervorgeht.

Schwach basische Anionenaustauscher besitzen im sauren Bereich maximale Austauschkapazitäten, die bei pH-Wert von 6 bis 8 beginnen, kleiner zu werden.

Durch Variation des Ionenaustauschertyps, des pH-Wertes des Eluenten sowie der Art und Konzentration (Ionenstärke) der Gegenionen in der mobilen Phase können die Trennungen optimiert werden. Obwohl die Erfolge der Ionenaustauschchromatographie meist von den Erfahrungen des Experimentators abhängen und durch empirisches Herangehen geprägt sind, existieren wichtige Grundregeln.

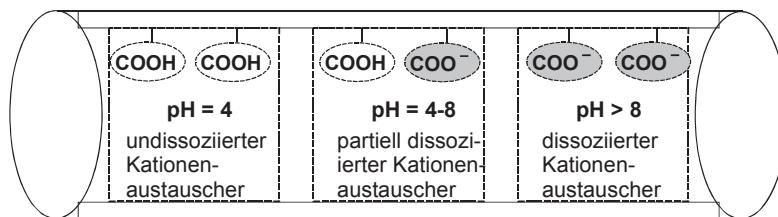


Abb. 5.5 Schematische Darstellung der Ladungsverhältnisse eines schwach sauren Kationenaustauschers in Abhängigkeit vom pH-Wert

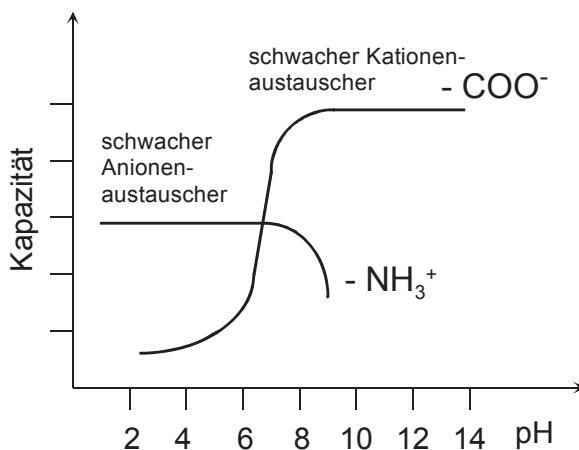


Abb. 5.6 Kapazitäten schwacher Kationen- und Anionenaustauscher in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Vergrößerung der Ionenstärke im Elutionspuffer, wodurch die freien Ionenaustauscherplätze stärker belegt und die Wechselwirkungs-Möglichkeiten der Probeionen vermindert werden, führt zur Verkürzung der Retentionszeit. Ionen mit kleinen Radien, hoher Ladung und guter Polarisierbarkeit lagern sich besser an die funktionellen Gruppen eines Ionenaustauschers an.

Beim Kationen- und Anionenaustausch ist ein Anstieg der Retentionszeit zu verzeichnen, wenn ein Gegenion durch ein anderes Ion entsprechend den nachstehend aufgeführten Reihenfolgen substituiert wird, wie in Abbildung 5.7 dargestellt ist. Beispiele dafür sind der Austausch von H^+ gegen Ca^{2+} oder Chlorid gegen Sulfationen.

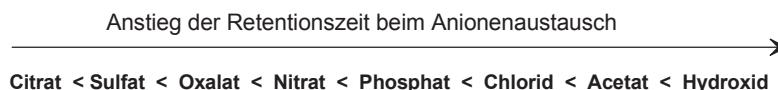
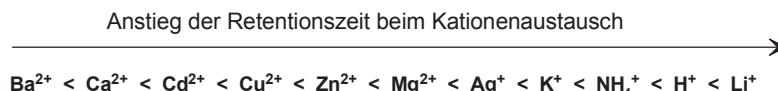


Abb. 5.7 Abhängigkeit der Retentionszeit vom Gegenion bei Kationen- und Anionenaustausch

Eine Erniedrigung des pH-Wertes in der Pufferlösung führt bei starken Anionenaustauschern zur Verkürzung der Retentionszeit, während schwache Anionenaustauscher bei niedrigen pH-Werten besser dissoziiert vorliegen und zur Verzögerung der Retention beitragen.

Für starke Kationenaustauscher resultieren bei einer pH-Wert-Erhöhung verkürzte Retentionszeiten. Die schwachen Kationenaustauscher sind dagegen unter basischen Elutionsbedingungen besser dissoziiert und verlangsamen die Elution der Ionen bzw. Proteine.

5.2.3 Ionenchromatographie

Die grundlegenden Arbeiten zur Ionenchromatographie (IC: *ion chromatography*) wurden 1975 von Small, Stevens und Baumann veröffentlicht.

Die Ionenchromatographie (IC) wird vorrangig zur Trennung von anorganischen Kationen und Anionen sowie für organische ionische Species wie organische Säuren eingesetzt. Grundlage des Trennmechanismus ist die Ionenaustausch-chromatographie (Abschnitt 5.2.2). Für die Ionenanalyse steht im Prinzip eine breite Palette an Ionenaustauschertypen (starke und schwache Kationen- und Anionenaustauscher) zur Verfügung. Das Problem ist, dass Ionenaustauscher mit wässrigen Puffersalzen eluiert werden müssen, die selbst Ionen in hohen Konzentrationen enthalten. Für eine sehr empfindliche Registrierung von Ionen bieten sich Leitfähigkeitsdetektoren an.

Die hochkonzentrierten Pufferlösungen besitzen jedoch selbst eine zu hohe Eigenleitfähigkeit, die jedes separate Ionensignal überdecken würde.

Daraus resultierten für das Etablieren der Ionenchromatographie zwei entscheidende Forderungen:

1. Herstellung von Ionenaustauschern kleiner Kapazität für Anionen und Kationen.
2. Unterdrückung der Eigenleitfähigkeit der Eluenten.

Als stationäre Phasen für die Anionenanalyse wurden spezielle oberflächensulfonyierte Latex-Anionenaustauscher auf Styren-Divinylbenzen-Basis (s. Abschnitt 5.2.6) mit Partikelgrößen um 5 bzw. 10 µm entwickelt. An diese inerten und druckstabilen Latexpartikel sind über elektrostatische und über van-der-Waals-Wechselwirkungen winzig kleine aminierte Polymerkügelchen von ca. 0,1 µm gekoppelt. Ihre quaternären Ammoniumgruppen ermöglichen anionische Wechselwirkungen mit den Probeionen. Aus der Kleinheit der Partikel resultieren niedrige Austauschkapazitäten, obwohl die NR_3^+ -Gruppen zu den stark basischen Ionenaustauschern gehören. Für die Trennung der Anionen dienen basische Eluenten wie NaOH.

Zur Unterdrückung der Leitfähigkeit der Eluenten wurden sogenannte Suppressorsäulen, die der Anionenaustauscher-Säule nachgeschaltet sind, entwickelt. Diese enthalten im Falle der Anionenanalyse einen Kationenaustauscher mit hoher Kapazität, der zur Entfernung der Natriumionen aus der mobilen Phase dient, wie im unteren Teil der Abbildung 5.8 dargestellt ist.

In der Abbildung sind die Vorgänge der Ionenchromatographie von Anionen anschaulich zusammengefasst. Die Probeionen (z.B. SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^-) werden auf die Anionenaustauscher-Säule appliziert und mit NaOH eluiert. Die Probeionen konkurrieren mit den Hydroxylionen um die freien, positiv geladenen Ionenaustauscherplätze und werden dadurch retardiert.

Auf Grund des geringen Abstandes zwischen dem undurchdringlichen Latexkern und den 0,1-µm-Partikeln sind die Diffusionswege für die Probeionen sehr gering; die resultierenden Peakprofile dadurch sehr schmal.

Die Natriumionen lagern sich dagegen an den negativ geladenen Kationenaustauscher in der Unterdrückersäule an, während die Anionen keine Wechselwirkungen in dieser Säule eingehen und zum Leitfähigkeitsdetektor transportiert werden, wobei ihre Peakverbreiterung gering ist. Im Idealfall gelangen nur die getrennten Probeionen und reines Wasser zum Leitfähigkeitsdetektor, so dass die Ionen extrem empfindlich nachgewiesen werden können (hier im Pico- bis Femtomolbereich).

Das Prinzip der Ionenchromatographie lässt sich auch auf Kationen (Na^+ , NH_4^+ , K^+) anwenden. Die Trennsäule ist mit einem Kationenaustauscher niedriger Kapazität und die Suppressorsäule mit einem Anionenaustauscher hoher Kapazität gefüllt.

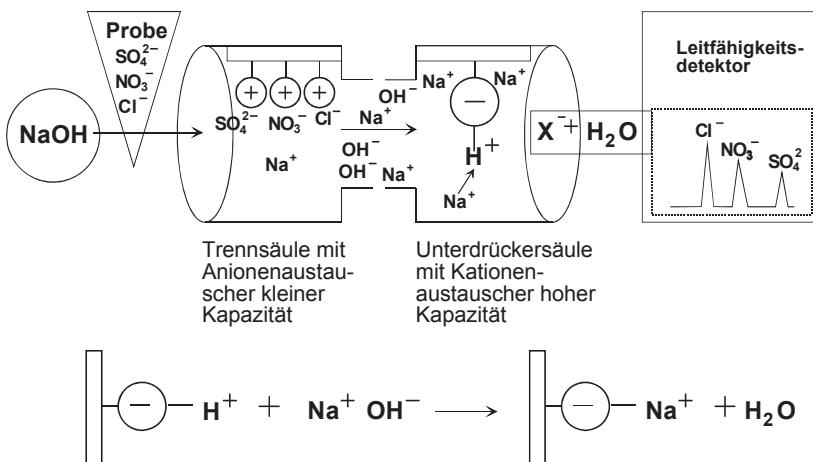


Abb. 5.8 Prinzip der Ionenchromatographie von Anionen

Zur Herstellung dieser Kationenaustauscher wurde vom Anionenaustauscher niedriger Kapazität ausgegangen. Die an der Latexoberfläche gekoppelten aminierten Anionenaustauscher-Kügelchen wurden mit einer zweiten Latexschicht überzogen, die total sulfoniert ist und auf Grund dieser negativen Ladungen kationische Wechselwirkungen ermöglicht.

Die Unterdrückung der Leitfähigkeit der Chloridionen des Eluenten erfolgt mit Hilfe eines Anionenaustauschers mit hoher Kapazität, der vor jeder neuen Ionenanalyse regeneriert werden muss. Dies ist einerseits zeitaufwendig; andererseits resultieren dadurch auch sehr hohe Empfindlichkeiten.

Anstelle von Suppressorsäulen werden heute Hohlfaser- oder Membranunterdrücker sowie elektronische Unterdrücker eingesetzt, die mit ähnlicher Effektivität die Elutionen hoher Leitfähigkeit eliminieren. Diese „Ionenunterdrücker“ zeichnen sich durch ein geringes Totvolumen aus und sind im Vergleich zur Suppressorsäulen-Technik teilweise etwas weniger empfindlich.

Die Ionenchromatographie hat sich insbesondere in der Umweltanalytik und Lebensmittelchemie etabliert. Für pharmazeutische, biotechnologische und andere bioanalytische Untersuchungen gewinnt die IC zunehmende Bedeutung, da auch organische ionische Substanzen (organische Säuren und Kohlenhydrate) bestimbar sind.

Einer der Vorteile der IC z.B. gegenüber der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder Atomemissionsspektroskopie (AES) auf dem Gebiet der Spuren- und Elementanalytik liegt in der gleichzeitigen Analyse von ein- und mehrwertigen Species eines Ions oder Moleküls. Organische und anorganische Komponenten können innerhalb nur eines Chromatographie-Laufes getrennt und nachgewiesen werden.

5.2.4 Ionenpaarchromatographie

Die Ionenpaarchromatographie (IPC: *ion pair chromatography*) wird zur Bestimmung sowohl von kationischen als auch anionischen Verbindungen eingesetzt, die vor allem im Arzneimittelbereich von Bedeutung sind.

Als Trennsysteme dienen meist hydrophobe Reversed-Phase-Materialien wie RP-8, RP-18, was zur breiten Anwendung dieser Methode beigetragen hat. Polare Verbindungen wie organische Säuren können in der Regel nur dann an RP-Säulen getrennt werden, wenn der Eluent auf einen sauren pH-Wert eingestellt ist, der die Dissoziation der Säuren unterdrückt und damit hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären RP-Phase ermöglicht.

Die Elution erfolgt meist mit einem Puffergemisch, das Zusätze an organischen Lösungsmitteln (MeOH, ACN) enthält. Der mobilen Phase werden entsprechende Gegenionen (Gl^-) hinzugefügt, die mit den ionischen Probespecies (Sn^+) Ionenpaare $[\text{Sn}^+ \text{Gl}^-]$ ausbilden. Diese sind nach außen neutral geladen und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der RP-Phase und flüssig-flüssig-chromatographische Verteilungsvorgänge getrennt. Ein Vorteil besteht darin, dass neben ionischen auch neutrale Verbindungen chromatographiert werden können.

Für kationische Species wie Katecholamine dienen Alkansulfonsäuren wie Pentan-, Hexan-, Heptan- oder Octansulfonsäure als Ionenpaarreagenzien.

Der pH-Wert der mobilen Phase liegt meist im sauren Bereich, um die Dissoziation der Ionenkomplexe zu unterdrücken und die Selektivität der hydrophoben Wechselwirkungen zu erhöhen.

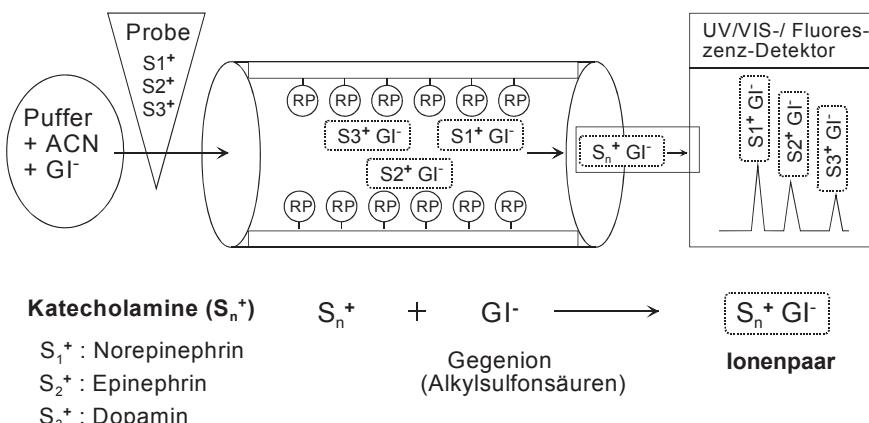


Abb. 5.9 Prinzip der Ionenpaarchromatographie von kationischen Species

In der Ionenpaarchromatographie von Anionen (Sn^-) werden als Gegenionen Tetrabutylammoniumsalze (G^+) der mobilen Phase zugesetzt. Dadurch resultieren auch hier nach außen neutral geladene Ionenpaare $[\text{Sn}^- \text{G}^+]$, die über hydrophobe Wechselwirkungen an RP-Säulen voneinander getrennt werden. Die Analyse von organischen Säuren ist ein prädestiniertes Beispiel für diese Chromatographie-Technik.

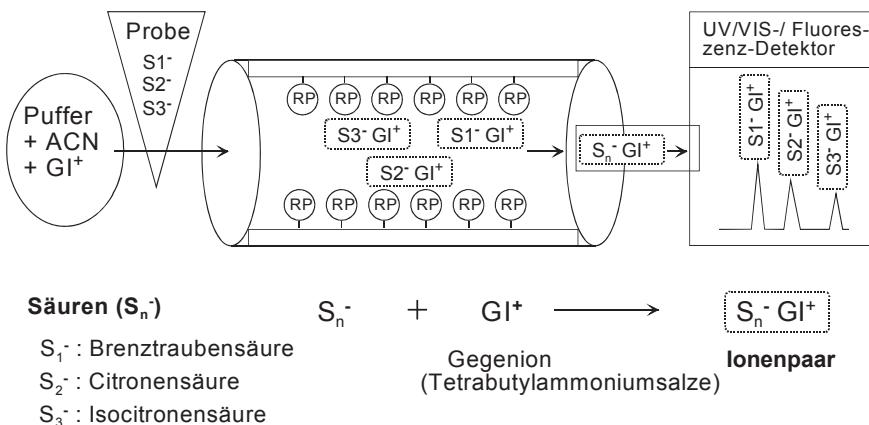


Abb. 5.10 Prinzip der Ionenaarchromatographie von anionischen Species

Innerhalb der Ionenaarchromatographie sollten beim praktischen Arbeiten einige Besonderheiten beachtet werden. Die Ionenaarreagenzien sind nur schwer von der Oberfläche der RP-Säulen vollständig wieder zu entfernen. Für jedes Trennproblem in der Ionenaarchromatographie wird deshalb eine gesonderte HPLC-Säule empfohlen.

Die Chromatographie von Ionenaaren kann durch Variation verschiedener Parameter optimiert werden. Falls die kat- oder anionischen Substanzen nicht oder kaum im UV-Bereich absorbieren, können zur Erhöhung der Detektorempfindlichkeit Ionenaar-Reagenzien mit chromophoren Gruppen eingesetzt werden. Gegen-nonen mit langketten hydrophoben Resten tragen dagegen zur Vergrößerung der Retentionszeit bei. Die Zusammensetzung der mobilen Phase und ihr pH-Wert sind so zu wählen, dass die Gegenionen vollständig gelöst und ionisiert sind.

5.2.5 Ligandenaustauschchromatographie

Mit der LEC (*ligand exchange chromatography*) können hydrophile bzw. polare Analyte (Kohlenhydrate, organische Säuren und Alkohole) getrennt werden, wobei diese Species – wie auch bei der ICE – nichtionisiert vorliegen. Als mobile Phase dient bidestilliertes bzw. entionisiertes Wasser und es wird in der Regel bei hohen Temperaturen (70 bis 85°C) chromatographiert. Grundgerüst der stationären Phase ist ein sulfonierte S-DVB-Polymer. An die negativ geladenen funktionalen Gruppen ($-SO_3^-$) – die Liganden – können entsprechende Gegenionen (Metallionen) angelagert werden. Für Kohlenhydrattrennungen haben sich vor allem Kalzium- und Bleiionen als besonders selektiv erwiesen. Hexosen (Glucose, Mannose, Galactose) werden besser an bleibeladenen S-DVB-Polymeren mit guter Auflösung getrennt. Für die Analyse alkoholischer Getränke, die als Hauptkomponenten Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol enthalten und für die Trennung des dimeren Zuckers Lactose und seiner Spaltprodukte Glucose und Galactose bieten mit Kalzium beladene Säulen die besten Trennergebnisse.

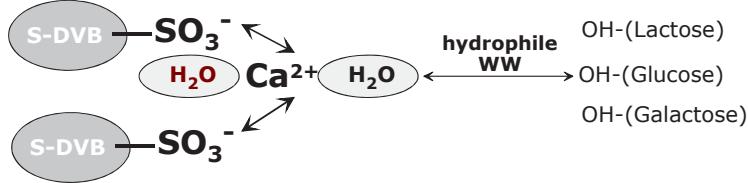


Abb. 5.11 Prinzip der LEC

Der LEC-Trennmechanismus kann z.T. nur annähernd erklärt werden. Die Abbildung 5.11 zeigt, dass sich Wassermoleküle an der Oberfläche um den Liganden und sein Metallatom befinden. Wasser und die einzelnen Zucker können quasi ausgetauscht werden. Eine Interpretation, weshalb zuerst Glucose und später die Galactose eluiert werden, ist schwierig. Chromatographie ist gelegentlich auch mit einer gewissen Empirie verbunden.

Das Equipment der LEC-Analytik ist in Abbildung 5.12 schematisch dargestellt. Zur Detektion dient ein Refraktometer (RI-Detektor). Trennsäule und Detektor müssen relativ lang äquilibriert werden. Der Eluent Wasser passiert die temperierte Trennsäule und gelangt danach in die Durchflusszellen des RI-Detektors, die gleichmäßig durchströmt werden. Es werden die Brechungsindizes von Mess- und Vergleichsküvette verglichen, die in dieser Situation identisch sind.

Damit ist die Brechungsindex-Differenz gleich Null und es wird im Chromatogramm während der Konditionierung der Säule nur die Basislinie aufgezeichnet. Nach Schließen der Kapillare zur Vergleichsküvette strömt das gesamte Eluat und die enthaltenen Zucker nur noch durch die Messzelle. Sobald in der Säule getrennte Zuckermoleküle darin erscheinen, ändert sich der Brechungsindex, die Differenz (ΔRI) wird größer Null und es wird eine (Zucker)-peak registriert.

Auch diese Art von Flüssigchromatographie ist sehr ökologisch, da nur Reinstwasser (keine Organika) zum Einsatz kommt. Die Proben werden nur mit Wasser im Überschuss (1:100 ... 1:1000 V/V) verdünnt und direkt appliziert.

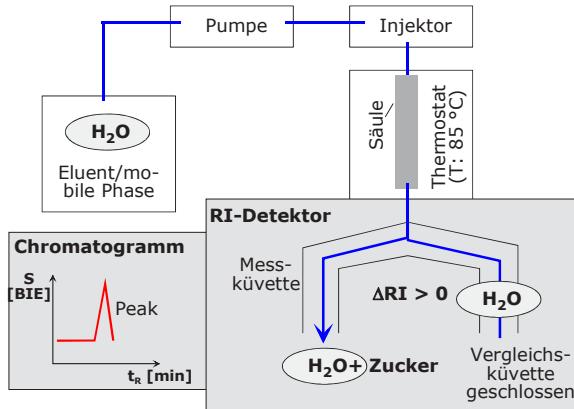


Abb. 5.12 LEC mit RI-Detektion

5.2.6 Anionenaustauschchromatographie (HPAEC-PAD)

Hauptanwendungsgebiet der HPAEC-PAD-Methode ist die Analyse von mono- und oligomeren Kohlenhydraten. Die chromatographische Trennung der Komponenten erfolgt unter stark alkalischen Elutionsbedingungen („HP“: *high pH*) an einem Anionenaustauscher (AEC: *anion-exchange chromatography*). Zur Registrierung dient die gepulstamperometrische Detektion (PAD: *pulsed-amperometric detection*).

Die Firma Dionex entwickelte spezielle pelliculäre Ionenaustauscherpolymere mit einheitlichen Korngrößen um 5, 8 oder 10 µm, an deren Oberfläche winzig kleine unporöse Latexpartikel (*MicroBeads*) über elektrostatische Wechselwirkungen gebunden sind (vgl. Abbildung 5.13).

Diese Ionenaustauscher auf Polymerbasis sind im Gegensatz zu Silicagelen (pH-Beständigkeit <8) im pH-Bereich von ca. 1–14 hydrolysestabil und für biologische Proben sehr robust. Deshalb können solche Polymerphasen mit NaOH-Eluenten bei pH-Werten von 12 bis 13 eluiert werden. Unter diesen stark basischen Bedingungen kommt es zur Dissoziation der Kohlenhydrate, die auf die Trennsäule applizierten wurden.

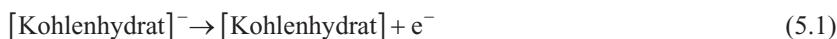
Auf Grund ihrer hohen pK-Werte, die z.B. für Glucose 12,35 oder für Mannose 12,08 betragen, liegen die Zucker innerhalb der Säule als Oxyanionen bzw. schwach dissoziierte Säuren vor, die auf Grund anionischer Wechselwirkungen chromatographiert werden können.

Das Polymer in der Trennsäule *Carbo Pac PA1* besteht im Inneren des Partikelkerns aus einem sulfonierten Polystyren-Divinylbenzen. An seiner Oberfläche befinden sich SO_3^- -Gruppen, die mit 350-nm-Latexpartikeln elektrostatisch verknüpft sind. Im Falle der Säule *CarboPak PA-100* ist das Basispolymer ein sulfonierte Ethylvinylbenzen-Divinylbenzen mit 350-nm-MicroBeads.

Die Latexpartikel tragen die Anionenaustauscherfunktionen (NR_3^+ -Gruppen). Um diese positiv geladenen freien Ionenaustauschergruppen konkurrieren die Hydroxylionen (OH^-) aus dem NaOH-Eluenten mit den Oxyanionen der Zucker. Es treten unterschiedlich starke ionische Wechselwirkungen mit den quaternären Ammoniumgruppen des Ionenaustauschers auf, so dass die Zuckeranionen retardiert und getrennt werden.

Für eine sehr empfindliche Detektion von mono- und oligomeren Kohlenhydraten im ppb-Bereich wurde die gepulst-amperometrische Detektion entwickelt.

Auf Grund der basischen Elutionsbedingungen sind die Kohlenhydrate bereits partiell ionisiert, wodurch auch ihre elektrochemische (amperometrische) Detektion erleichtert bzw. erst ermöglicht wird. An einer Goldelektrode, die in einer Mikrodurchflussküvette angeordnet ist, werden die Kohlenhydratanionen oxidiert.



Der entstehende Elektronenstrom wird für die einzelnen Zucker-Komponenten kontinuierlich gemessen und in einem Chromatogramm in Form von Peaks aufgezeichnet.

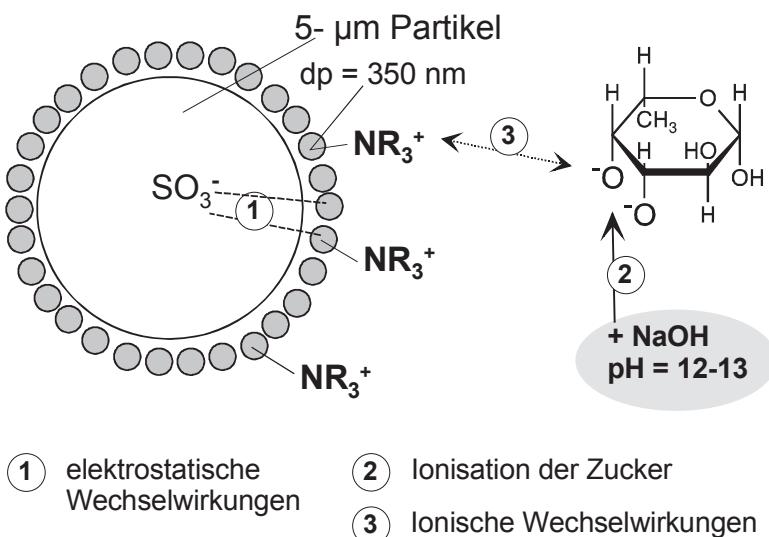


Abb. 5.13 Sulfonierter Ionenaustauscher mit funktionalisierten MicroBeads

Bei der Oxidation lagern sich Kohlenhydratreste auf der Elektrode ab, die im Laufe der Zeit einen Basislinienanstieg hervorrufen und damit verrauschte Chromatogramme ergeben würden.

Das Anlegen eines zweiten (positiven) Potentials (E2) führt zur Oxidation der Oberfläche der Goldelektrode, die durch ein weiteres (negatives) Potential (E3) wiederum reduziert wird (Abb. 5.14a).

Das Anlegen dieser unterschiedlichen Potentiale zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wird kontinuierlich innerhalb nur weniger hundert Millisekunden wiederholt. Durch diese Reinigungsvorgänge werden die Kohlenhydratreste und andere Oxidations- bzw. Reduktionsprodukte quantitativ von der Goldelektrode entfernt. Bei zu stark kontaminiertem Probematerial kann es erforderlich werden, die Elektrode aus dem Detektor herauszunehmen und gründlich zu reinigen, was jedoch in der Regel von einem erfahrenen Praktiker durchgeführt werden sollte.

Ein Applikationsbeispiel zur Trennung monomerer Zucker (1: Fucose, 2: N-Acetylgalactosamin, 3: N-Acetylglucosamin, 4: Galactose, 5: Glucose, 6: Mannose) mittels HPAEC-PAD zeigt Abbildung 5.14b.

Die strukturell sehr ähnlichen Hexosen (Galactose, Glucose und Mannose) werden gut aufgetrennt. Als Säule diente CarboPak PA 1 mit einer Partikelgröße von 5 μm (L: 250 mm, i.D.: 4,0 mm). Bei einer Flussrate von 1,0 ml/min erfolgte die Elution der Kohlenhydrate mit 21 mmol/L NaOH. Detektiert wurde mit einem PAD ($E_1 = 50 \text{ mV}$, $E_2 = 650 \text{ mV}$, $E_3 = -950 \text{ mV}$; $t_1 = 300 \text{ ms}$, $t_2 = 60 \text{ ms}$, $t_3 = 60 \text{ ms}$).

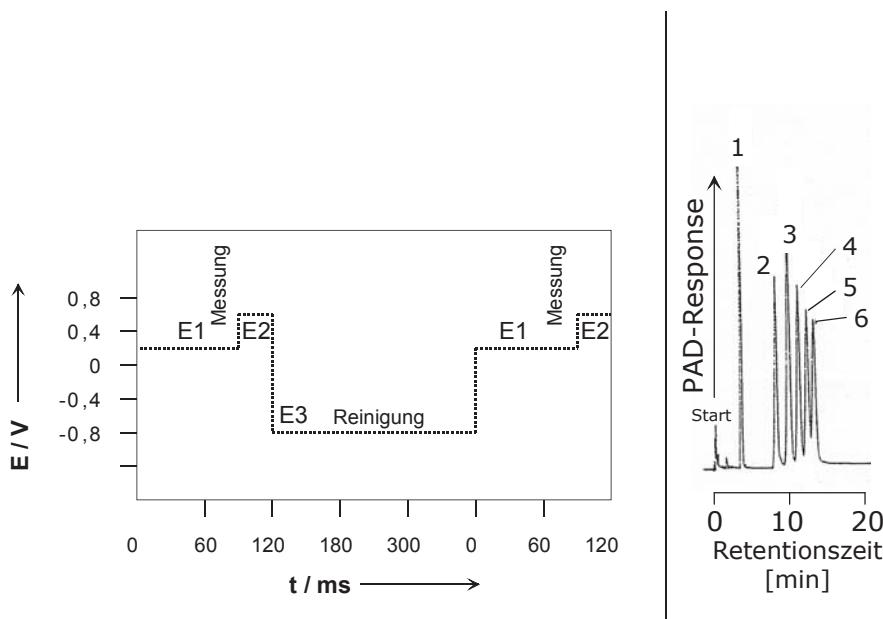


Abb. 5.14a Potentialsequenz

Abb. 5.14b
Chromatogramm,
HPAEC-PAD

5.3 Biochromatographie

Die Biochromatographie beinhaltet die chromatographische Trennung und Reinigung insbesondere von Proteinen. Auch andere Biopolymere wie Glycoproteine, Nucleinsäuren oder Polysaccharide werden mit dieser schonenden Trenntechnik analysiert, charakterisiert und präparativ isoliert.

Die Biochromatographie hat einerseits ihre Wurzeln in der klassischen Säulen-chromatographie (vgl. Tabelle 4.1), deren hydrophile Weichgele sowie andere Trennmaterialien vor allem im präparativen Maßstab für schonende Proteintrennungen eingesetzt wurden. Die klassische LC umfasste bereits Trennsysteme wie die Größenausschlusschromatographie (SEC), die Ionenaustauschchromatographie (IEC) und die verschiedensten Varianten der Affinitätschromatographie (AC). Nachteilig waren vor allem die langen Analysenzeiten, die nur geringe Automatisierung und die niedrige Trennleistung der Säulen (kleine theoretische Bodenzahlen N). Trotzdem findet sie auch heute noch Anwendung innerhalb der Proteinanalytik in vielen biochemischen Laboratorien. Oft sind es Kostengründe und auch die Option, Proteinfractionen in „auswägbaren“ Mengen zu isolieren.

Andererseits ist Biochromatographie aus der Weiterentwicklung der Hochleistungsflüssigchromatographie zu Beginn der 1980-er Jahre hervorgegangen.

Sie kann auch als HPLC biologischer Substanzen bezeichnet werden. Ein speziell für Proteinreinigungen entwickeltes Trennsystem, das dem analytischen Anspruch „Biochromatographie“ sehr gut entspricht, ist das FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*).

Alle Bemühungen, „klassische HPLC-Materialien“ wie z.B. RP-Säulen zur Trennung von Proteinen unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität einzusetzen, scheiterten an den Effekten der irreversiblen Adsorptionen und Denaturierungsscheinungen an diesen Trennphasen, insbesondere auch unter den hochdruckchromatographischen Bedingungen. Die für Proteine seit den 50- und 60-er Jahren mit Erfolg in der klassischen Protein-LC eingesetzten hydrophilen Polymere auf der Basis von Agarose (Abbildung 5.15 bis 5.17), Dextranen und Polyacrylamid waren andererseits nur bis zu wenigen Bar druckstabil.

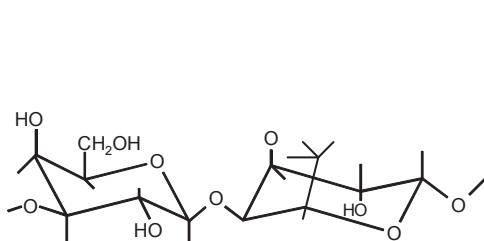


Abb. 5.15 Agarose-Struktur

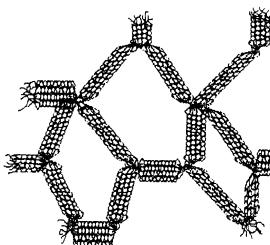


Abb. 5.16 Gelstruktur der Agarose

1. Agarose

Verzweigte Polysaccharide, die Galactose- und Anhydrogalactosebausteine enthalten.

Vorkommen : Rote Algen

2. Dextrane

Verzweigte Polysaccharide, die Glucosebausteine enthalten.

Vorkommen : In Bakterien der Gruppe *Leuconostoc mesenteroides*

Dextran $\xrightarrow{\text{Vernetzung mit Epichlorhydrin}}$ Sephadex

3. Polyacryl-amid

Acrylamid $\xrightarrow{\text{Polymerisation (+ N, N'-methylene-bisacrylamid)}}$ Polyacryl-amid

Abb. 5.17 „Klassische Chromatographie-Gele“

Diese Trennmaterialien besaßen große (um 100 oder 200 µm) und relativ uneinheitliche Partikeldurchmesser. Dies führte zu geringen Trennleistungen der Säulen und zu langen Analysenzeiten.

Nachteilig war auch das Quellen und Schrumpfen dieser Materialien, wodurch die Reproduzierbarkeit der Trennungen verschlechtert wurde.

Entscheidend für den Durchbruch der HPLC in der Proteinanalytik war die Entwicklung neuer druckstabiler stationärer Phasen auf der Basis hydrophiler Polymere, insbesondere auf der Grundlage von Kohlenhydraten und modifizierten Silicagelen mit aufgepflanzten oder überzogenen hydrophilen Gruppen. Diese Materialien sind kugelförmig und monodispers und eignen sich für sehr schonende Proteintrennungen unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität bei erhöhtem Druck (1 bis ca. 10 MPa).

Tabelle 5.1 Ausgewählte kommerzielle druckstabile Chromatographie-Gele

Bezeichnung der Trenn-gele, (Silicagelbasis)	Bezeichnung der Trenn-gele, (Polymerbasis)	Bezeichnung der Polymere
Porasil	Ion-Pak	Sulfonierte Polystyren
Fractosil	OH-Pak	Hydroxylierter Polyester
TSK-Gel-SW	TSK-Gel-PW	Hydroxylierter Polyether
LiChrospher	Ashipak	Polyvinylalkohol
Protein-Pak	Pl-aqua Gel P	Polyacrylamid
SynChropak	Superose (6 und 12 HR)	Vernetztes Dextran

5.3.1 Chromatographie an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HA) wird zur Trennung von basischen oder sauren Proteinen, von Enzymen und Antikörpern meist dann eingesetzt, wenn andere Trennsysteme (IEC, HIC, AC) nicht oder nur wenig geeignet sind.

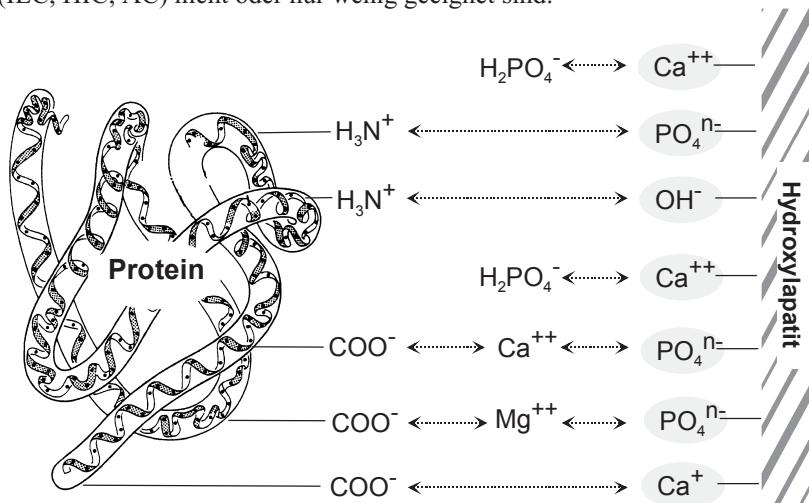


Abb. 5.18 Prinzip der Proteintrennung an Hydroxylapatit

Dieses Mineral ist sehr preisgünstig, und es kann auch zu Beginn einer Reinigungsprozedur als eine Art Vorstufe verwendet werden. Oft resultieren jedoch nur geringe Reinigungsfaktoren (3–6) und mäßige Ausbeuten (um 50%).

Hydroxylapatit besteht aus kristallinem Kalziumphosphat $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ und besitzt eine hexagonale Struktur. Besonders stabil ist die keramische (gesinterte) Form.

Die Ca^{2+} - und die PO_4^{n-} -Ionen sind die aktiven Bindungsstellen des Minerals, mit denen die Proteine in Wechselwirkungen treten. Saure Proteine bilden über ihre Carboxylgruppen mit den Kalziumionen Komplexe aus, während basische Proteine über ihre Aminogruppen mit den negativ geladenen Oberflächengruppen (PO_4^{n-} , OH^-) des Hydroxylapatits in elektrostatische Interaktionen treten können.

Die Elution erfolgt u.a. mit Phosphatpuffern ansteigender Ionenstärke. Die basischen Proteine können auch mit Kalziumchloridsalzen niedriger Ionenstärke (ca. 1–10 mM) von der Hydroxylapatit-Säule verdrängt werden. Für saure Proteine sind Chloridsalze ungeeignet. Sie werden mit fluorid- und phosphathaltigen Lösungen eluiert, da beide Ionen (PO_4^{n-} , F^-) die Carboxylgruppen des Proteins von den Kalziumionen des Minerals verdrängen können.

Das Trennprinzip wird als Adsorptionschromatographie oder als Mischung von anionischen und kationischen Wechselwirkungen (*Mixed-mode Ion-exchange Chromatography*) interpretiert.

5.3.2 Größenausschlusschromatographie

Zur Trennung von Molekülen nach ihrer effektiven Größe dient die Größenausschlusschromatographie (SEC: *size exclusion chromatography*).

Erfolgt die Elution mit einem organischen Lösungsmittel, wird diese Trenntechnik als Gelpermeationschromatographie (GPC) bezeichnet. Damit werden organische Polymere (z.B. Polyethylenglycole) an porösen hydrophoben Trennphasen auf Styren-Divinylbenzen-Basis chromatographiert, die jedoch für Proteintrennungen unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität nur wenig geeignet sind.

Für Biopolymere wird die auch als Gelfiltration (GF) bezeichnete SEC-Methode eingesetzt. Diese ist charakterisiert durch weitporige (ca. 100 nm) stationäre Phasen, die hydrophil sind und mit wässrigen Eluenten unter isokratischen Bedingungen chromatographiert werden.

Unter diesen physiologischen Bedingungen sind kaum Denaturierungserscheinungen zu verzeichnen. Die verwendeten Phosphatpuffer enthalten meist geringe Zusätze von Natriumchlorid, das zur Vermeidung möglicher Adsorptionserscheinungen der Proteine an der Trennphase dient.

Getrennt wird nach unterschiedlicher Größe der Proteine. Dabei beinhaltet die Angabe Molekülmasse M_r (engl. *molecular mass*; früher Molekulargewicht, engl. *molecular weight, MW*) die Summe der Atommassen aller Atome in einem Molekül. Bei Salzen spricht man von Formelmasse, da Salze aus Ionen aufgebaut sind.

Es wird zwischen relativer (eine Maßeinheit existiert nicht) und absoluter Molekülmasse, die in kg, g oder mg angegeben wird, unterschieden.

Dalton (Da) bezeichnet eine nach dem englischen Naturforscher John Dalton benannte, nicht SI-konforme Masseneinheit. Es ist ein anderer Name für die atomare Masseneinheit (Einheitenzeichen: u = unit). Somit ist sie gleich 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C und entspricht in etwa der Masse eines Wasserstoffatoms ($1,6605655 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$).

Der Begriff Molekulargewicht (MW: molecular weight) ist in der biochemischen Literatur und in den Biowissenschaften überhaupt fest verankert und wird auch in den einzelnen Kapiteln des Buches als übliche Bezeichnung verwendet.

Das Prinzip der Größenausschlusschromatographie von Biomolekülen (Proteinen) wird an dem Modell in Abbildung 5.19 anschaulich vermittelt.

Die Proteine werden nach der Größe ihres Molekulargewichtes zwischen den Poren der Trennphase (Gel) und der mobilen Phase „filtriert“, d.h., kleinere Proteine können in die Poren eindringen und diese durchwandern.

Je kleiner die Moleküle sind, desto längere Verweilzeiten entstehen im Poresystem, so dass sie am stärksten retardiert (zurückgehalten) werden und als Peaks am Ende des Chromatogramms erscheinen.

Sehr große Proteine, die in die Poren nicht hineinpassen, werden ausgeschlossen (deshalb Größenausschlusschromatographie) und an den Partikeln vorbei innerhalb des Flüssigkeitsvolumens mit der Totzeit t_0 (bzw. dem Totvolumen V_0) eluiert. Sie erscheinen als erster Chromatogrammpeak.

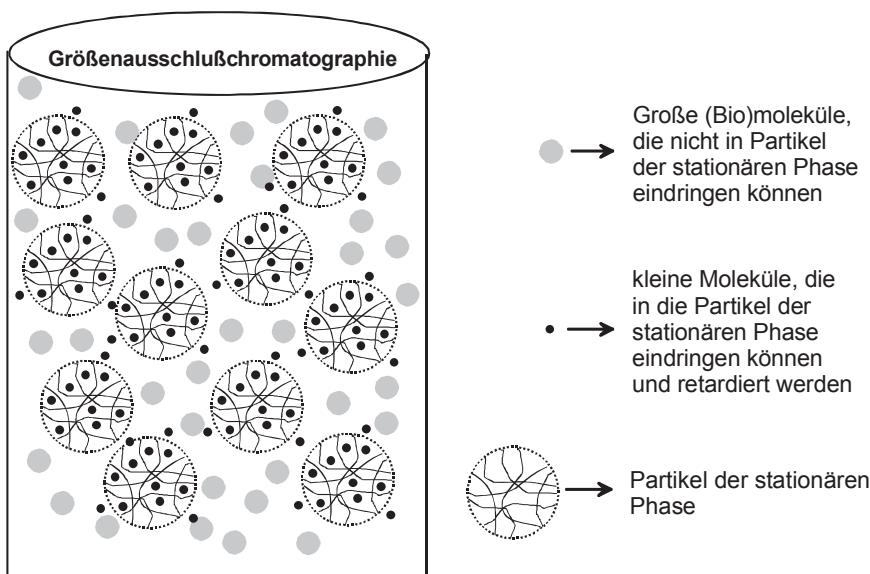


Abb. 5.19 Prinzip der Proteintrennung mittels SEC

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes eines unbekannten Proteins wird zuerst eine Standardmischung von Proteinen mit bekannten Molekulargewichten auf die SEC-Säule appliziert und getrennt (Abbildung 5.20).

Aus dieser chromatographischen Trennung werden für jedes einzelne Protein die Elutionsvolumina bestimmt und gegen den Logarithmus ihrer entsprechenden Molekulargewichte aufgetragen, wie im Abbildung 5.21 anschaulich gezeigt wird.

Im Kurvenbereich zwischen und V_0 (Totvolumen) und V_n , dem Elutionsvolumen für die kleinsten Proteine, erfolgt die Trennung der Moleküle nach ihrem Molekulargewicht. Die von der „Filtration“ in den Trennporen ausgeschlossenen Proteine werden mit V_0 in einem Peak eluiert. Die kleinsten Moleküle, die gleich lange Wege durch das Poresystem zurückgelegen, treffen in der Peakfraktion V_n zusammen.

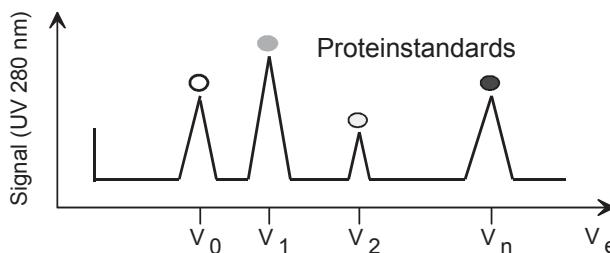


Abb. 5.20 SEC-Trennung von Proteinstandards

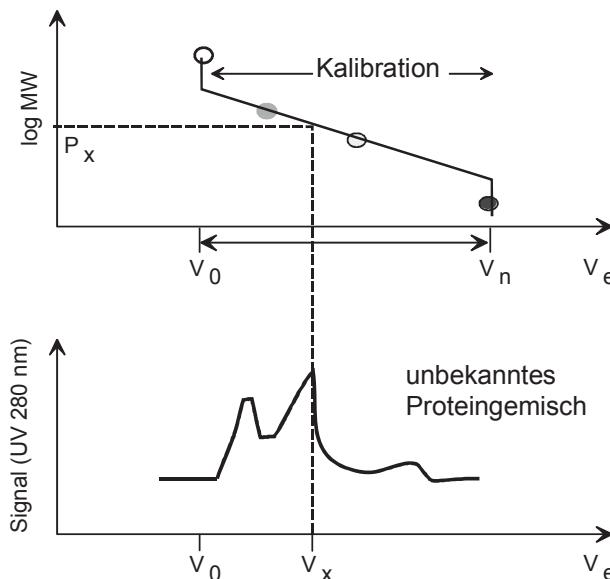


Abb. 5.21 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SEC

Nach der Analyse eines unbekannten Proteins unter identischen chromatografischen Bedingungen wird aus seinem Elutionsvolumen (V_x) auf der Basis der erstellten Eichkurve das entsprechende Molekulargewicht für das Protein P_x ermittelt.

Die Beladbarkeit von SEC-Säulen mit einer Proteinprobe ist relativ gering, da nur die Poren der stationären Phase für diesen Trenneffekt zur Verfügung stehen. Die Gelfiltration wird deshalb meist am Ende mehrstufiger chromatographischer Reinigungsschritte zur „Feinreinigung“ von Proteinen eingesetzt.

Im Abschnitt 15.10 werden die Einsatzmöglichkeiten der Größenausschlusschromatographie am Beispiel der Reinigung von thermostabilen Enzymen dargestellt. An Hand von zahlreichen Literaturzitaten wird indirekt auch der Entwicklungsweg der SEC innerhalb der HPLC bzw. Biochromatographie transparent gemacht.

5.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Grundlagen der IEC wurden bereits im Kapitel 5.2.2 erläutert und treffen auch im wesentlichen für die IEC-Trennungen von Proteinen zu. Es werden auch stark und schwach basischen sowie schwach und stark saure Ionenaustauscher eingesetzt. Das Trägermaterial besitzt allerdings hier hydrophile Eigenschaften, so dass Proteine schonend und unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität gereinigt werden. Je höher die Kapazität des Ionenaustauschers ist, desto mehr Proteinmenge kann auf eine IEC-Säule aufgetragen werden. Ionenaustauscher gelten als robust und sind für gröbere Trennungen von größeren Proteinn Mengen gut geeignet.

Die IEC-Trennung wird von vielen Faktoren beeinflusst. Wichtige Größen sind neben den Typ des Ionenaustauschers seine Kapazität, der pH-Wert sowie die Art der Pufferionen und ihre Ionenstärke in der mobilen Phase.

Wenn der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins bekannt ist, können die Ionenaustauscher und die Elutionsbedingungen weitestgehend vorhergesagt werden, wie in Tabelle 5.2 gezeigt und an ausgewählten Beispielen erläutert wird.

Besitzt ein Protein z.B. einen isoelektrischen Punkt von 4, so liegt es in einem Elutionspuffer von pH = 2 als Kation und bei pH = 6 oder höher als Anion vor. Im ersten Fall sind die Carboxylgruppen nicht dissoziiert und die Aminogruppen tragen eine positive Ladung. Im anderen Fall sind die Ladungsverhältnisse umgekehrt und das Protein mit negativer Ladung kann an einem Anionenaustauscher getrennt bzw. gereinigt werden.

Für die Ionenaustauschchromatographie (IEC) von Proteinen, die selbst einen pI-Wert im basischen Bereich (pI = 10) besitzen und die mit Hilfe eines Puffers (pH-Wert = 12) auf eine negative Ladung eingestellt sind, bieten sich somit auch schwach saure Kationenaustauscher an.

Tabelle 5.2 Auswahl des Ionenaustauschers in Abhängigkeit der Ladung des Proteins

pI Protein	pH des Puffers	Ladung des Proteins "P"	Art und Ladung des Ionenaustauschers
4	2	Kation (P^+)	Starker saurer Kationenaustauscher (SA-CE ⁻)
4	6	Anion (P^-)	Starker basischer Anionenaustauscher (SB-AE ⁺)
10	8	Kation (P^+)	Schwach basischer Anionenaustauscher (WB-AE ⁻)
10	12	Anion (P^-)	Schwach saurer Kationenaustauscher (WA-CE ⁻)

(SA-CE⁻): strongly acid cation-exchanger
 (SB-AE⁺): strongly basic anion-exchanger
 (WB-AE⁻): weakly basic anion-exchanger
 (WA-CE⁻): weakly acid cation-exchanger

5.3.4 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie

Eine schonende Trennung von Proteinen erfolgt auch durch milde hydrophobe Wechselwirkungen (HIC: *hydrophobic interaction chromatography*) mit wässrigen (physiologischen) Flüssigkeiten als Elutionsmittel.

Herkömmliche Reversed-Phase-Materialien sind zu hydrophob, um Proteine allein mit wässrigen mobilen Phasen zu eluieren. Dies würde nur mit entsprechenden Zusätzen organischer Lösungsmittel gelingen, die jedoch denaturierend auf Proteine wirken und demzufolge in der Regel für biochromatographische Trennungen ungeeignet sind.

Speziell für die Hydrophobchromatographie (HIC) wurden stationäre Phasen entwickelt, deren Hydrophobizität gegenüber RP-Materialien nur ca. 10% beträgt. Meist werden weitporige hydrophile Gelfiltrationsmaterialien mit gebundenen schwach hydrophoben Alkylgruppen, z.B. der Serien Butyl-G 3000 SW oder auch Phenyl-G3000 SW, Phenyl- und Alkylsuperose oder Fractogel TSK Butyl-650, eingesetzt. Fast alle Proteine enthalten hydrophobe Bereiche (gekennzeichnet mit „C“ in Abbildung 5.22) an ihrer Oberfläche, die durch die Anwesenheit entsprechend hydrophober Aminosäuren (s. a. Abbildung 2.4 und 2.5 in Abschnitt 2.1.1) resultieren.

Sowohl die hydrophile Trennmatrix als auch die Proteine selbst sind von Hydrathüllen umgeben, wobei in den hydrophoben Bereichen beider die Wassermoleküle abgestoßen werden und kaum Hydratisierungen erfolgen.

In wässrigen Lösungen assoziieren die hydrophoben Bereiche der Proteine mit den schwach hydrophoben Oberflächengruppen der HIC-Trennphasen. Dadurch werden die Hydrathüllen der Trennmatrix und des Proteins zu einer gemeinsamen Hydrathülle umorientiert.

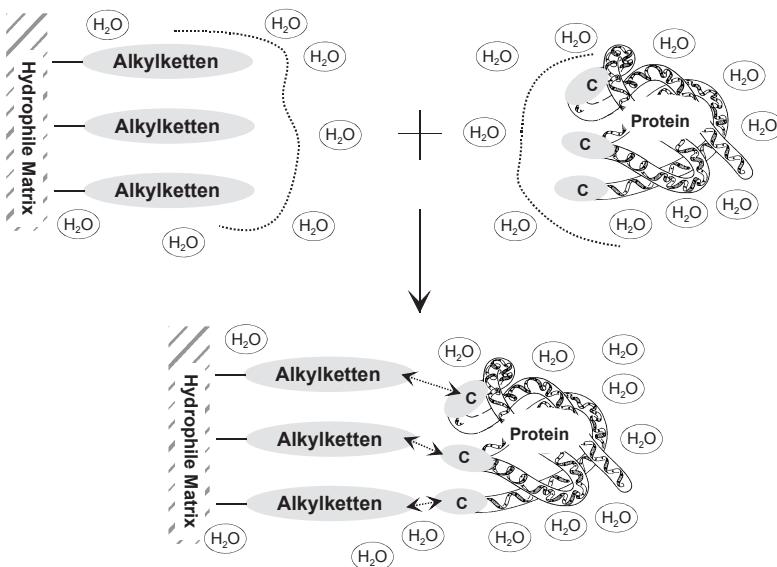


Abb. 5.22 Hydrophobe Wechselwirkungen

Das Assoziationsbestreben ist von der Hydratisierung und den im Wasser gelösten Salzen (Ionen) abhängig.

Es gibt wässrige Lösungen, die Ionen in hoher Konzentration enthalten, die die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der HIC-Trennphase stabilisieren und verstärken. Andererseits haben chaotrope Salze die Eigenschaft, hydrophobe Wechselwirkungen zu verringern. Eine Reihenfolge von Kationen und Anionen hinsichtlich ansteigender Affinität zur Stabilisierung der hydrophoben Wechselwirkungen geht aus Abbildung 5.23 hervor.

Die herausgestellten Phänomene bilden die Grundlage der Hydrophobchromatographie von Proteinen unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität.

Die Proteine werden bei dieser Technik durch eine sehr hohe initiale Salzkonzentration (ca. 1–2 M Ammoniumsulfat) zu Beginn der Elution am Kopf der HIC-Säule ausgefällt (präzipitiert) und in ihren milden hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase (siehe Situation 1 in Abbildung 5.24) durch dieses Salz stabilisiert.

Zunehmende Affinität für hydrophobe Wechselwirkungen →

Kationen : $\text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Li}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{RB}^+ < \text{NH}_4^+$

Anionen : $\text{SCN}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{PO}_4^{3-}$

Abb. 5.23 Ionen für die Hydrophobchromatographie

Im Folgenden wird mittels Gradientenelution der Gehalt an Ammoniumsulfat (Puffer A) im Eluenten durch Anstieg des prozentualen Anteils von verdünntem Phosphateluuenten (Puffer B) verringert, wie in Situation B dargestellt ist.

Das führt zur Minderung der hydrophoben Wechselwirkungen und damit zur selektiven kontinuierlichen Ablösung der Proteine von der Säule.

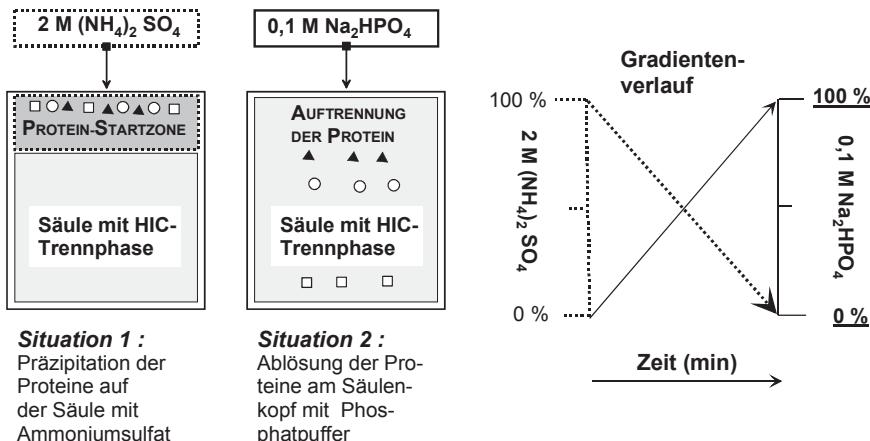


Abb. 5.24 Prinzip der Hydrophobchromatographie

5.3.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie (AC: *affinity chromatography*) ist die spezifischste biochromatographische Trennmethode, die in den 1960-er und 1970-er Jahren innerhalb der klassischen LC und später für die HPLC/FPLC entwickelt wurde.

Grundlage der Methode sind Liganden (funktionelle Gruppen), die meist über eine flexible Molekülgruppe („Abstandshalter“ bzw. Spacer) an eine Matrix (z.B. ein hydrophiles Affinitätsgel) kovalent gebunden sind und mit Biomolekülen (Proteinen) biospezifische Wechselwirkungen eingehen.

Als biologisch aktive Liganden werden u.a. Antigene, Lektine, Rezeptoren, Enzyme oder Hormone an die Trägermatrix immobilisiert. Der Molekülaufbau und die physiko-chemischen Eigenschaften der Liganden sind so gewählt bzw. „konstruiert“, dass es den Bindungsmöglichkeiten der Probemoleküle möglichst ideal entspricht. Gebundene Enzyme zeigen Wechselwirkungen z.B. mit Inhibitoren, Lektine mit Glycoproteinen oder Antikörper mit Antigenen. Umgedreht fungieren Antigene auch als Liganden zur Reinigung von Antikörpern.

Eine affinitätschromatographische („AC-LC“) Trennung kann anschaulich mit dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ dargestellt werden (Abbildung 5.25).

Das Beispiel im Säulen-Modell zeigt, dass nur ein bestimmter Antikörper aus einer komplexen Probemischung ganz spezifisch an den Liganden (das Antigen) der Matrix „ankoppelt“. Das kann über verschiedene Bindungsarten erfolgen.

Dazu gehören auch Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen, ionische Interaktionen, z.T. auch milde hydrophobe Wechselwirkungen und biospezifische Bindungen. Andere Moleküle (z.B. Zucker, Hormone oder auch Antikörper mit abweichender Struktur) werden nicht spezifisch gebunden und mit der mobilen Phase sofort von der Säule eluiert.

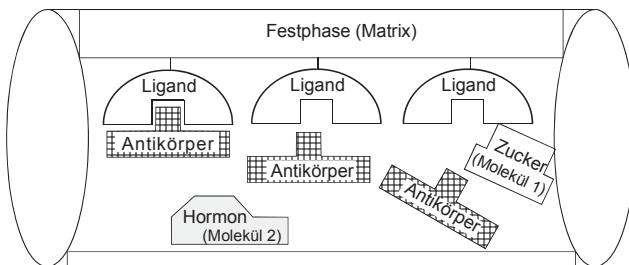


Abb. 5.25 Prinzip der Affinitätschromatographie

Danach wird ein neuer Puffer eingesetzt, der z.B. auf Grund eines veränderten pH-Wertes oder einer anderen Ionenstärke die spezifische Bindung zwischen Antikörper und Ligand entkoppelt, so dass das Biomolekül möglichst unverzögert und „schlagartig“ eluiert werden kann.

Aus sterischen Gründen können jedoch die großvolumigen Biomoleküle meist nicht direkt an den Liganden binden, weshalb langketige Spacer zwischen Matrix und Ligand eingebaut werden (Abbildung 5.26).

Als Matrixmaterial wird Polyarylamid oder bevorzugt die hydrophile Agarose (1), die zahlreiche Hydroxylgruppen auf ihrer Oberfläche trägt, verwendet. Ein geeignetes Diamin (2: z.B. Hexamethylendiamin) dient als Spacer und wird mit Hilfe von Bromcyan durch ω -Aminoalkylierung an die Agarosematrix kovalent gebunden (3: aminoalkylierte Agarose). Im zweiten, davon vorerst unabhängigen Reaktionsschritt, wird die Carboxy-gruppe eines spezifischen Liganden (R) durch ein wasserlösliches Carbodiimid (5) aktiviert und es entsteht die Carbodiimid-aktivierte Carboxygruppe mit dem Liganden R (6).

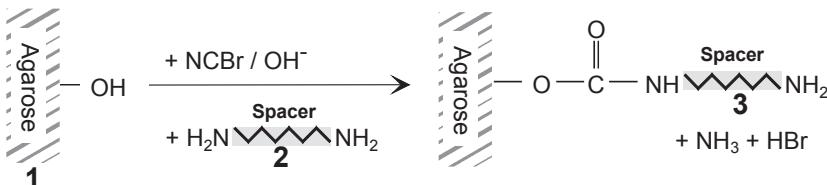


Abb. 5.26 Kopplung der Agarose (1) mit einem Diamin (2) zur aminoalkylierten Agarose (3)

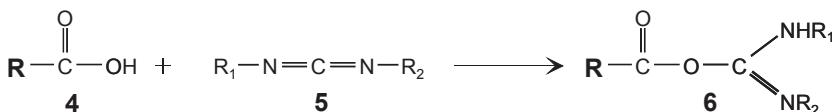


Abb. 5.27 Aktivierung der Carboxygruppe (4) des Liganden (R) mittels Carbodiimid (5)

Diese Verbindung reagiert in einer weiteren Reaktion, die hier nicht dargestellt ist, mit der aminoalkylierten Agarose (3: s. Abbildung 5.26) zu dem gewünschten Affinitätsgel (7: s. Abbildung 5.28).

Die Struktur des Liganden kann sehr verschieden sein. Im Prinzip kann jeder Ligand an das Affinitätsgel Agarose durch diese oder andere Reaktionsmechanismen gekoppelt werden.

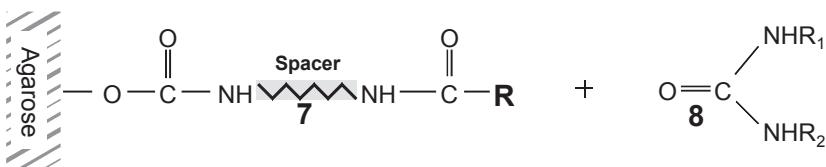


Abb. 5.28 Agarose-Affinitätsgel + Spacer + Ligand (7), Reaktionsprodukt (8)

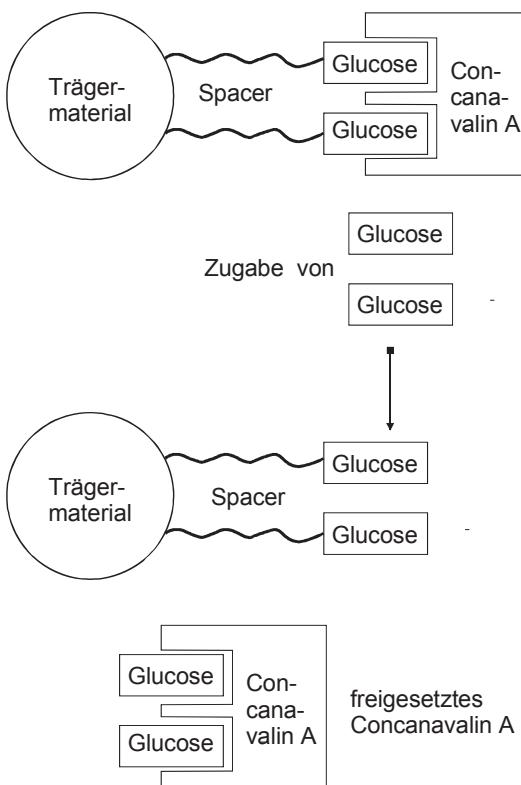
5.3.6 Lektinchromatographie

Als Liganden besitzen sogenannte Lektine hohe Zuckerspezifitäten, weshalb sie für die Reinigung von Glycoproteinen sowie von mono- und oligomeren Kohlenhydratstrukturen (Oligosaccharide) besonders geeignet sind.

Der Name Lektine (lat.: legere: auswählen) wurde von Boyd schon 1954 für diese zuckerbindenden Proteine geprägt, da sie verschiedene Blutgruppen unterscheiden können. Lektine binden sogar spezifisch ganz bestimmte Kohlenhydratsequenzen, was vor allem bei der Isolierung von einzelnen Glycoproteinen aus komplexen Matrices ausgenutzt wird.

Das Concanavalin A (Con A) z.B. besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu manosehaltigen Strukturen und wird für die affinitätschromatographische Reinigung von Glycoproteinen des „High-Mannose-Typs“ (Abschnitt 2.3.1.1) eingesetzt. Dieses Lektin kann auch umgekehrt an einer mit Glucose gekoppelten Affinitätsmatrix gereinigt werden (Abbildung 5.29).

Con A besitzt eine hohe Affinität zu Glucose, die an einen hydrophilen Träger direkt oder über einen Spacer kovalent gebunden ist. Andere Moleküle binden (fast) nicht und werden eluiert.

**Abb. 5.29** AC von ConA

Erst wenn eine glucosehaltige Lösung durch die Affinitätssäule gefördert wird, kann das Concanavalin A auf Grund seines Bindungsbestrebens zu diesem Zucker von der Säule eluiert und freigesetzt werden.

Weizenkeimagglutinin (WGA) erkennt besonders gut Molekülstrukturen mit N-Acetylglucosamin. Das Lektin *Ricinus communis* Agglutinin (RCA) bindet sehr gut an Zucker- oder Proteinstrukturen, die viel Galactose enthalten.

5.3.7 Metallchelatchromatographie (IMAC)

Chelatkomplexe oder nur „Chelate“ sind Komplexverbindungen, bei denen ein mehrzähniger Ligand mindestens zwei Koordinationsstellen (Bindungsstellen) des Zentralatoms einnimmt. Dieser Ligand verfügt über mehr als ein Elektronenpaar und wird als Chelator (griech.: „Krebsschere“) bezeichnet.

Zentralatome sind i.d.R. zweifach positiv geladene Metallionen vom Eisen oder Kupfer (Fe^{2+} oder Cu^{2+}).

Die Liganden und das Zentralatom sind über koordinative Bindungen miteinander verknüpft, d. h., dass das bindende Elektronenpaar nur vom Liganden bereitgestellt wird.

Die Metallchelatchromatographie (IMAC: *immobilized metal ion affinity chromatography*) ist ein Spezialmechanismus der Affinitätschromatographie.

Ihre häufigsten Einsatzgebiete sind Isolierungen von heterolog exprimierten Proteinen. Die Methodik der Metallchelatchromatographie basiert auf der Tatsache, dass Proteinmotive mit mehreren Histidin- oder Cystidin-Resten in geeigneter Anordnung an stationäre Phasen andocken, die kovalent Metallchelate gebunden haben.

Gemeinsam mit Arginin und Lysin zählt Histidin (Abb. 5.30) zu den basischen Aminosäuren, zusammen mit Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zu den aromatischen Aminosäuren. Cystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure (siehe im Kapitel 2 die Abb. 2.6).

In der rekombinanten DNA-Technologie wird besonders häufig die Nickel-Chelatchromatographie eingesetzt. Proteine, die *N*-terminal oder *C*-terminal mit einem His6-Tag fusioniert sind, werden über Säulen isoliert, die Ni²⁺ an einem Nitrilo-Tri-Essigsäure-Rest (Abb. 5.31) gebunden haben. Ni²⁺ kann im Austausch gegen Wasser mit 2 Histidin-Resten des Proteins interagieren (Abb. 5.32, 5.33).

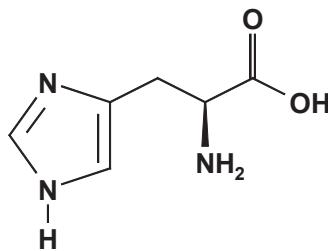


Abb. 5.30 Histidin

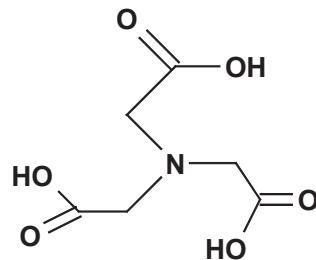


Abb. 5.31 Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA)

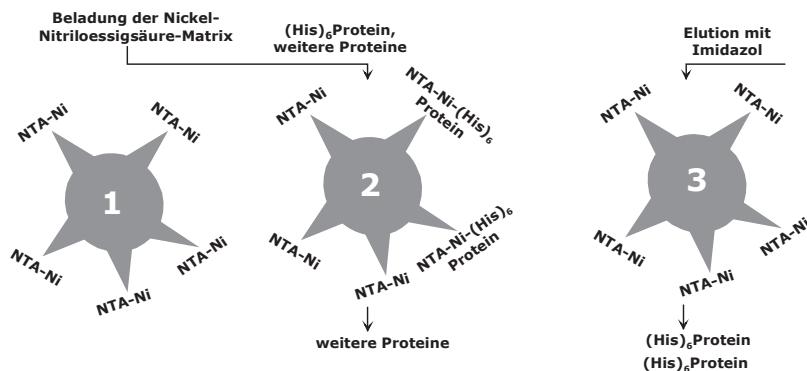


Abb. 5.32 Prinzip der Nickel-Chelatchromatographie

Eluiert wird bei diesem Verfahren entweder mit einer Imidazol-Lösung im so genannten Batch-Verfahren oder, was meistens zu weniger verunreinigten Eluaten führt, mit einem Imidazol-Gradienten.

Auch durch eine Veränderung des pH-Wertes kann das Protein von der Säule eluiert werden, was aber mitunter zur Denaturierung des Proteins führt.

Die Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (NTA-Ni; Situation 1, weiße Ziffer, in Abb. 5.32) wird mit Proteinen beladen, die ein Sequenzmotiv aus sechs Histidin-Resten (His-Tag) tragen. Diese Bindung der (His)₆-Proteine ist sehr spezifisch und ermöglicht einen sehr effizienten Reinigungseffekt. Andere Proteine, die an der Trennphase nicht binden können, werden mit dem Totvolumen eluiert (siehe Situation 2, weiße Ziffer).

Durch einen Imidazol-Gradienten werden diese Protein-Species von der Säule abgelöst und als sehr homogene Proteinfraktion eluiert (Situation 3, weiße Ziffer).

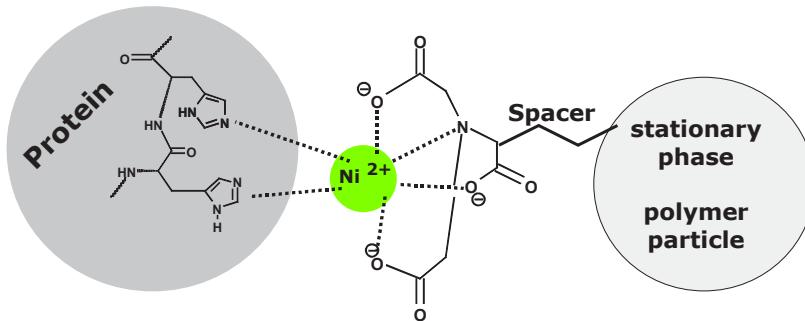


Abb. 5.33 Interaktion Protein mit stationärer Phase bei der Nickel-Chelat-LC

5.3.8 Kovalente Chromatographie

Die kovalente Chromatographie (CC: *covalent chromatography*) wurde bereits 1973 von Brocklehurst eingeführt und dient zur Trennung und Isolierung von schwefelhaltigen Proteinen und Peptiden insbesondere in biologischen Matrices.

Im Gegensatz zu den üblichen Trennmechanismen in der Biochromatographie, die z.B. auf nichtkovalenten biospezifischen (AC), hydrophoben (HIC) oder ionischen (IEC) Interaktionen beruhen, werden innerhalb der „Kovalenten Chromatographie“ feste Bindungen zwischen den Thiolgruppen der Probemoleküle und den funktionellen Gruppen (Disulfidbrücken) einer stationären Phase geknüpft und wieder gelöst. Dies wird als Thiol-Disulfid-Wechselwirkung bezeichnet.

Die Herstellung von geeigneten stationären Phasen, deren Matrix aus vernetzter Agarose (Sepharose), Cellulose, Dextran, Polyacrylamid, porösem Glas oder Silicagel bestehen kann, erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst werden die Hydroxylgruppen des Chromatographieträgers mit Bromcyan aktiviert, wie am Beispiel des Polysaccharids Sepharose 4B in Abbildung 5.34 dargestellt ist.

Anschließend wird das aktivierte Trägermaterial mit Glutathion umgesetzt (Abbildung 5.35). Die Thiolgruppe des Glutathions reagiert mit 2,2'-Dipyridyldisulfid (2-Py-S-S-2-Py) unter Bildung eines Sepharosegels mit gemischtem Disulfid, das als Sepharose-(Glutathion-2-Pyridyldisulfid) bezeichnet wird, und dem 2-Thiopyridon (Abbildung 5.36).

Peptide und andere Biomoleküle, die SH-Gruppen enthalten (PSH), können mit den Disulfidgruppen dieser stationären Phase in Wechselwirkungen treten, die zur Ausbildung von kovalenten Bindungen führt (Abb. 5.37).

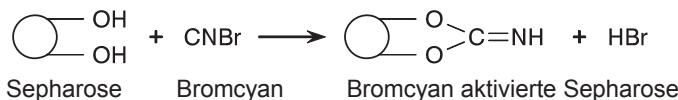


Abb. 5.34 Bromcyanaktivierung des Trägermaterials

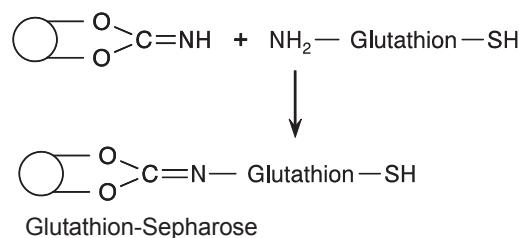


Abb. 5.35 Kopplung von GSH

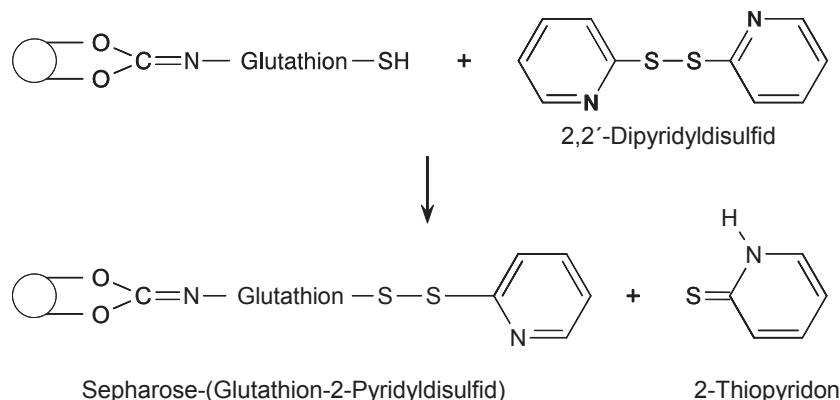


Abb. 5.36 Reaktion der Thiolgruppe des Sepharose-Glutathion-Konjugates mit 2-Py-S-S-2-Py

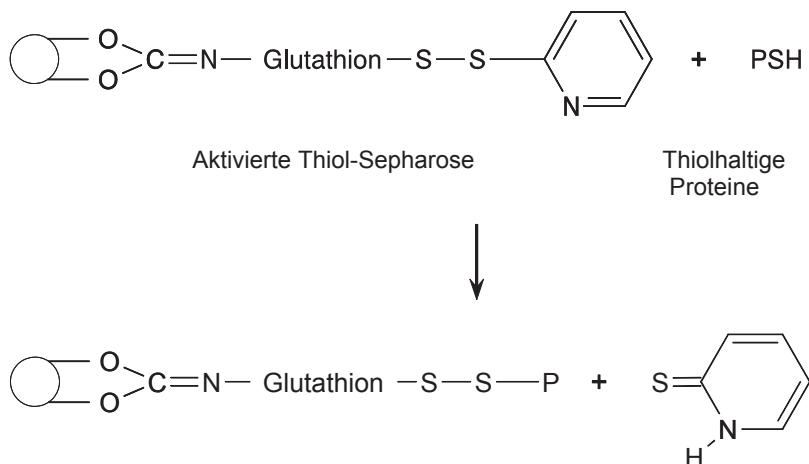


Abb. 5.37 Kovalente Bindung thiolhaltiger Proteine an die aktivierte Thiol-Sepharose

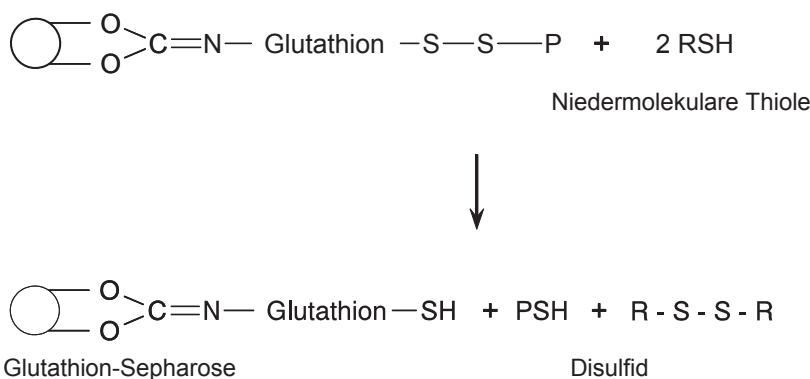


Abb. 5.38 Ablösung thiolhaltiger Proteine von der aktivierte Thiol-Sepharose

Die Elution des gesamten Proteingemisches an der aktivierten Thiolsepharose wird z.B. mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer im pH-Bereich um 7–8 mit Zusatz von ca. 0,3 M NaCl und 1 mM EDTA durchgeführt. Die anschließende Elution der Säule mit einem niedermolekularen Thiol (Abb. 5.38) wie Dithiotreitol (RSH) bewirkt die Ablösung der kovalent gebundenen thiolhaltigen Proteine von der stationären Phase, die in den Ausgangszustand der Glutathion-Sepharose-Matrix zurück überführt wird. Das Ablösen unterschiedlich stark gebundener thiolhaltiger Proteine kann dabei durch Änderung der Konzentration oder der Art des Thiols erfolgen.

Nach erneutem Aktivieren mit 2,2'-Dipyridyldisulfid ist das Trägermaterial für eine weitere kovalente Trennung einsetzbar (sequentielle Elution).

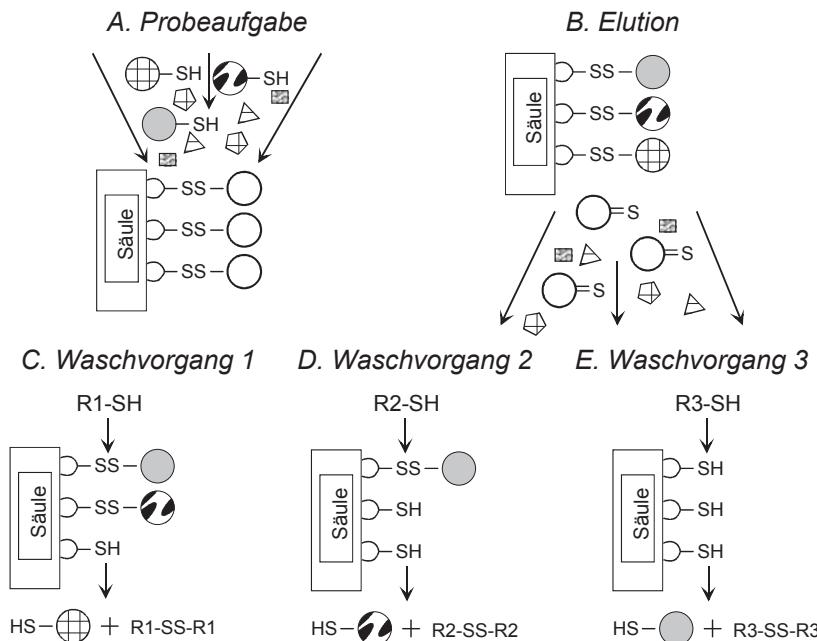


Abb. 5.39 Schematische Darstellung des kovalenten Chromatographie-Prozesses

Erläuterung der Symbole zu den Abbildungen in 4.58:

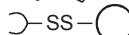
Thiolhaltige Proteine:



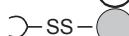
Fremdsubstanzen:



Aktivierte Thiol-Sepharose:



Gebundene Proteine:



2-Thiopyridon:



Niedermolekulare Thiole:



Glutathion-Sepharose:



Thiolhaltiges Protein 1:



Disulfid-Molekül 1:



5.3.9 Chromatographie an porösen Glaskugeln

Sogenannte D nnenschichtteilchen (PLB's: *porous layer beads*) bestehen aus einem unporösen Kern, der mit einer dünnen Schicht (1–3 µm) eines chromatographisch aktiven Materials (Polymer, Silicagel mit funktionellen Gruppen)  berzogen ist. Die Oberf  che wird von der mobilen Phase nicht abgelöst, d.h., ein Ausbluten der stationären Phase findet nicht statt. Das kugelförmige inerte Trennmaterial wird trocken in eine Trennsäule gepackt.

Der dünne Film auf der Teilchenoberfläche bietet den Vorteil kleiner Diffusionskoeffizienten und einen schnellen Stoffaustausch für die Probemoleküle mit der stationären Phase. Damit können sehr schnelle und effiziente Trennungen erzielt werden.

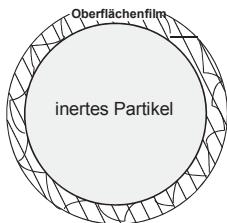


Abb. 5.40 Porous Layer Beads

5.3.10 Perfusionschromatographie

Die Perfusionschromatographie („PC“: *perfusion chromatography*) wird im Vergleich zu den anderen biochromatographischen Methoden relativ wenig angewandt.

Die stationäre Phase besitzt Durchflusssporen, in die Proteine hinein eluiert werden. Durch relativ hohe Flussraten werden sehr schnelle Trennungen innerhalb weniger Minuten und darunter erreicht. Die Partikel verfügen über funktionelle Gruppen, die zur selektiven Trennung beitragen. Bevorzugte Anwendungsgebiete sind Trennungen von Enzymen, Antikörpern, Oligonukleotiden und Peptiden.

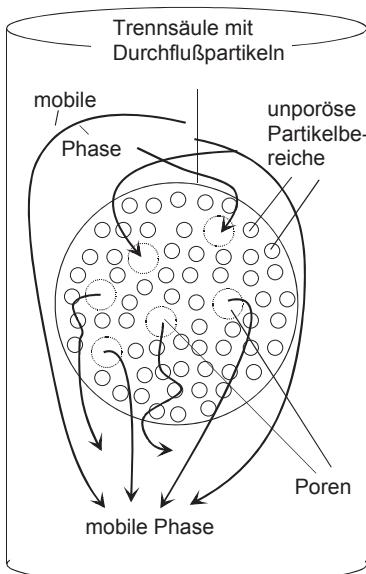


Abb. 5.41 Perfusionschromatographie

5.4 Literatur

- Lottspeich F, Engels J (2012) Bioanalytik, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Gey MH (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag
- Renneberg R (2009) Bioanalytik für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag
- Helm M, Wölfel S (2007) Instrumentelle Bioanalytik, Wiley-VCH
- Weiß J (1991) Ionenchromatographie, VCH-Verlag Weinheim
- Cunico RL et al. (1998) Basic HPLC and CE of Biomolecules, Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, CA
- Venn RF (2008) Principle and Practice on Bioanalysis, CRC Press
- Kleber H-P, Schlee D, Schöpp W (1997) Biochemisches Praktikum, Gustav Fischer Verlag
- Geckeler KE, Eckstein H (1998) Bioanalytische und biochemische Labormethoden, Viehweg Verlag Braunschweig Wiesbaden
- Holtzhauer M (1995) Biochemische Labormethoden, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Anspach B, Gierlich HU, Unger KK (1988) J Chromatogr 443:45
- Gey MH (1988) Acta Biotechnol 8:197
- Gey MH, Klossek P, Becker U (1990) Acta Biotechnol 10:459
- Gey MH, Rietzschel A, Nattermüller W (1991) Acta Biotechnol 11:105
- Gey MH, Unger KK, Battermann G (1996) Fresenius J Anal Chem 356:339
- Gey MH, Unger KK (1996) Fresenius J Anal Chem 356:488
- Kabzinski AKM, Takagi T (1995) Biomed Chromatogr 9:123
- Kirkland JJ (1975) Chromatographia 8:661
- Mohr P, Pommerening K (1985) Affinity chromatography: Practical and theoretical aspects Marcel Dekker New York
- Regnier FE (1991) Nature 350:634
- Pirkle WH, Pochapsky TC (1989) Chem Rev 89:347
- Schwedt G (1995) Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Welsch Th (1986) Habilitationsschrift, Universität Leipzig
- Snyder LR, Kirkland JJ (1979) Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons New York
- Turkelson VT, Richards H (1978) Anal Chem 50:1420
- Tswett MS (1906) Ber dtsch bot Ges 24:385
- Vonk N, Baars BGJ, Schaller H (1990) Troubleshooting in der HPLC, Birkhäuser Verlag, Basel

Erfolg kann jeder haben,
Neid -
muss man sich hart erarbeiten.

Verfasser unbekannt

6 Chromatographie-3: LC/HPTLC – GC

6.1 Einführung und Systematik

Die klassische Säulenflüssigchromatographie (LC) wurde zeitlich betrachtet zuerst entwickelt (M. S. Tswett 1903). Danach folgten die methodischen Entwicklungen zur Dünnschichtchromatographie (Ismailow, Schraiber, 1938). Im Jahre 1941 führten Martin und Syngle die Verteilungschromatographie an wasserbeladenem Silicagel ein. Martin war es auch, der zusammen mit James 1952 die Gasflüssig-Chromatographie etablierte.

Alle drei Methoden konnten zu Beginn nur in ihren klassischen Formen praktiziert werden. D.h., es waren relativ großvolumige Trennsysteme mit großen Partikeln und vergleichsweise großen Mengen an mobiler Phase erforderlich, die Analysenzeiten waren lang (Stunden, z.T. Tage), die Trenneffizienz und die Empfindlichkeiten zum Nachweise der Analyte gering. Die Methoden standen auch in einer gewissen Konkurrenz – ihre Bedeutung, Leistungsfähigkeit, Anwendungsbreite und „Anwendungstiefe“ wechselten in Abhängigkeit der wissenschaftlichen und methodischen Fortschritte innerhalb im Lauf der Zeit.

Der Durchbruch der klassischen Gaschromatographie gelang durch die Entwicklung der Kapillargaschromatographie (*capillary gas chromatography*, CGC) und auch auf Grund der günstigen Kopplungsmöglichkeit mit der Massenspektrometrie (CGC-MS).

Mit der Entwicklung der HPLC (*high performance liquid chromatography*) wurden die Nachteile der klassischen LC überwunden. Theoretische Überlegungen, dass nur kleinste Partikel (5 µm) effiziente und schnelle Trennungen ermöglichen, die Realisierung ihrer praktischen Herstellung und das Betreiben in „Hochdrucksäulen“ waren die Grundlage des Durchbruchs.

Ähnliches gilt auch für den Übergang von der DC zur HPTLC (*high performance thin layer liquid chromatography*). Kleinste Partikel verbesserten die Trennungen mit diesem Flachbettverfahren deutlich.

Der Zusatz „HP“ wurde nun allen Methoden zu Teil bzw. angehangen und rückte die gesteigerte Leistung (*high performance*) der Methoden in vielerlei Hinsichten in den Vordergrund. Dazu gehören das Erzielen hoher theoretischer Bodenzahlen bzw. niedriger Trennstufenhöhen. Sehr geringe Empfindlichkeiten (z.T. im Spurenbereich) werden erzielt. Die Methoden sind schnell (Minutenbereich) und durch hohe Peakkapazitäten können eine große Anzahl von Komponenten getrennt werden. Höherer Informationsgehalte über die zu analysierenden Analyte werden vor allem durch Kopplungen mit der Massenspektrometrie erreicht.

6.2 DC und HPTLC

Die Dünnschichtchromatographie, DC (heute: HPTLC: *high performance thin layer chromatography*), wurde von den zwei russischen Forschern Izmailov und Schraiber im Jahre 1938 erstmals vorgestellt. Sie verwendeten zur chromatografischen Trennung eine horizontale Dünnschichtplatte, auf die sie Lösungsmittel auftropften. Diese Entdeckung wurde lange Zeit kaum beachtet.

Erst durch die Arbeiten von Stahl, der den Begriff Dünnschichtchromatographie prägte, und seinen Schülern gelang der entscheidende Fortschritt durch die (kommerzielle) Herstellung leistungsfähiger DC-Platten.

Das naturwissenschaftliche Prinzip beruht auf Wechselwirkungen von Analyten mit einer stationären und mobilen Phase, wie sie für die Säulenflüssigkeitschromatographie bereits beschrieben wurden. Die TLC ist im Gegensatz dazu ein Flachbettverfahren, d.h., die stationäre Phase befindet sich nicht in einer Säule sondern ist auf eine dünne Platte (Glas) oder Folie (Aluminium, Kunststoff) aufgetragen. Früher wurden die Platten meist selbst gegossen; heute stehen beschichtete Fertigplatten in standardisierter Qualität kommerziell zur Verfügung.

6.2.1 Trennsysteme

Als stationäre Phasen stehen polare Silicagele, chemisch modifizierte Silicagele (RP-Material, Amino-, Diol, Nitrilphasen), Aluminiumoxid (Al_2O_3), Cellulose oder auch Polyamid zur Verfügung. Während in der klassischen DC Schichten um ca. 200 µm aufgetragen wurden, die Teilchendurchmesser relativ groß und ihr Bereich weit (ca. 40–100 µm) verteilt war, werden heute in der HPTLC dünneren Schichten (um 100 µm) mit engen Korngrößenverteilungen um 5 oder 3 µm eingesetzt. Das erhöht die Trenneffizienz sehr deutlich und es können auf einer Trennstrecke von 4 cm bis zu 4 000 theoretische Böden und mehr erzielt werden.

Polare Adsorbentien wie Aluminiumoxid oder unmodifiziertes Silicagel erfordern zur Elution der TLC-Platte i.d.R. unpolare Fließmittelgemische (Petrolether, Toluol), wobei oft polare „Modifier“ (Ethanol, Ethylacetat, Aceton) in meist kleineren Mengen (10–30%) zugesetzt werden. Bei unpolaren RP-Materialien gilt für die Auswahl der mobilen Phasen das umgekehrte Prinzip. Wichtig ist auch, dass die Löslichkeit der Analyte beachtet wird.

Die Dünnschichtchromatographie dient auch als „Pilotmethode“ für die Säulenflüssigchromatographie (HPLC, FPLC). Vor allem die Fließmittel können bei Optimierungen der chromatografischen Trennungen schnell variiert und ausgetauscht werden. Die ermittelten Parameter und Eluentkombinationen sind danach leicht übertragbar auf die Verhältnisse z.B. einer HPLC-Säule. Dies betrifft meist isokratische Elutionen. Die sehr gut automatisierte Hochleistungsflüssigchromatographie verfügt andererseits über mehrere Varianten der Gradientenelution, die auch schnelle Trennoptimierungen ermöglichen. Hervorzuheben ist auch die hohe Parallelität der HPTLC-Flachbettverfahren. So können mehrere Proben (>5–10) auf einer Platte simultan entwickelt und analysiert werden.

6.2.2 Probenaufgabe, Entwicklung und Visualisierung

Das Auftragen von Probelösungen ist bei wenig automatisierten DC-Systemen sehr sorgfältig mit einer Glaskapillare auszuführen, wobei hier auch die Geschicklichkeit des Operators gefordert ist. Auf DC-Platten werden nur wenige Mikroliter mit Konzentration im μg -Bereich appliziert; in der TLC sind es nur 100–200 nl.

Ziel ist eine sehr schmale bzw. punktförmige Substanzaufgabe im Bereich der Startzone, damit die Bandenverbreiterung gleich zu Beginn der Chromatogramm-Entwicklung möglichst gering gehalten wird. Günstig ist, wenn die Substanz in einem Lösungsmittel geringer Elutionsstärke gelöst ist. Die Diffusion der Analyte aus der Probelösung in das Fließmittel verzögert sich und das Profil der Bande wird relativ schmal gehalten.

In der Abbildung 6.1 ist die Probenaufgabe schematisch dargestellt. Für Routinetrennungen oder innerhalb von Praktika haben sich einfache Bleistiftmarkierungen bewährt. Das Auftragen sollte etwa 1 cm entfernt vom unteren Plattenrand und auch in Abständen von ca. 1 cm erfolgen.

Danach wird die Platte in eine Entwicklungskammer überführt, die mit etwas Fließmittel gefüllt ist (Abbildung 6.2). Die Startzone mit Probeflecken (siehe 1) muss oberhalb des Eluentniveaus liegen. Nach Verschluss der Kammer wird die Dünnsschichtplatte entwickelt. Durch Kapillarkräfte steigt die mobile Phase nach oben und beginnt in Abhängigkeit ihrer „Affinität“ die Analyte aus der Startzone zu lösen und weiter zu transportieren. Ziel ist die Auftrennung in einzelne Substanzbanden, die sich möglichst nicht überlappen und als scharfe Flecken ausgebildet sind.

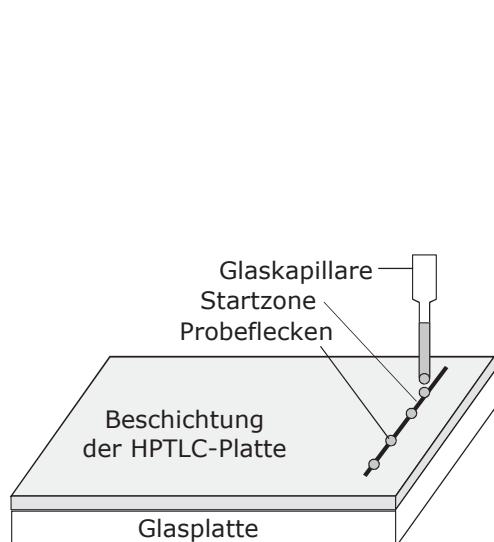


Abb. 6.1 Probenaufgabe

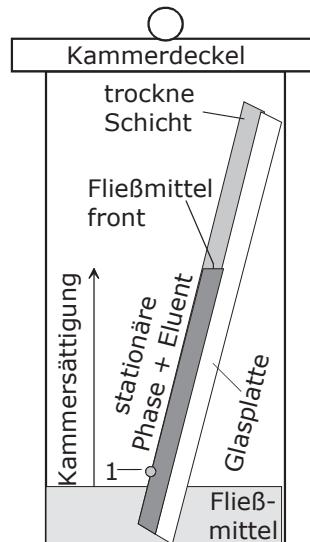


Abb. 6.2 TLC-Kammer

Bis zur Fließmittelfront ist die Kammer gesättigt. Es finden Austauschvorgänge zwischen dem Dampf im Kammerraum und der Eluentflüssigkeit der Platte statt. Im oberen Kammerteil erfolgt eine Vorbeladung bzw. sorptive Sättigung der noch trockenen stationären Phase.

Nachdem die Fließmittelfront ca. 70% der Gesamtstrecke durchlaufen hat, wird der Trennvorgang durch Herausnehmen der Platte beendet. Diese steht nun zur Auswertung zur Verfügung. Günstig sind farbige Substanzflecken. Meist müssen jedoch spezielle Visualisierungstechniken eingesetzt werden. So können die Banden bei entsprechenden Absorptionsvermögen mit einer UV-Lampe, der Fluoreszenzdetektion oder mit Hilfe von Sprühtechniken sichtbar gemacht (Tabellen 4.5 und 4.6) werden.

Tabelle 6.1 Derivatisierungsreagenzien und UV/VIS-Detektion

Substanzgruppe	Reagenz	Wellenlänge
Aminosäuren, Peptide	4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonylchlorid	430 nm
Amine, Alkohole	3,5-Dinitrobenzoylchlorid	300 nm
Carbonsäuren	p-Nitrophenacylbromid	254 nm

Tabelle 6.2 Fluoreszenz-Detektion (Emissions-/Extinktions-Wellenlänge)

Substanzgruppe	Reagenz	$\lambda_{\text{em}} / \lambda_{\text{ex}}$
Amino-Verbindungen	Fluorescamin	390/480
SH-Verbindungen	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl-aziridin	345/540
Ketone, Aldehyde, reduzierende Zucker	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonyl-hydrazin	340/525

6.2.3 Auswertung von DC-Chromatogrammen

Meist werden die Dünnschichtplatten nur qualitativ ausgewertet oder sie dienen im Falle der präparativen DC zur Isolierung von Substanzflecken. Dazu werden entsprechende Schichtareale der stationären Phase einfach heraus gekratzt, mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert und danach weiteren analytischen Methoden zugeführt. Dünnschichtplatten ergeben ein sogenanntes inneres Chromatogramm. Als qualitatives Maß dient der Retentionsfaktor (R_f), der auch als Verzögerungsfaktor bezeichnet wird. Er ist als das Verhältnis der Wanderungsstrecke des Analyten, z_R , zur Wanderungsstrecke der mobilen Phase definiert (s: Abbildung 6.3).

$$R_f = \frac{z_R}{z_M} \quad (6.1)$$

$$R_{st} = \frac{z_R}{z_{st}} \quad (6.2)$$

Zur Erzielung besserer Reproduzierbarkeiten in der Dünnschichtchromatographie wurde ein Retentionsfaktor (R_{st}), eingeführt, der sich auf eine Standardsubstanz (z_{st}) bezieht.

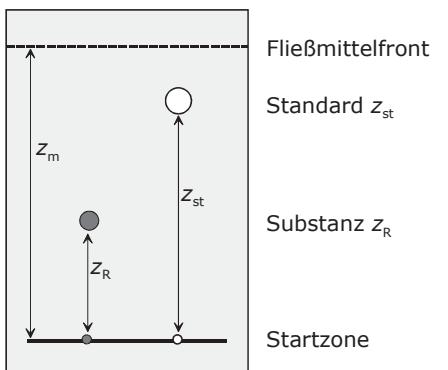


Abb. 6.3 Parameter eines inneren Chromatogramms

6.2.4 Applikationen

In der nachstehenden Tabelle 6.3 sind ausgewählte Applikationen von dünn-schichtchromatographischen Trennungen enthalten. Als stationäre Phasen dienen meist Silicagele bzw. entsprechende HPTLC-Platten. Zur Elution kommen Lösungsmittelgemische zum Einsatz. So werden Zucker (Nr. 1) mit ACN/Wasser eluiert und mit Hilfe von Naphthoresorcin-Reagenz nachgewiesen. Für Aminosäuren (Nr. 2) dient 1-Butanol/Eisessig/Wasser als mobile Phase und die Detektion erfolgt mit Ninhydrin.

Bei der Trennung von Brenzkatechin, Resorcin und Pyrogallol (Nr. 3) wird mit größeren Anteilen von Toluol gearbeitet. Darin sind diese phenolischen Verbindungen gut löslich. Zum Nachweis wird das Gibbs-Reagenz verwendet.

Mehr wasserlösliche Stoffe wie Coffein, Theobromin und Theophyllin erfordern dagegen Eluenten bestehend aus Essigsäureethylester, Methanol und Wasser (Nr. 4). Zur Erfassung dieser Species dient ein Jod-Salzsäure-Reagenz.

Etwas exotischer sind die dünn-schichtchromatographischen Analysen von Digitalis (Nr. 5), Atropin (Nr. 6) oder von Morphin (Nr. 7), für die entsprechende Trennsysteme und Detektionsmöglichkeiten in der Tabelle ausgewiesen werden.

Schließlich ist die Trennung von Vitamin C (Nr. 8) von Interesse, da die Ligandenaustrauschchromatographie an anderer Stelle (s. Kapitel 5.3.5) als Alternativmethode beschrieben wird. Auch für die anderen Applikationsbeispiele existieren zahlreiche gut automatisierte HPLC- und z.T. auch GC-Methoden.

Tabelle 6.3 Applikationsbeispiele aus der Dünnschichtchromatographie (Auswahl)

Nr.	Substanzen	Stationäre Phase/ Plattengröße	mobile Phase	Nachweis
1	Rhamnose, Xylose, Arabi- nose, Galactose	Silicagel, Si60/ 5 cm · 5 cm	ACN/Wasser (85 : 15 V/V)	Naphthoresorcin- Reagenz
2	Alanin, Valin, Leucin	Silicagel, Si60/ 5 cm · 5 cm	1-Butanol/Eis- essig/Wasser (40 ml + 10 ml + 10 ml)	Ninhydrin- Reagenz
3	Brenzkatechin, Resorcin, Py- rogallol	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Toluol/MeOH/ Eisessig (45 ml + 8 + 4)	Gibbs-Reagenz
4	Coffein, Theo- bromin, Theo- phyllin	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Essigsäureethyl- ester/MeOH, Wasser (81 ml + 8 + 4)	Iod-Salzsäure- Reagenz
5	Digitalis (Herzglycosid)	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Essigsäureethyl- ester/MeOH/ Wasser (75 ml + 10 + 15 ml)	Chloramin-Tri- cloressigsäure- Reagenz
6	Atropin, Sco- polamin	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Aceton/Was- ser/25%-iger Ammoniak (88 ml + 12 + 3 ml)	UV-Licht bei 254 nm und 365 nm
7	Morphin, Nar- cotin, Paverin, Codein	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Tolu- ol/Aceton/Ethan- ol/25%-iger Ammoniak: 40 + 40 + 6 + 2 ml	UV-Licht bei 254 nm Jodoplatinat-/Dra- gendorff-Reagenz
8	Vitamin C	Silicagel-Si60F ₂₅₄ / 5 cm · 5 cm	Isopropanol/ Wasser/Eisessig (60 ml + 40 + 2)	UV-Licht bei 254 nm

Anschaulich und beliebt für Schüler- und Studentenpraktika sind dünnschicht-chromatographische Trennungen von Blattfarbstoffextrakten aus frischen grünen Blättern (z.B. Spinat, Wintersalat). Diese enthalten Carotine, Chlorophylle und Xanthophylle, die farbige Substanzbanden auf der DC-Platte hinterlassen (s.a. Abbildung 6.3a). Die Blätter (ca. 4–5 g) werden zerkleinert und in einen Mörser überführt. Zur Neutralisation der sauren Zellflüssigkeit werden Kalziumcarbonat und zum Aufschluss der pflanzlichen Zellen Seesand hinzugefügt.

Diese Mischung wird mit Aceton versetzt und mit Hilfe eines Pistills einige Minuten im Mörser verrieben. Dabei entsteht eine dunkelgrün gefärbte, licht-, sauerstoff- und wärmeempfindliche Flüssigkeiten, die nach Filtration möglichst in einer dunklen Flasche und im Kühlschrank aufbewahrt werden soll.

Als Trennsystem dient eine mit Silicagel beschichtete DC-Platte und ein Benzin/Isopropanolgemisch (10:1 V/V). Das Auftragen des Blattfarbstoffextraktes erfolgt wie unter 6.2.2 beschrieben. Frisch aufgetragene Probe sollte anschließend in einem kalten Luftstrom getrocknet werden. Damit auch farbintensive Banden entstehen, ist das Auftragen des Extraktes mehrfach (10–15 mal) zu wiederholen.

Die Entwicklung erfolgt nun in der DC-Kammer mit Benzin/Isopropanol (s.o.) als Elutionsmittelgemisch. Das Carotin wandert dabei am schnellsten und ist oft nach Beendigung des Trennvorganges nicht mehr sichtbar. Dies betrifft auch die gelb gefärbten Banden (siehe helle Flecken in Abbildung 6.3a), die nach dem Trocknen schnell verblichen sind. Am stabilsten sind die grünen Banden (dunkle Flecken).

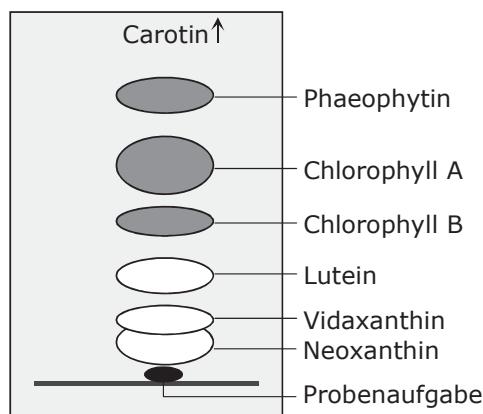


Abb. 6.3a DC-Trennung von Blattfarbstoffen (schematisch)

Für weitere Illustrationen von DC-Trennungen sind farbintensive Tintengemische oder Farbstoffe aus Filzstiften gut geeignet (Abbildung 6.3b). Die Farbe kann auch direkt mit dem Faserstift auf die Trennschicht „aufgezeichnet“ werden.

Zur Entwicklung von DC-Platten mit Silicagelschicht dienen Gemische bestehend aus Butanol, Eisessig und Wasser (40:10:50 V/V/V).

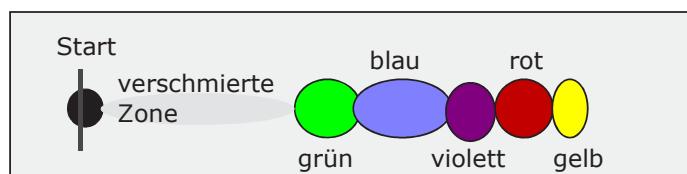


Abb. 6.3b DC-Trennung von Faserstift-Tinten (schematisch)

6.3 GC und CGC

Die klassische Gaschromatographie wurde zuerst durch Martin und James 1952 hervorgebracht, die die Gas-flüssig-Chromatographie als Methode etablierten.

Die Gaschromatographie ist ein Trennprozess, bei dem das Probengemisch (Gase oder Dampf mit leicht flüchtigen Verbindungen bzw. Analyten) zwischen zwei Phasen in einem chromatographischen Bett (hier ist es eine Säule) verteilt wird. Die eine Hilfsphase – die stationäre Phase – ruht, die andere Hilfsphase – die mobile Phase – strömt daran im chromatographischen Bett vorbei.

Für den Transport der gasförmigen Analyte werden mobile Phasen bzw. Trägergase wie Stickstoff, Wasserstoff oder Helium eingesetzt. Als stationäre Phasen für die „GC mit gepackten Säulen“ dienen feste poröse Teilchen (z.B. Kieselgur mit Partikelgrößen, dp, von 150–250 µm), die meist chemisch modifiziert sind.

In der Kapillar-GC ist die stationäre Phase an der Kapillarinnenwand z.B. als Flüssigkeitsfilm immobilisiert. Als Säulenmaterial wird hochreines Quarzglas eingesetzt (Fused-Silica-Kapillaren).

Die Gas-Fest-Chromatographie (GSC: *gas solid chromatography*) dient lediglich zur Analyse gasförmiger Analyte (z.B. verschiedene Gase aus der Luft).

Beim Einsatz von Trägermaterialien, die mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt, imprägniert oder chemisch gebunden sind, spricht man von Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC: *gas liquid chromatography*). Diese Trennprozesse sind in der GC dominierend und finden in gepackten Säulen kaum noch statt. Heute werden fast ausschließlich Kapillarsäulen dafür eingesetzt.

Substanzen können gaschromatographisch analysiert werden, wenn sie leicht flüchtig bzw. verdampfbar sind und sich beim Verdampfen nicht zersetzen.

6.3.1 Aufbau eines Gaschromatographen

Die (Kapillar)Gaschromatographie wird vor allem zur Analyse organischer Verbindungen innerhalb der Analytischen Chemie und Umweltanalytik eingesetzt. Sie zeichnet sich durch niedrige Nachweisgrenzen, hohe Strukturinformationen (Kopplung mit der Massenspektrometrie; GC-MS) und Multikomponentenanalyse (sehr hohe Trennleistung) aus. Jedoch sind nur ca. 20% aller bekannten organischen Substanzen mittels GC analysierbar, da ein Nichtzersetzen der Analyte bzw. der Probe beim Verdampfen erforderlich ist. Durch Derivatisierung kann dieser Anteil auf 25% gesteigert werden. Im Gegensatz dazu sind mittels Flüssigchromatographie (HPLC), die lediglich die Löslichkeit einer Substanz erfordert, etwa 80% der organischen Verbindungen bestimmbar.

Abbildung 6.4 zeigt den schematischen Aufbau eines Gaschromatographen. Wesentliche Module sind die Trägergasversorgung, Druck- und Strömungsregelung, das heizbares Injektionssystem, die Trennsäule mit Säulenofen, das Detektionssystem und die Auswerteeinheit.

Nähere Beschreibungen vor allem der GC-Injectionstechniken, unterschiedlich selektiver stationärer Phasen und Detektoren erfolgen in den sich anschließenden Kapiteln. Von besonderer Bedeutung ist die Kopplung GC-MS.

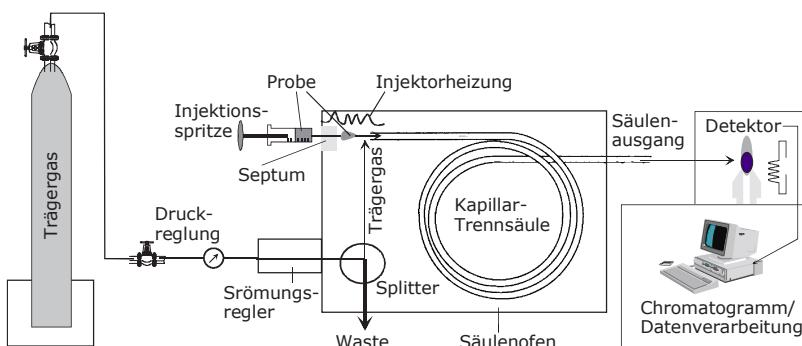


Abb. 6.4 Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen

6.3.2 Trägergase

Als Trägergas (mobile Phase) werden Inertgase wie Argon, Helium, Stickstoff, Kohlendioxid oder Wasserstoff mit guten Strömungseigenschaften eingesetzt. Zur Entfernung von Wasserspuren dienen mit Molekularsieben gefüllte Metallröhren, durch die das Trägergas hindurch strömt und getrocknet wird. Für reproduzierbare Messungen muss das Trägergas konstant gehalten werden. Die Messung der Strömungsgeschwindigkeit erfolgt am Säulenende mit Hilfe eines Seifenblasenströmungsmessers oder am Säulenanfang mittels Rotameter.

6.3.3 Injektionssysteme

Die Probeninjektion erfolgt heutzutage meist in Kombination mit einem Autosampler, der ein sequentielles Abarbeiten einer Vielzahl unterschiedlicher Proben (auch über Nacht) ermöglicht.

Die Funktionsweisen spezieller Injektionstechniken wie Headspace, Purge and Trap und Festphasenmikroextraktion wurden bereits in den Kapiteln 3.2.6 und 3.2.10 beschrieben.

Weitere Möglichkeiten zum Applizieren von Proben sind die Split/Splitless-Injektion (SSL) sowie die direkte Aufgabe des Probematerials auf die Säule (On-Column-Injektion, OCI). Außerdem werden in der GC Direktaufgabesysteme mit Ventilschaltungen und Kaltaufgabesysteme eingesetzt.

Gasproben können direkt in den Trägergasstrom appliziert werden. Flüssiges Probennmaterial muss zuerst in einem Einspritzblock verdampft werden. Dieser ist temperierbar und stellt die Verbindung zwischen Trägergasfluss und der gaschromatographischen Trennsäule her. Nach außen ist er mit einem Septum aus Silicongummi abgedichtet. Bei gepackten Säulen werden ca. 0,5 bis 15 µL Probevolumina appliziert.

In der Kapillargaschromatographie erfolgt die Teilung des Gasstroms mit einem Splitinjektionssystem (Abbildung 6.5), so dass sehr kleine Volumina (bis ca. 0,001 µL) in die Kapillare appliziert werden können.

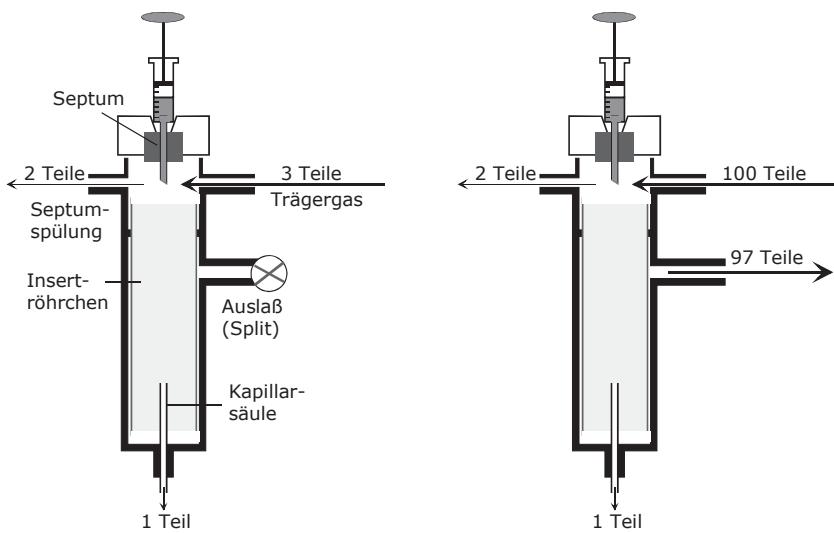


Abb. 6.5 Splitlose Injektion (links), Splitinjektion (rechts)

6.2.4 Trennsäulen und stationäre Phasen

Als Säulenmaterial wird Edelstahl oder Glas eingesetzt. Gepackte GC-Säulen sind 3 bis 6 mm dick und ca. 1 bis 3 m lang. In der Kapillar-GC wird i. d. R. hochreines Quarzglas (fused-silica-Kapillaren) verwendet. Der Innendurchmesser beträgt hier etwa 100 bis 800 µm. Die Kapillaren können Längen bis zu 100 m aufweisen (s. Abbildungen 6.6 und 6.7).

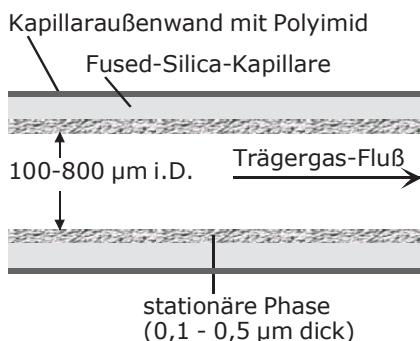


Abb. 6.6 GC-Kapillar-Säule



Abb. 6.7 „Gewundene“ Kapillartrennsäule

Die Kapillaraußewand ist mit einem dünnen Polymer (Polyimid) ummantelt. Dieses schützt das Fused-Silica-Material und verleiht der dünnen Kapillarsäule eine hohe Flexibilität. Dadurch wird die Handhabung dieser Säulen (z.B. beim Anschluss am Injektions- und Detektionssystem) wesentlich erleichtert.

Meist ist die Innenwand der Kapillaren mit einer flüssigen stationären Phase chemisch modifiziert (Abbildung 6.8, A). Diese werden als Filmkapillarsäulen (WCOT-Kapillare: *wall coated open tubular column*) bezeichnet und in der GLC eingesetzt. Aber auch feste stationäre Phasen oder Partikel, die mit stationärer Flüssigphase beschichtet sind, werden verwendet (Abbildung 6.8, B: GSC, C: GLC). Man bezeichnet das als Schichtkapillarsäulen (PLOT-Säulen: *porous layer open tubular column*, B oder SCOTT-Säulen: *support coated open tubular column*, C).

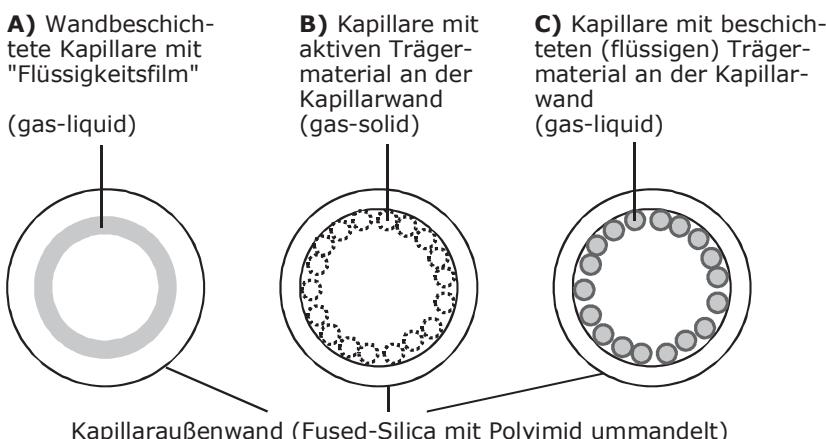


Abb. 6.8 Unterschiedlich beschichtete Kapillaren

Bei der Auswahl der Trennflüssigkeit gilt der Grundsatz „Ähnliches wird von Ähnlichem gelöst“ (*similia similibus solventur*).

Charakteristisch für polare Phasen sind CN-, C=O- oder OH-Gruppen. Diese sind gegenüber von Aminen, organischen Säuren und Alkoholen besonders selektiv. Polare Trennflüssigkeiten wie sie zu Beginn des Einsatzes von Fused-Silica-Kapillaren in der GC eingesetzt worden, sind z.B. Polymere wie Polyethylenglycole, die auch unter der Bezeichnung „Carbowachs“ geführt werden, oder Ethylenglycolsuccinat.

Zu den typischen unpolaren stationären Phasen in der GC gehören Siliconöle und Kohlenwasserstoffe, die für die Trennung von Aromaten, gesättigten oder halogenierten Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden. Beispiele spezieller Trennflüssigkeiten sind Methylsilicone (OV-1, SE-30) oder Phenylsilicone (OV-22).

In der Abbildung 6.9 sind einige Beispiele von stationären Phasen für die Kapillar-GC einschließlich ihrer Grundstruktur und des möglichen Temperaturbereiches aufgeführt.

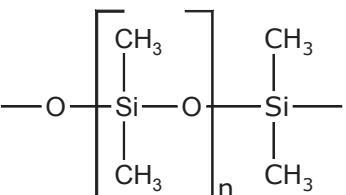
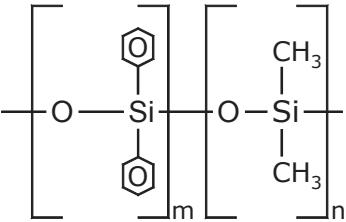
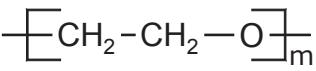
Struktur	Name/ Polarität	Temperatur- bereich
	Polydimethylsiloxan unpolar	60–320°C
	Poly-diphenyl-dimethyl-siloxan unpolar bis mittpolar	60–320°C
	Polyethylen-glycol (PEG) polar	40–250°C

Abb. 6.9 Stationäre Phasen in der Gaschromatographie

6.3.5 Detektoren

In der GC werden konzentrations- und massenstromempfindliche Detektoren eingesetzt. Bei der zuerst genannten Gruppe (Wärmeleitfähigkeitsdetektor, WLD) ist das Signal proportional zur aktuellen Konzentration eines Analyten im Detektorvolumen. Im zweiten Falle (Flammenionisationsdetektor, FID) ist das Signal proportional zum Massenstrom (Masse pro Zeit). Das bedeutet, dass bei Erhöhung der Trägergasgeschwindigkeit die einzelnen Peaks schmäler und ihre Peakhöhen größer werden, da sich nun auch die Analytmenge pro Zeit erhöht hat. Die Peakfläche (Höhe mal Breite) bleibt allerdings konstant. Im Falle des massenstromempfindlichen Detektors werden die Peaks bei größerem Trägergasfluss auch schmäler. Das Verhältnis von Substanzdampf zu Trägergas und somit die Konzentration ändern sich jedoch nicht und die Peakhöhe bleibt unverändert. Allerdings ist die Peakfläche kleiner geworden, so dass in diesen Fällen neu kalibriert werden muss.

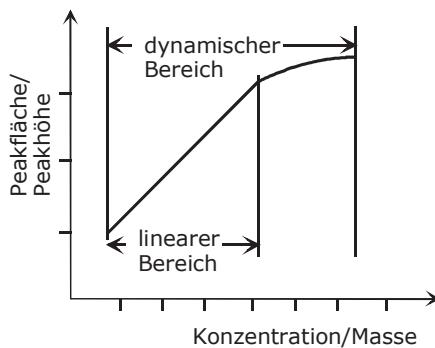


Abb. 6.10 Linearer und dynamischer Bereich eines Detektors

Wichtig für die Güte eines gaschromatographischen Detektors ist, dass er im linearen Bereich die Signale registriert (Abbildung 6.10).

Angestrebten werden auch konstant verlaufende Basislinien, wie die Applikationen in den Abbildungen 6.22 und 6.23 zeigen. Dagegen ist ein erhöhtes Rauschen und ein starker Drift der Basislinie (Abbildung 6.11, links) unerwünscht. Letzteres kann auf ein sogenanntes Säulenbluten zurückgeführt werden. Dies entsteht, wenn bei höheren Temperaturen die an der Innenwand der Kapillare immobilisierte Polymerphase geringfügig abgelöst wird und diese Substanzmoleküle die Response des Detektors stetig erhöhen.

Zur Beurteilung der Güte eines Detektors zählt auch die erreichbare Nachweisempfindlichkeit (NWG, Nachweisgrenze), die innerhalb der gaschromatographischen Spurenanalytik möglichst niedrig sein soll. Praktisch ist die NWG ein registrierter Peak, der die 2- bis 3-fache Größe des Peak-zu-Peak-Rauschens der Basislinie aufweist (vgl. Abbildung 6.11).

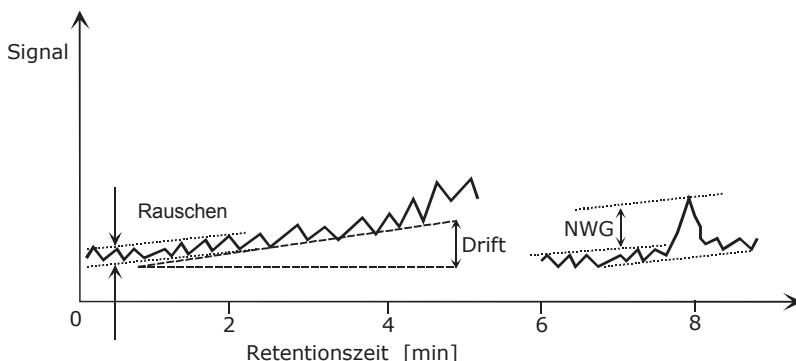


Abb. 6.11 Basislinie, Rauschen, Drift und NWG in der GC

6.3.5.1 Flammenionisationsdetektor

Der Flammenionisationsdetektor (FID) ist neben dem Massenspektrometer der am weitesten verbreitete Detektor in der Gaschromatographie. Der FID zeichnet sich durch niedrige Nachweisgrenzen, Robustheit und einen weiten linearen Detektionsbereich aus.

Die Abbildung 6.12 zeigt den Aufbau eines FID. Durch Zufuhr von Wasserstoff und Luft entsteht oberhalb der Düse eine Flamme. Bei der Verbrennung von Wasserstoff allein werden nur Radikale und keine Ionen gebildet. Daraus resultiert eine Basislinie mit sehr geringem Grundionisationsstrom (3 pA). Gelangen neben dem Trägergas auch entsprechende organische Analyte in die Flamme, die in ihrer Struktur C-H- oder C-C-Bindungen aufweisen, so werden neben Radikalen auch Ionen erzeugt.

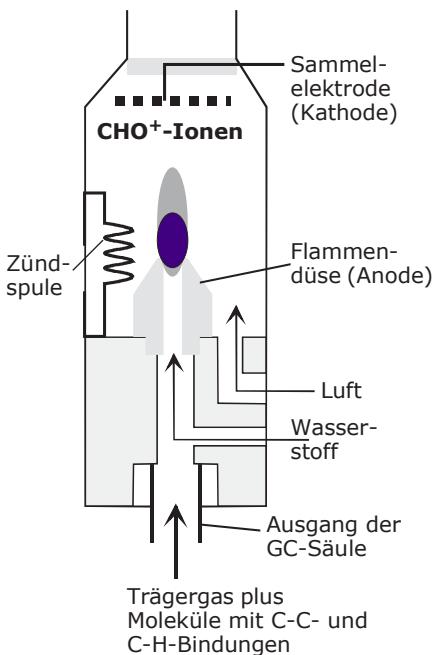
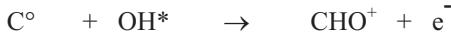
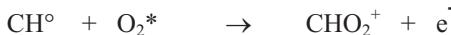
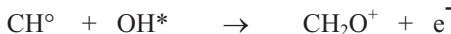
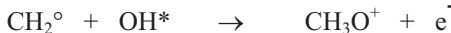


Abb. 6.12 Flammenionisationsdetektor, FID

Diese Reaktionen laufen im einzelnen wie folgt ab. Zuerst werden die organischen Komponenten mit C-H- und C-C-Bindung in der Flamme pyrolysiert und die entstandenen kohlenstoffhaltigen Radikale CH_n° ($n=0\ldots 3$) werden mit Sauerstoffmolekülen bzw. den in der Flamme daraus entstehenden OH-Radikalen oxidiert. Die sauerstoffhaltigen Verbindungen befinden sich in einem angeregten Zustand (O_2^* , OH^*) und ihre Anregungsenergie wird auf die C-haltigen Radikale (CH_3° , CH_2° , CH° , C°) übertragen.

Dies führt zur Ionisierung der intermediär gebildeten Oxidationsprodukte. Einige Reaktionsmöglichkeiten zur Bildung von entsprechenden Kationen sind:



Die Reaktionen finden mit ganz geringer Ausbeute statt. Sie beträgt ca. 2 ppm. Dass die erzielbare Empfindlichkeit trotzdem sehr hoch ist, wird auf den niedrigen Grundionisationsstrom zurückgeführt. Das FID-Signal entsteht, wenn die in der Düse durch Verbrennung erzeugten Kationen und die korrespondierenden Elektronen an der gegenüber liegenden Sammelektrode eingefangen werden.

6.3.5.2 Massenspektrometrischer Detektor

Auf Grund des geringen Trägergasflusses in Kapillarsäulen ist eine direkte Kopplung mit einem massenspektrometrischen Detektor möglich. Die kleinen Flussmengen beeinträchtigen nicht das Aufrechterhalten des Hochvakuums im MS. Ein Splitting des Gasstromes ist nur bei gepackten GC-Säulen erforderlich.

Die Analyte befinden sich nach ihrer Verdampfung im Injektor und der Auf trennung in der Fused-Silica-Kapillare auch am Säulenausgang noch im gasförmigen Zustand und werden über eine beheizte Transferkapillare in eine Ionenquelle überführt (Abbildung 6.13). Darin erfolgt meist mit der Elektronenstossionisation (s. Kapitel 11.2 und 12.4.1) die Ionisierung der Analyte, die im nachfolgendem Analysator (Trennsystem) nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis separiert werden. Als Trennsysteme dienen Ion-Trap, Quadrupol- oder TOF-Analysatoren (s. Kapitel 11.4). Als Detektor wird meistens ein Photomultiplier, ein SEV (Sekundärelektronenvervielfacher) oder ein Faraday-Auffänger eingesetzt.

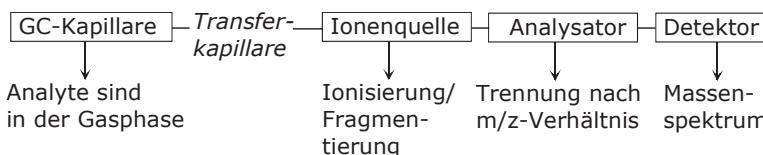


Abb. 6.13 Prinzip der massenspektrometrischen Detektion

6.3.5.3 Elektroneneinfangdetektor

Dieser als ECD (*electron capture detector*) bezeichnete Detektor ist für den Nachweis von halogenierten und schwefelhaltigen Analyten besonders selektiv und sensitiv und wird deshalb vor allem im Umweltbereich für die quantitative Spurenanalytik von polychlorierten Biphenylen (PCB's), Bioziden (Pestiziden) und POP's (*persistant organic pollutants*) eingesetzt.

Der ECD besteht aus einer Ionisationskammer mit Gaszufuhr und -auslass, der Anode und Kathode sowie einer dünnen Nickelfolie (Abbildung 6.14). Diese ist mit dem radioaktiven Isotop ^{63}Ni beschichtet und dient als radioaktive Quelle (β -Strahler). Der β -Zerfall führt zur Emission von Primärelektronen, die mit den N_2 -Molekülen des Trägergases kollidieren. Dabei entstehen positiv geladene Stickstoffmolekülionen und freie Sekundärelektronen.

Nach Anlegen einer Spannung wird ein elektrisches Feld induziert, das die freien Sekundärelektronen zur Anode bewegt. Auf diese Weise resultiert ein Strom von wenigen Nano-Amper (nA), der als Ionisationsgrundstrom bezeichnet wird. Analyte wie halogenierte Kohlenwasserstoffe (s.o.), die mit dem Trägergas in den ECD gelangen und eine hohe Elektronenaffinität besitzen, können diese freien Elektronen einfangen. Dadurch verringert sich der Ionisationsgrundstrom und eine Response (Detektorsignal) wird registriert. Mit dem ECD ist es möglich, kleinste Mengen z.B. an Lindan im Bereich von 50 fg nachzuweisen.

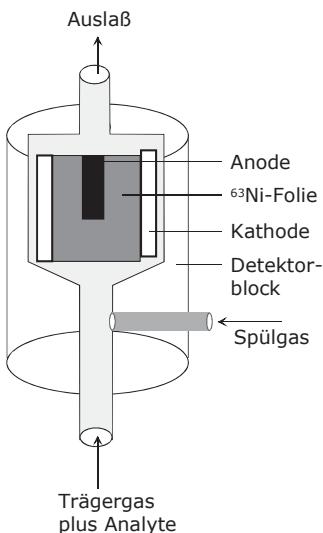


Abb. 6.14 Elektroneneinfangdetektor, ECD

6.3.5.4 Thermoionischer Detektor

Der Thermoionische Detektor (TID) ähnelt im Aufbau dem Flammenionisationsdetektor (FID) und ist vor allem für stickstoff- und phosphorhaltige Analyte („NP-Detektor“) selektiv. Anstatt einer Flamme, die im FID zur Ionisation der organischen Moleküle dient, besitzt der TID eine beheizte Keramikperle, die aus Rubidiumsilikat besteht (Abbildung 6.15).

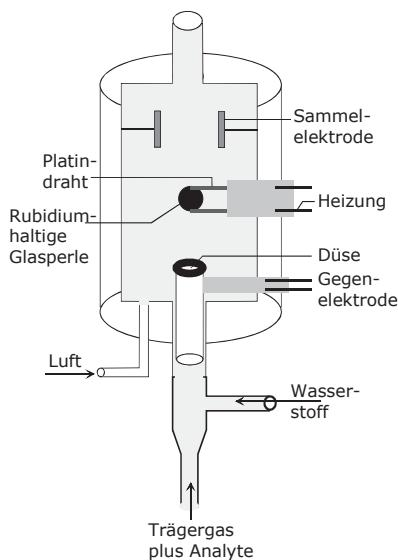


Abb. 6.15 Thermoionischer Detektor, TID

Im Gegensatz zum FID erfolgt keine Ionisierung, da der geringere Wasserstoffstrom, der die Düse verlässt, nur zur Bildung eines Niedrigtemperaturplasmas führt. Die Alkaliionen auf der Glasperle ermöglichen in Verbindung mit einer entsprechend eingestellten Temperatur die selektive Ionisation stickstoff- oder phosphorhaltiger Verbindungen. Es fließt ein Strom, der proportional zur Menge der erzeugten Ionen ist. Letztendlich sind zwei Reaktionen für die Vorgänge im Thermoionischen Detektor hervorzuheben.

Einmal erfolgt für die N- und P-haltigen Analyte an der vom Plasma umgebenen Glasperle eine Radikalbildung (Stickstoff: s. Abb. 6.15a) und danach reagieren diese Radikale mit dem Rubidiumdampf um die Glasperle herum weiter zu Ionen (Abb. 6.15b). Danach werden die Rubidiumionen von der negativ geladenen Glasperle wieder eingefangen, während die Cyanidionen direkt zur Sammellektrode wandern oder unter Freisetzung von Elektronen verbrannt werden. Die Abbildung 6.15c zeigt die Radikale, die bei Phosphorverbindungen entstehen.



Abb. 6.15a Radikalbildung, N



Abb. 6.15b Ionenbildung, N



Abb. 6.15c „Phosphor-Radikale“

6.3.5.5 Wärmeleitfähigkeitsdetektor

Der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD oder TCD: *thermal conductivity detector*) ist einer der ältesten Detektoren in der Gaschromatographie und registriert die Analyte relativ unempfindlich. Grundlage der Funktionsweise des WLD ist die kontinuierliche Messung der Wärmeleitfähigkeit des Trägergases mit der Hitzdrahtmethode.

Der Detektor (Abbildung 6.16) besteht aus einem gut thermostatisierten Metallblock mit Mess- und Vergleichszelle.

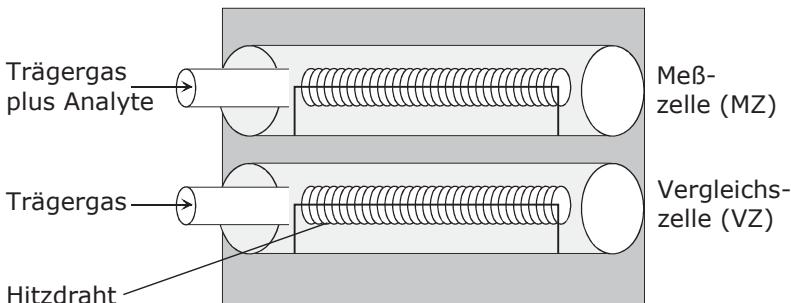


Abb. 6.16 Wärmeleitfähigkeitsdetektor, WLD

Diese enthalten spiralförmig angeordnete Hitzdrähte (Heizwendeln), die zu einer Wheatstone'schen Brückenschaltung (Abb. 6.17) zusammengeschlossen sind. Die Drähte bestehen aus Wolfram oder Platin und ihr Widerstand ist temperaturabhängig. Sie werden von elektrischem Strom durchflossen und dadurch erwärmt.

Die Messzelle wird vom Trägergas und den darin enthaltenen Analyten aus der Trennsäule durchströmt, die Vergleichszelle nur von reinem Trägergas. Die Temperatur der Heizwendeln und somit ihr elektrischer Widerstand hängt von der Wärmeleitfähigkeit der Gase ab, die die Zellen durchströmen. Veränderungen in der Zusammensetzung des Trägergases (plus Analyte) verursachen Temperaturänderungen und damit Widerstandsänderungen in den Drähten der Messzellen. Die Temperatur der Heizdrähte dagegen in der Vergleichszelle bleibt konstant. Durch die resultierende Temperaturdifferenz der Heizwendeln in der Mess- und Vergleichszelle entsteht ein messbarer Spannungsunterschied. Die Signale sind der Probenkonzentration im Trägergas proportional.

Als Trägergase werden hauptsächlich Helium oder Wasserstoff eingesetzt, da ihre Leitfähigkeit ca. 5–10 mal größer ist als andere Gase bzw. die nachzuweisenden Analyte. In der Abbildung 6.18 ist dieser Sachverhalt nochmals anhand der Wärmeleitfähigkeit im Vergleich zu anderen Gasen wie Argon, Stickstoff, Methan, und Neon schematisch dargestellt. Praktischerweise ist hier die Wärmeleitfähigkeit im Bereich von 0 bis 2 000 J/cm · s · K aufgetragen.

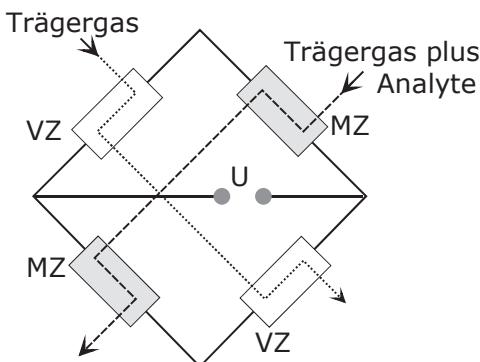


Abb. 6.17 Wheatstone'sche Brückenschaltung

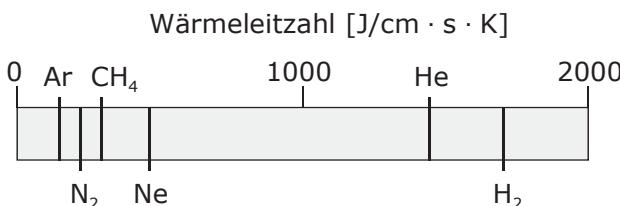


Abb. 6.18 Wärmeleitfähigkeit verschiedener „Gase“

6.3.5.6 GC-Detektoren im Vergleich

Die gaschromatographischen Detektoren werden i.d.R. innerhalb der organischen Spurenanalytik eingesetzt. Eine gewisse Ausnahme bildet der WLD, der nur geringe bzw. mittelmäßige Empfindlichkeiten aufweist. Seine Nachweisgrenze (NWG) liegt bei ca. 1 µg und die Einsatzgebiete erstrecken sich hauptsächlich auf die Analytik von Gasen (Bodenluft, Bio- und Deponiegase).

Für den weit verbreiteten FID werden 1 ng als NWG angegeben. Seine Applikationsgebiete liegen vorrangig in der Analytik von Kohlenwasserstoffen/Aromaten und Lösungsmitteln. Der für stickstoff- und phosphorhaltige Analyte selektive thermoionische Detektor (TID) ist gut geeignet für den sensitiven (ca. 10 pg) Nachweis von Pflanzenschutzmitteln. Dies trifft auch für den ECD zu, dessen Nachweisgrenze bei nur einem Picogramm (1 pg) liegt. Weitere Applikationsgebiete sind leicht- und schwerflüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe.

Massenselektive GC-Detektoren besitzen Nachweisgrenzen bis zu einem Femtogramm (1 fg) und haben sich gut in der extremen Spurenanalytik etabliert. Anwendungsgebiete sind der Nachweis von Dioxinen (PCDD, PCDF) und PCB's (Polychlorierte Biphenyle) und auch Pflanzenschutzmitteln in umweltrelevanten Matrices.

6.3.6 Grundlagen des Trennprozesses

Wichtige Grundlagen der chromatographischen Trennung wurden bereits am Beispiel der Flüssigchromatographie im Kapitel 4.2.1 ausführlich erläutert. Viele Parameter (Retentionszeit, theoretischen Bodenzahl und Trennstufenhöhe) gelten auch für den gaschromatographischen Trennprozess. Unterschiede bestehen darin, dass in der Gaschromatographie eine Verdampfung der Analyte erfolgen muss, wobei sie sich nicht zersetzen dürfen. Die in die Gasphase überführten Analyte werden mit Hilfe eines Trägergases (mobile Phase) durch die Säule transportiert und darin getrennt.

Allerdings sind weitere Phänomene bei der Erklärung des gaschromatographischen Trennprozesses einzubeziehen. So kann die Trennleistung in der GC nicht allein durch das Trennstufenmodell (Van-Deemter-Gleichung/-Kurven, s. 4.2.1.2) erklärt werden. Als zusätzlicher Faktor dient die Trennwirksamkeit der GC-Säule, die vom Dampfdruck der Analyte und dem Grad der Wechselwirkungen mit der stationären Phase abhängen.

Zur Beschreibung der Trennwirksamkeit einer GC-Säule dient die Trennformel nach Herington (6.3), wobei V_{g1} und V_{g2} für die Komponenten 1 und 2 das jeweilige spezifische Retentionsvolumen ist. Die Größen p^0 und y^0 stehen für den Dampfdruck bzw. den Aktivitätskoeffizienten der einzelnen Analyte.

$$\lg \frac{V_{g_2}}{V_{g_1}} = \lg \frac{p_1^0}{p_2^0} + \lg \frac{y_1^0}{y_2^0} \quad (6.3)$$

Betrachtet man anstatt der Retentionsvolumina (s.o.) der Komponenten ihre Retentionszeiten, so lässt sich die Gleichung 6.3 wie folgt umformen (6.4).

$$\lg \frac{t_{R_2}}{t_{R_1}} = \lg \frac{p_1^0}{p_2^0} + \lg \frac{y_1^0}{y_2^0} \quad (6.4)$$

Daraus resultiert, dass das Verhältnis der Retentionszeiten der Analyte 1 und 2 proportional den Dampfdrücken und den Aktivitätskoeffizienten ist. Beide Komponenten besitzen nur dann unterschiedliche Retentionszeiten und werden gaschromatographisch getrennt, wenn sie sich zumindest in ihren Dampfdrücken und/oder in ihren Aktivitätskoeffizienten unterscheiden. Letztere sind ein Maß für die Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase. Es existieren ca. 1 000 verschiedene Trennflüssigkeiten (stationäre Phasen) in der GC, so dass die Polarität fast beliebig gewählt werden kann. Demzufolge resultiert eine große Variationsmöglichkeit bezüglich der Einstellung der Selektivität innerhalb des gaschromatographischen Trennprozesses.

6.3.7 Optimierung gaschromatographischer Trennungen

Gaschromatographische Trennungen werden bei konstanter Temperatur (isotherm) oder mit Hilfe eines Temperaturprogramms durchgeführt. Je höher die Thermostatisierung im Säulenofen eingestellt ist, desto kürzer ist die Retentionszeit und umso schmäler sind die Peakprofile der Analyte. Niedrige Temperaturen verzögern den chromatographischen Prozess, erzeugen breitere Peaks und beinhalten die Gefahr, das Substanzen in der Trennsäule kondensieren.

Die Abbildung 6.19 verdeutlicht schematisch eine isotherme GC-Trennung von Analyten (Peaks 1–4) bei einer niedrigen Temperatur (z.B. $< 80^\circ\text{C}$). Nach der Applikation (Start) der Probe auf die Trennsäule erscheint zuerst eine sogenannte Durchbruchsfront (DF), in der alle Substanzen enthalten sind, die nicht retardiert werden. Diese Retentionszeit ist i.d.R. mit der Totzeit t_0 weitestgehend identisch.

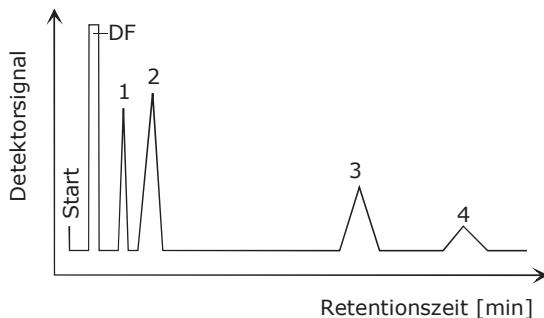


Abb. 6.19 Isotherme GC-Trennung bei niedriger Temperatur (schematisch)

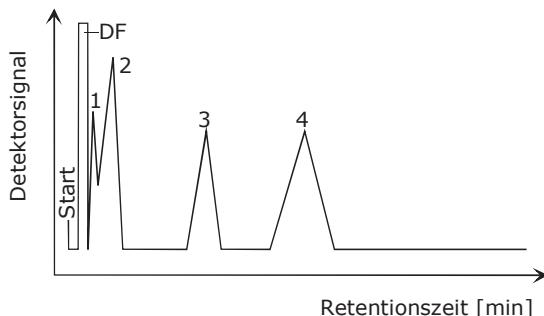


Abb. 6.20 Isotherme GC-Trennung bei hoher Temperatur (schematisch)

Die Analyte 1 und 2 werden ausreichend gut durch eine Basislinientrennung separiert, sind qualitativ und quantitativ gut auswertbar und weisen kurze Retentionszeiten auf. Für die Analyte 3 und 4 ergeben sich deutlich längere Retentionszeiten und relativ breite Peakprofile. Dies ist nicht akzeptabel und soll durch Optimierungen verbessert werden.

Durch Temperaturerhöhung können die Retentionszeiten verkürzt und den zu breiten Peakformen entgegen gewirkt werden. Das ist in der Abbildung 6.20 für die Analyte 3 und 4 weit besser realisiert. Allerdings werden die Substanzen 1 und 2 dann mit unzureichender chromatographischer Auflösung in der Säule getrennt.

Optimal ist eine temperaturprogrammierte GC-Trennung (Abbildung 6.21). Beginnend mit niedriger Temperatur werden die Peaks 1 und 2 und nachfolgend mit steigender Temperatur auch die Komponenten 3 und 4 hinsichtlich chromatographischer Auflösung, schmaler Peakprofile und kurzer Zeit optimal getrennt.

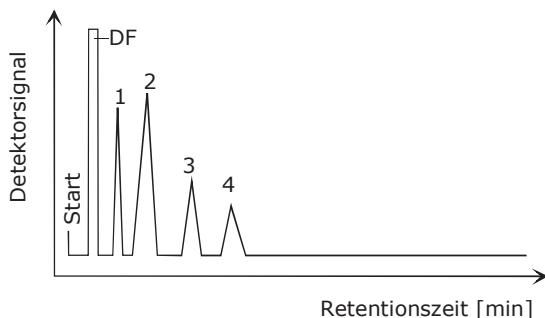


Abb. 6.21 Temperaturprogrammierte GC-Trennung (schematisch)

6.3.8 Applikationen

Die folgenden Abbildungen beinhalten typische Chromatogramme, die die hohe Leistungsfähigkeit der Kapillargaschromatographie belegen.

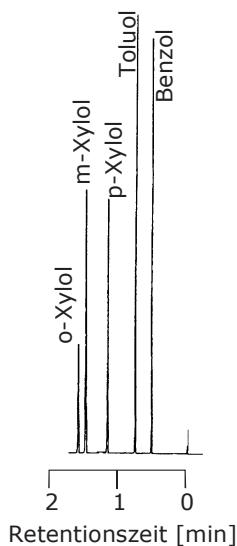
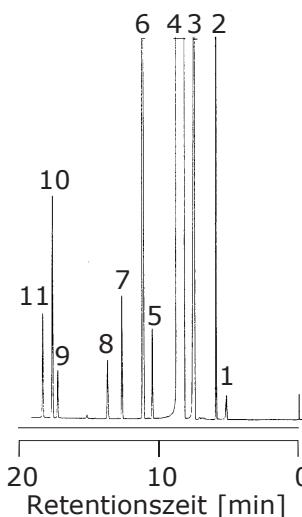


Abb. 6.22 GC-Trennung von alkylsubstituierten Benzolen

GC-Bedingungen:

Säule: Polypropylenglycol, 20 m · 100 μ m i.D.,
Temperatur: 80°C, isotherm,
Trägergas: Wasserstoff,
Detektor: FID.

**Abb. 6.23** GC-Trennung von Kirschschnaps

- 1: Acetaldehyd, 2: Essigsäureethylester,
- 3: Methanol, 4: Ethanol, 5: 2-Butanol,
- 6: 1-Propanol, 7: i-Butanol,
- 8: unbekannt, 9: 2-Methylbutanol,
- 10: 3-Methylbutanol, 11: unbekannt.

GC-Bedingungen:

Säule: Polypropylenglycol, 50 m · 100 µm i.D.

Temperaturen: 60°C, isotherm, 5 min,
60–160°C, 5°C/min,

Trägergas: Wasserstoff,

Detektor: FID.

Innerhalb kurzer Zeit (ca. 2 min) werden Benzol und vier Alkylbenzole mit Basislinientrennung und hoher Trennleistung chromatographiert (Abbildung 6.22). Das andere Applikationsbeispiel (Abbildung 6.23) zeigt die Analyse einer Reihe von leichtflüchtigen Komponenten, die in einem Kirschschnaps vorkommen. Die verwendeten GC-Bedingungen sind in den entsprechenden Abbildungen enthalten.

6.4 Literatur

Tswett MS (1906) Ber dtsch bot Ges 24:385

Leibnitz E, Struppe HG (1984) 3. Auflage, Handbuch der Gaschromatographie, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig Leipzig

Knox JH, Saleem M (1969) J Chromatog Sci 7:614

Kirkland JJ (1975) Chromatographia 8:661

Snyder LR, Kirkland JJ (1979) Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons New York

Engelhardt H (1986) Practice of high performance liquid chromatography, Springer-Verlag, Berlin

Schomburg G (1987) Gaschromatographie, VCH Verlag Weinheim

Frey H-P, Zieloff K (1993) Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie, VCH-Verlag Weinheim

Kraus Lj, Koch A, Hoffstetter-Kuhn S (1996) Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Wolf J (2008) Mikro-Dünnschicht-Chromatographie, Govi Verlag Eschborn

Bristow PA, Knox JH (1979) Chromatographia 10:279

- Meyer VR (1990) Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Otto Salle Verlag, Frankfurt
- Meyer VR (1996) Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, Hüthig Verlag Heidelberg
- Schwedt G (1995) Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Gey MH (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag Berlin
- Vonk N, Baars BGJ, Schaller H (1990) Troubleshooting in der HPLC, Birkhäuser Verlag, Basel
- Weiß J (1991) Ionenchromatographie, VCH-Verlag Weinheim

Krise ist ein produktiver Zustand. Man
muß ihr nur den Beigeschmack der
Katastrophe nehmen.

Max Frisch

7 Qualitätssicherung in der Analytik (LC, GC)

7.1 Qualitätsbegriff – Was ist Qualität?

Der Begriff Qualität (lat.: *qualitas*: Beschaffenheit, Merkmal, Eigenschaft, Zustand) wird nach DIN EN ISO 9000:2005 als „*Grad, in dem ein Satz inhärenter (anhafender) Merkmale Anforderungen erfüllt*“ definiert. Frühere Definitionen zur Qualität lauteten: (A: DIN EN ISO 8402:1995-08: „*Die Gesamtheit von Merkmalen einer Einheit bezüglich ihrer Eignung, festgelegte und vorausgesetzte Erfordernisse zu erfüllen*“ oder B: DIN 55350, Teil 11: „*Beschaffenheit einer Einheit bezüglich ihrer Eignung festgelegte und vorausgesetzte Erfordernisse zu erfüllen*“).

Etwas einfacher und vielleicht „prägnanter“ wird der Qualitätsbegriff in anderen „Branchen“ bzw. von einzelnen Autoren interpretiert. „*Qualität ist das Anständige*“ (Heuss) oder „*Qualität ist die Befriedigung aller Forderungen des Kunden - hinsichtlich Produkt und Dienstleistung*“ (Crosby) oder auch „*Qualität ist, wenn der Kunde wieder kommt und nicht das Produkt*“ (Thatcher).

7.2 Definitionen zur Qualitätssicherung

Nach EN ISO IEC 9000 :2001 ist Qualitätssicherung (QS) definiert als „Teil des Qualitätsmanagements, der auf das Erzeugen von Vertrauen darauf gerichtet ist, dass Qualitätsanforderungen erfüllt werden“. Qualitätsmanagement (QM) bezeichnet grundsätzlich alle organisierten Maßnahmen, die der Verbesserung von Produkten, Prozessen oder Leistungen jeglicher Art dienen. In Branchen wie Medizintechnik, Arznei- und Lebensmittelherstellung ist Qualitätsmanagement auch gesetzlich vorgeschrieben. Eine andere QS-Definition lautet: „*Qualitätssicherung ist ein Sammelbegriff für notwendige Maßnahmen zur Beurteilung von Prüfergebnissen hinsichtlich ihrer Qualität und Fehler.*“

7.3 Fehler, Mittelwert, Standardabweichung

In der Analytik treten naturgemäß experimentelle Fehler auf, die in Systematische Fehler („bestimmte Fehler“) und Zufällige Fehler („unbestimmte Fehler“) unterteilt werden. Letztere können in der Analytik nicht vollständig beseitigt werden. Sie beruhen auf der natürlichen Begrenzung unserer Fähigkeit, physikalische Messungen durchzuführen.

Als Zufällige Fehler bezeichnet man in der Statistik demzufolge die Streuung der Einzelmessungen neben der erklärten Abweichung (Systematischer Fehler). Dieser ist als Abweichung einer Messung oder Experimentreihe von ihrem Erwartungswert definiert. Ein Systematischer Fehler kann aufgedeckt und analysiert werden, z.B., wenn ein pH-Messgerät falsch kalibriert oder eine Pipette ungenau geeicht worden sind.

Die Bestimmung von Mittelwerten und entsprechenden Standardabweichungen wird in der Analytik routinemäßig durchgeführt und ist Bestanteil der jeweiligen Software und Auswerteverfahren. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert.

7.4 Kenngrößen der Genauigkeit

Die Kenngrößen der Genauigkeit umfassen die Richtigkeit, Präzision und Messunsicherheit eines analytischen Verfahrens. Richtigkeit bedeutet das Ausmaß der Annäherung an den wahren oder richtigen Wert (Bezugswert). Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit einer Messung (eines Messergebnisses). Sie wird mit Hilfe der Standardabweichung erfasst. Die Messunsicherheit (Zufallsfehler) ist ein dem Messwert zugeordneter Parameter, der die Streuung der Messwerte kennzeichnet, die der Messgröße zugeordnet werden können.

7.5 Kenngrößen der Kalibrierung und Kalibrierfunktion

Neben der Kalibration einer Analysenmethode sind vor allem für physikalische Messungen das Eichen und Justieren vorzunehmen. Eichung ist die vom Gesetzgeber vorgeschriebene Prüfung eines Messgerätes auf Einhaltung der zugrundeliegenden eichrechtlichen Vorschriften, insbesondere der Eichfehlergrenzen.

Justieren bedeutet dagegen das genaue Einstellen einer Messgröße oder Anzeige eines Instruments durch einen fachmännischen Eingriff in das Messsystem (z.B. Analysenwaage). Das Justieren ist oft nach Stößen notwendig, oder wenn sich die Umgebungsbedingungen merklich ändern.

Bei einer Kalibrierung wird die Intensität des analytischen Signals in Abhängigkeit von der absoluten Masse oder der Konzentration des Analyten durch eine Kalibrierfunktion, die im Normalfall eine Gerade ist, modelliert.

Zur Erstellung einer Kalibrierfunktion dienen meistens eine Serie von Lösungen unterschiedlicher Konzentration aus einer künstlichen Stammlösung (Verdünnungsreihe). Die Kalibrierlösungen und alle Proben werden je einmal oder zur statistischen Absicherung (Mittelwertbildung, Berechnung der Standardabweichungen) mehrmals vermessen. Die Analytkonzentration in der Probe kann auf der Basis der Kalibrierfunktion berechnet werden.

Die Kalibrierfunktion wird durch eine Geradengleichung ($y = b_0 + b_1 x$) ausgedrückt. Dabei steht der Ordinatenabschnitt b_0 für den Blindwert („Untergrund“) und der Faktor b_1 ist ein Maß für die Empfindlichkeit der Analysenmethode. Dieser Faktor bestimmt den Anstieg der Geraden (Abbildung 7.1).

Je steiler die Kalibrierkurve verläuft, desto empfindlicher ist die Methode. D.h., für eine relativ geringe Menge des Analyten resultiert schon ein großes Detektorignal. Geringe Anstiege der Kalibrierkurve sind demzufolge Ausdruck für eine unempfindliche Analysenmethode. Große Analytmengen erhöhen die Response des Detektors nur im geringen Maße.

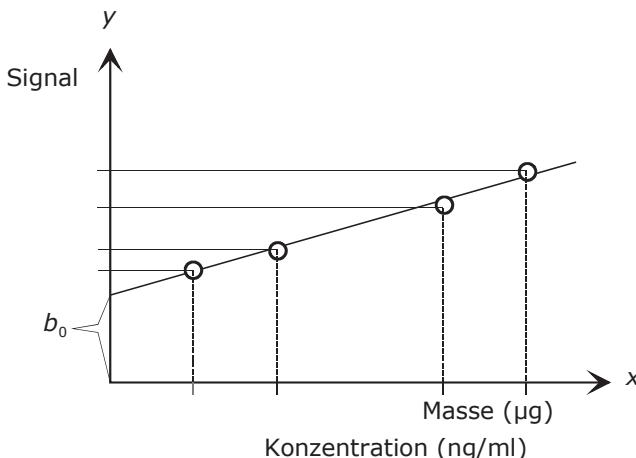


Abb. 7.1 Kalibrierkurve

7.6 Rückführbarkeit

Rückführbarkeit bezüglich der Analytischen Chemie beschreibt eine Eigenschaft von Messprozessen bzw. Messergebnissen. Ein Vorgang ist rückführbar, wenn das Ergebnis einer Messung mit einem anerkannten Standard für die betreffende Messgröße verglichen werden kann. Ein rückführbarer Messwert ist durch eine ununterbrochene Kette von Vergleichsmessungen mit bekannter Messunsicherheit auf ein anerkanntes Normal bezogen. Bei jeder dieser Vergleichsmessungen wurde eine Kalibrierung so durchgeführt, dass die Messung durch einen höherwertigen Standard bestimmt wurde. Die Rückführung ist durch mehrere wesentliche Elemente wie zertifiziertes Referenzmaterial, Messunsicherheit, Kompetenz bzw. Akkreditierung, Anwendung von SI-Einheiten oder Nachkalibrierungen (die Kalibrierungen müssen regelmäßig wiederholt werden) gekennzeichnet.

7.7 Standard-Additionsverfahren

Das Standard-Additionsverfahren ist in der Analytischen Chemie eine Möglichkeit zur Erstellung einer Kalibrierung innerhalb von quantitativen Bestimmungen. Der Name bezieht sich auf das definierte Hinzufügen von Standardlösungen bzw. -mengen des Analyten zur Analysenprobe.

Bei diesem Verfahren wird jeder Probe mehrmals eine bestimmte Menge Analyt hinzugefügt und die Probe wird nach jeder Zugabe gemessen (vgl. die Punkte 1, 2, 3, 4 in der Abbildung 7.2). Dabei wird der Zuwachs des Analytsignals bestimmt. Durch lineare Regression kann die Konzentration des Analyten in der ursprünglichen Probe berechnet werden. Praktisch erfolgt das durch Verlängerung der erstellten Kalibrierkurve bis zum Schnittpunkt mit der x-Achse (in „negativer“ Richtung). Der resultierende Betrag x_A (Abbildung 7.2) entspricht dem ursprünglichen Wert (z.B. Konzentration oder Masse) des Analyten in der Probe bzw. dem Blindwert.

Die Kalibrierfunktion wird also aus der Probe durch Hinzufügen von Analytmengen (sogenanntes „Spiken“ oder „Aufstocken“) erzeugt. Im optimalen Fall sollte der hinzugefügte Anteil des Analyten in der gleichen Größenordnung liegen wie die Konzentration des Analyten in der ursprünglichen Probe.

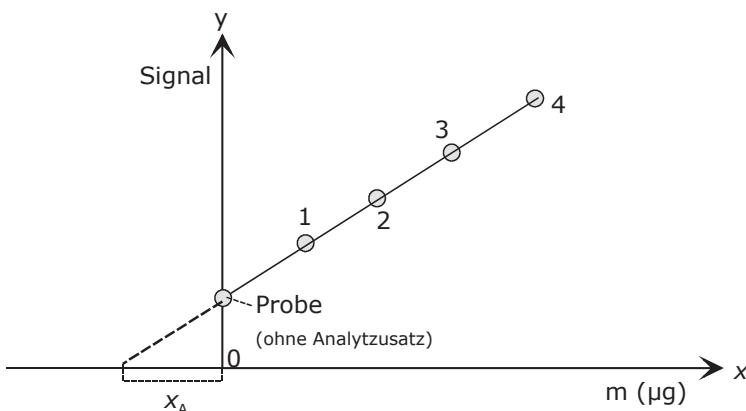


Abb. 7.2 Standardadditionsverfahren

Mit dem Standard-Additionsverfahren können instrumentelle Fehler und Matrixeffekte minimiert werden, vor allem bei Messungen in niedrigen Konzentrationsbereichen (Spurenanalytik).

Es ist dann vorteilhaft, wenn das Analytsignal durch die Probenmatrix stark beeinflusst wird (z.B. bei komplexen biologischen Matrices). Dann müssten für die normale Kalibrierung matrixangepasste Kalibrierstandards zur Verfügung stehen, was meist nicht möglich ist. Auch das Verfahren des internen Standards ist für komplexe Matrices nur begrenzt geeignet.

Die Methode der Standardaddition erfordert ein lineares Ansprechverhalten der analytischen Methode, und die exakte Dosierbarkeit des Analyten als Standardzusatz. Der Vorteil der Standardaddition ist, dass Matrixeffekte korrigiert werden können. Nachteile sind der höhere Arbeitsaufwand und mögliche Probleme beim Überschreiten des linearen Bereichs der analytischen Methode.

Quelle: DIN 32633: „Verfahren der Standardaddition“.

7.8 Bereichsgrenzen der Methode

Als Bereichsgrenzen in der Analytik gelten die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze sowie die Wiederfindungsrate (Recovery-Wert).

Die Nachweigrenze (NWG bzw. x_{NG} , vgl. auch Abbildung 6.11) bezeichnet den extremen Wert eines Messverfahrens, bis zu dem die Messgröße gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Messwerte im Bereich der Nachweigrenze sind durch eine erhöhte Ungenauigkeit gekennzeichnet.

Ein Messwert gilt dann als „nachgewiesen“, wenn die Ungenauigkeit des Messwertes geringer ist als die dreifache Standardabweichung (s_B) der Nullmessung (Blindwert). Es gilt demzufolge für die Nachweigrenze: $x_{NG} = y_B + 3 s_B$, wobei y_B der Mittelwert des Untergrundsignals bzw. der Blindwert ist.

Analog werden Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen definiert. Für die Erfassungsgrenze wird das sechsfache der Standardabweichung vom Blindwert angenommen und es gilt: $x_{EG} = y_B + 6 s_B$. Daraus resultiert auch die Feststellung, dass eine quantitative Bestimmung nur dann erfolgen kann, wenn ein Analysenergebnis größer ist als die Erfassungsgrenze (x_{EG}).

Die Bestimmungsgrenze (x_{BG}) ist größer als die Erfassungsgrenze und kann nach folgender Gleichung ($x_{BG} = y_B + 9 s_B$) ermittelt werden. Hier wird das neunfache der Standardabweichung angesetzt. In der Literatur existieren allerdings auch andere Angaben, die im Gesamtzusammenhang aber unwesentlich sind.

Die Wiederfindungsrate (WFR) ist das Verhältnis der Menge eines Analyten, der vor der Probenvorbereitung zu einer Probe hinzugefügt wird, und der Menge dieses Analyten, die als Messergebnis gefunden wird. Der Recovery-Wert wird in Prozent angegeben. Beträgt die WFR eines Analyten 100%, so sind während des gesamten analytischen Verfahrens keinerlei Verluste des Analyten aufgetreten.

Ist der Recovery-Wert kleiner (70...90%) sind Substanzverluste innerhalb des analytischen Verfahrens aufgetreten. Der Anteil dieser Verluste kann durch zusätzliche innere Standards oder durch eine Wiederfindungsfunktion überprüft werden.

7.9 Trennschärfe

Zu den Begriffen der Trennschärfe gehören in der Analytik die Auflösung, die Selektivität und die Spezifität.

Im Kapitel 4.2.1.4 wurde die chromatographischen Auflösung R (*resolution*) ausführlich beschrieben. Sie stellt für alle chromatographischen aber auch (kapillar)elektrophoretischen Methoden einen essentiellen Parameter dar, der angibt, ob Peaks vollständig (Basislinientrennung, $R > 1,5$) oder unvollständig ($R < 0,8$, Quantifizierung der Analyte wird zunehmend ungenau) getrennt vorliegen.

In der Massenspektrometrie (MS) ist die Auflösung R vor allem für hochauflösende MS-Geräte ein wichtiges Kriterium. Ziel ist, Analyte mit nur ganz geringen Unterschieden in den Massenzahlen zu trennen (vgl. auch Kapitel 11.1.3 und Abbildung 11.3).

Unter Selektivität einer analytischen Methode versteht man das Ausmaß der Leistungsfähigkeit, einen Analyten neben anderen in komplex zusammengesetzten Matrices störungsfrei bestimmen zu können. Als Beispiele dienen die Trennung von ein- und zweiwertigen Kationen in der Ionenchromatographie oder in der RP-Chromatographie die Separation von Benzol und Anthracen nach unterschiedlich hydrophoben Wechselwirkungen.

Spezifität ist noch „selektiver“. Sie wird dann erreicht, wenn überhaupt keine „Störungen“ durch andere Analyte feststellbar sind. Beispielsweise sind biospezifische Interaktionen zwischen einem Antigen und einem Antikörper so einzigartig, dass nur diese Biomoleküle sich „spezifisch“ binden und alle anderen Moleküle, deren Spezifität gar nicht so verschieden sein muss, chromatographisch eliminiert werden können.

Spezifisch spalten auch Enzyme, wie in den Abschnitten 2.3 (Tabelle 2.2: *Spezifität von Glycosidasen und Amidohydrolasen bei der enzymatischen Sequenzierung von Glycanen*) und im Kapitel 13.4.2 (Tabelle 13.3: *Spaltungsspezifität von Proteasen*) behandelt wird.

7.10 Literatur

- Doerffe K (1990) Statistik in der analytischen Chemie, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig
- Kuss H-J, Kromidas S (2009) Quantification in LC and GC, Wiley-VCH
- Otto M (2006) 3. Auflage, Analytische Chemie, Wiley-VCH
- Gey MH (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Meyer V (1996) Fallstricke un Fehlerquellen der HPLC in Bildern, Hüthig Verlag Heidelberg
- Gottwald W (1994) GC für Anwender, VCH Verlag Weinheim
- Bristow PA, Knox JH (1979) Chromatographia 10:279
- Engelhardt H (1986) Practice of high performance liquid chromatography, Springer-Verlag, Berlin
- Kirkland JJ (1975) Chromatographia 8:661
- Knox JH, Saleem M (1969) J Chromatog Sci 7:614

Preaching water and
drinking wine.

Politicians and Clergymen

8 Elektrophorese

8.1 Einführung und Historisches

Die Elektrophorese ist eine Trennmethode, die im analytischen und auch im präparativen Maßstab durchgeführt werden kann. Der Wortteil „-phor“ ist dem Griechischen entlehnt und bedeutet „tragen“. Das Wort „Elektro-“ bedeutet hingegen, dass die Methode durch Anlegen einer elektrischen Spannung betrieben wird.

Die Elektrophorese wurde von dem schwedischen Chemiker Arne Tiselius im Jahre 1937 entdeckt. Er führte mit einer Elektrophorese-Apparatur („U-Rohr“, Tiselius-Apparatur s. Abbildung 8.1) die Trennung von Pferdeserum durch und erhielt 4 Proteinbanden. Am schnellsten wanderte das Albumin, die anderen Banden waren Globuline, die er als α -, β - und γ -Globulin bezeichnete. Für diese u.a. Arbeiten erhielt Tiselius 1948 den Nobelpreis für Chemie.

Die „klassische“ Elektrophorese ist die Standardmethode der biochemischen und biomedizinischen Analytik zur Trennung und Isolierung von Nucleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Peptiden, Proteinen, Enzymen und Glycoproteinen. Es können sowohl anionische und kationische, niedermolekulare Biosubstanzen und große Biopolymere als auch Partikel und Zellen mit Hilfe der Elektrophorese getrennt werden. Zu den wichtigen Einsatzgebieten gehören die Molekularbiologie, Pharmazie, Veterinärmedizin und Lebensmittelüberwachung.

Die elektrophoretische Trennung erfolgt inträgergestützten Medien (Glasplatte mit aufgetragenem Gel oder Folien) oder innerhalb freier Lösungen. In einer Elektrophorese-Apparatur befinden sich Anode und Kathode, an die eine Gleichspannung angelegt werden kann.

Das Elektrophorese-Prinzip beruht auf der Wanderung von geladenen Probe-molekülen (Ionen) unter dem Einfluss eines Gleichstromfeldes, wobei sich die Probespecies in wässriger Lösung befinden. Die anionischen und kationischen Species migrieren zu den Polen mit entgegengesetzter Ladung.

Die Bewegung der Molekülionen, Partikel oder Zellen erfolgt auf Grund ihrer verschiedenen Ladungen, Massen und Volumina mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Diese werden als Mobilitäten bezeichnet. Bedingt durch die verschiedenen Mobilitäten erfolgt die Auf trennung der Moleküle in einzelne Substanzzonen. Die Elektroosmose (Abbildung 8.6), die der Elektrophorese überlagert ist, tritt in Erscheinung, wenn im Trennmedium negative Ladungen vorhanden sind. Dann bewegt sich die wässrige Lösung mit den Probeionen zur Kathode. Dieser Effekt wird besonders in der Kapillarelektrophorese (Abbildungen 8.32-8.35) ausgenutzt.

Als weitere Meilensteine in der Entwicklung der Elektrophorese gelten die Einführung von verschiedenen Trennmaterialien wie die Celluloseacetafolien (Kohn, 1957), Polyacrylamidgele (Weintraub, Raymond, 1959) und Agarosegele (Hjerten, 1961). Auf die Isoelektrische Fokussierung (IEF), die SDS-PAGE und Kapillarelekrophorese (CE) wird in späteren Kapiteln näher eingegangen.

8.2 Theorie der Elektrophorese

Die folgenden Zusammenhänge und Gleichungen dienen der Erklärung, wie geladene Analyte (Ionen, Teilchen, Zellen) in einem elektrischen Feld wandern und welche Kräfte und Effekte dabei wirken. Grundlage für diese Wanderung ist die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) der Analyte.

Als Kräfte existieren eine beschleunigende Kraft (F_B), die auf die Ladung q des Analyten (Ions) wirkt. Dabei ist E die elektrische Feldstärke, e die Elementarladung in Coulomb und z_i die Ladungszahl.

$$F_B = q \cdot E = z_i \cdot e \cdot E \quad (8.1)$$

Die Reibungskraft (F_R) wirkt dieser Bewegung entgegen und führt zu einem gewissen Abbremsen der Analyte. Dieser Effekt entsteht, wenn z.B. relativ große Moleküle (Proteine) sich innerhalb des Poresystems eines Gels bewegen. Dabei entsteht auch Wärme, die in der Elektrophorese in der Regel abgeführt wird.

Die Reibungskraft ist direkt proportional dem Reibungskoeffizienten (k_R) und der Wanderungsgeschwindigkeit (v_i) des Analyten (Ions). Der Reibungskoeffizient ist von der Viskosität des flüssigen Mediums abhängig und z.T. auch vom Poresystem des Gels und seiner Porengröße.

$$F_R = k_R v_i \quad (8.2)$$

Befinden sich die Brems- und Reibungskraft in einem Gleichgewichtszustand, so bewegen sich (migrieren) die Ionen im elektrischen Feld mit konstanten Geschwindigkeiten.

$$F_B = F_R \quad \text{oder} \quad q \cdot E = q_R \cdot v_i \quad (8.3)$$

Daraus ergibt sich die folgende Gleichung, wobei u_i als Mobilität bezeichnet wird und eine Art Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und elektrischer Feldstärke darstellt.

$$v_i = \frac{q \cdot E}{k_R} = u_i \cdot E \quad (8.4)$$

Für kleine kugelförmige Analyte kann das Stokes'sche Gesetz angewandt werden, so dass für die Mobilität die folgende Gleichung resultiert:

$$u_i = \frac{q}{k_R} = \frac{z_i \cdot e}{6 \pi r_i} \quad (8.5)$$

Dabei ist η die Viskosität des flüssigen Mediums und r_i der Radius des hydratisierten Ions (Stokes-Radius).

Für Analyte wie Proteine, die keine kugelförmige Gestalt aufweisen, gelten empirische Zusammenhänge zwischen Mobilität und dem Molekulargewicht.

Wie bereits erwähnt, entsteht bei der elektrophoretischen Trennung Wärme (W), die als Joule'sche Wärme bezeichnet wird.

$$W = E^2 \cdot \lambda \cdot c \quad (8.6)$$

Sie ist direkt proportional der Feldstärke E , der Äquivalentleitfähigkeit λ und der molaren Konzentration c des Elektrolyten bzw. des flüssigen Mediums.

Die Äquivalentleitfähigkeit ergibt sich aus nachstehender Beziehung, wobei F die Farday-Konstante ist.

$$\lambda = u_i \cdot z_i \cdot F \quad (8.7)$$

8.3 Slab gel Elektrophorese

8.3.1 Trägerfreie versus Slab gel Elektrophorese

Die Entwicklung der ersten Apparatur und Methode zur trägerfreien Elektrophorese von Proteinen geht wie bereits erwähnt auf die Arbeiten des schwedischen Forschers A. Tiselius zurück.

In einem U-förmigen Rohr (Abbildung 5.1) befinden sich im unteren Teil die zu analysierenden Probemoleküle, die in einem Puffer gelöst sind. Darüber ist in beiden Schenkeln des Rohres eine spezifisch leichtere Pufferlösung geschichtet.

Nach Anlegen einer Gleichspannung orientieren sich die Probeionen in Abhängigkeit von ihrer Ladung und Beweglichkeit in die Grenzfläche zwischen beiden Lösungen (Grenzflächen-Elektrophorese). An dieser Stelle können die Probeionen detektiert werden, da sie eine Änderung im Brechungsindex bzw. in der Lichtbrechung hervorrufen. Dieser Konzentrierungseffekt bewirkt jedoch eine nur diffus ausgeprägte Substanzzone und damit eine unvollständige und grobe Trennung der Probeionen.

Weit verbreitet ist die Anwendung von trägergestützten Elektrophoresen. Als Trennstrecke dient eine horizontal oder vertikal angeordnete Platte (Glas, Folie), worauf ein Trenngel (Polyacrylamid- oder Agarose-Gel) möglichst homogen und mit gleichbleibender Schichtdicke aufgetragen ist.

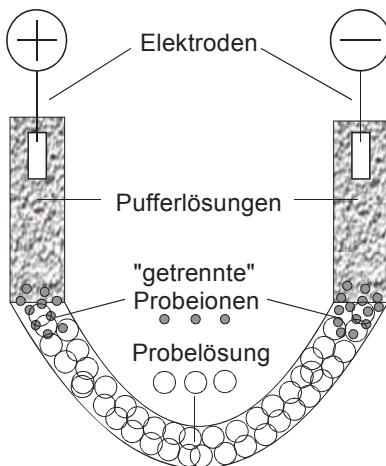


Abb. 8.1 Trägerfreie Elektrophorese

Diese porösen Trägermaterialien minimieren durch das Aufsaugen der Elektrolytlösungen in ihre Poren die der Trennung entgegenwirkenden Diffusionerscheinungen, die bei der trägerfreien Elektrophorese auftreten.

Kathode und Anode sind am Anfang und Ende der Trennstrecke angeordnet. Die Probeionen sind in einem Puffer gelöst und wandern entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität in diesem Gleichspannungsfeld auf einen für sie charakteristischen Platz im Gel und bilden mehr oder weniger scharf ausgeprägte Substanzbänder. Diese können durch Anfärbetechniken (Silber-, Comassiefärbung) sichtbar gemacht und mit einem Detektor qualitativ oder auch quantitativ bestimmt werden.

Die (relative) elektrophoretische Mobilität (m_r oder R_m) hängt von den pK-Werten der geladenen Gruppen in den Molekülen und von deren Größe ab. Sie wird auch von der Qualität und der Zusammensetzung des Trenngels, der angelegten Feldstärke und Temperatur sowie von Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers beeinflusst. Die relative elektrische Mobilität kann angegeben werden, wenn eine Standardsubstanz unter den gleichen elektrophoretischen Bedingungen wie die Probesubstanz im Gel getrennt wird. Sie dient zum Ausgleich unterschiedlicher Feldstärken und Trennzeiten.

In der Abbildung 8.2 ist dieses Prinzip der „klassischen“ Trägerelektrophorese dargestellt. Die Probemoleküle werden strichförmig auf das Trenngel aufgetragen und sollen aus einer möglichst schmalen Startzone heraus die elektrophoretische Trennung beginnen. Das Ziel der elektrophoretischen Trennung ist, möglichst „scharfe“ und gut getrennte Substanzzonen zu erhalten.

Ursachen für „verschmierte Substanzzonen“ können schlecht gegossene Gele, eine sehr komplexe Zusammensetzung der Probe oder sehr ähnliche Probespecies (Isoenzyme oder Mikroheterogenitäten von Glycoproteinen), eine breite Substanzaufgabe und nicht optimierte elektrophoretische Bedingungen sein.

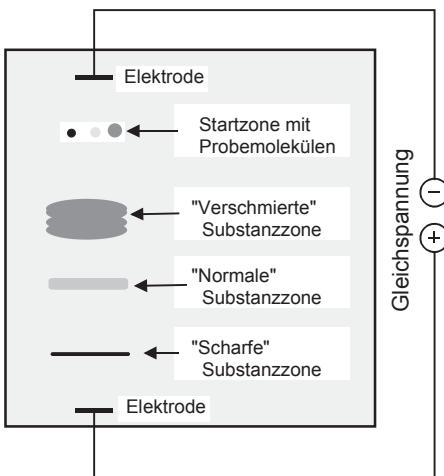


Abb. 8.2 Trägerelektrophorese

8.3.2 Zonenelektrophorese

Bei der (Zonen)elektrophorese wird ein Puffer mit konstanter Zusammensetzung und gleichbleibendem pH-Wert zur Trennung von Probemolekülen eingesetzt.

Die im Puffer gelösten Substanzen A und B werden innerhalb einer möglichst schmalen Zone auf die Gelmatrix aufgetragen (Startsituation 8.3). Danach beginnen sie unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes zu wandern. Entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität m_r positionieren sie sich auf dem Trenngel. Dabei legt die Substanz A im Gel eine kürzere Strecke zurück als die elektrophoretisch mobilere Substanz B, wie das „Trennresultat“ ausweist.

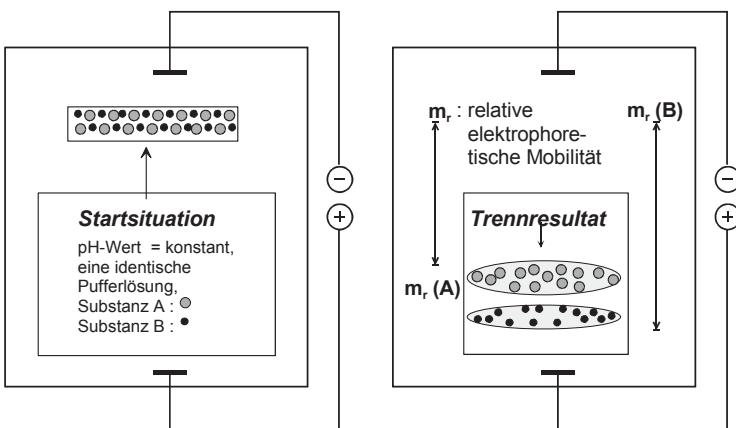


Abb. 8.3 Ergebnis einer (Zonen)elektrophoretischen Trennung

8.3.3 Serum-Eiweißelektrophorese

Die genauere Bezeichnung ist „Serum-Eiweiß-Celluloseacetat-Folien-Elektrophorese“, die als Standardmethode in der Klinischen Chemie und Biomedizin zur Trennung von Proteinen aus biologischen Flüssigkeiten (Urin, Serum, Plasma) eingesetzt wird.

Aus einer geronnenen Blutprobe werden durch Zentrifugation die zellulären Bestandteile (rote und weiße Blutkörperchen) abgetrennt, die mit den Blutplättchen und den Gerinnungsfaktoren (Fibrin bzw. Fibrinogen) einen *Blutkuchen* bilden. Das Serum als Überstand enthält neben Wasser die Proteine (Albumine, Globuline), Elektrolyte, Nährstoffe und Hormone.

Durch das gelöste Bilirubin ist es gelblich gefärbt. Das Blutserum entspricht demzufolge dem Blutplasma abzüglich der Gerinnungsfaktoren (Abbildung 8.4).

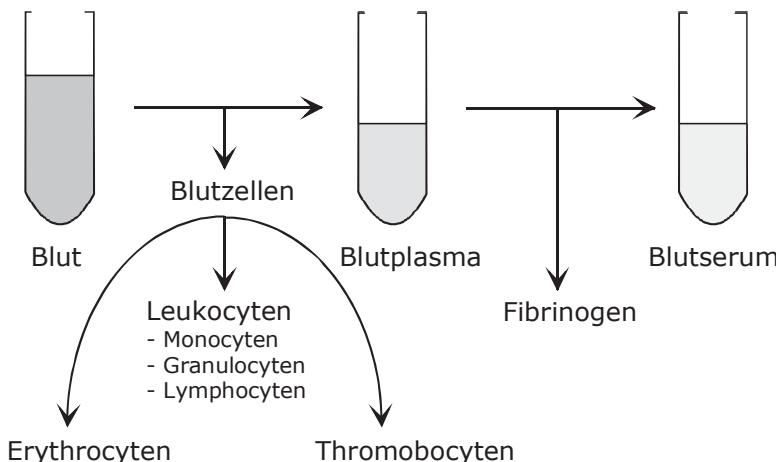


Abb. 8.4 Bestandteile des Blutes

Die darin verbliebenen Serumproteine können elektrophoretisch in fünf Hauptfraktionen (Albumin, α_1 -, α_2 -, β -, γ -Globuline) aufgetrennt und sichtbar gemacht („visualisiert“) werden. Dazu dienen Färbereagenzien wie Ponceau R (Abbildung 8.8) oder Coomassie-Blau (s. Abbildungen 8.20 und 8.21).

Diese Fraktionen sind noch komplexer zusammengesetzt, wie aus der Abbildung 8.11 hervorgeht. So resultieren für die Immunglobuline IgA, IgM und IgG relativ breit verschmierte Banden im elektrophoretischen Trennbereich der β - und γ -Globuline.

Der schematische Aufbau einer entsprechenden Elektrophorese-Apparatur wird in der Abbildung 8.5 gezeigt. Sie besteht aus zwei Puffergefäßern, in denen die Anode bzw. die Kathode installiert sind. Wichtig ist, dass beim Anlegen einer Spannung der Stromkreis geschlossen ist. Als Trennstrecke dient eine mit Pufferlösung getränktes Celluloseacetatfolie (s. auch Abbildung 8.6).

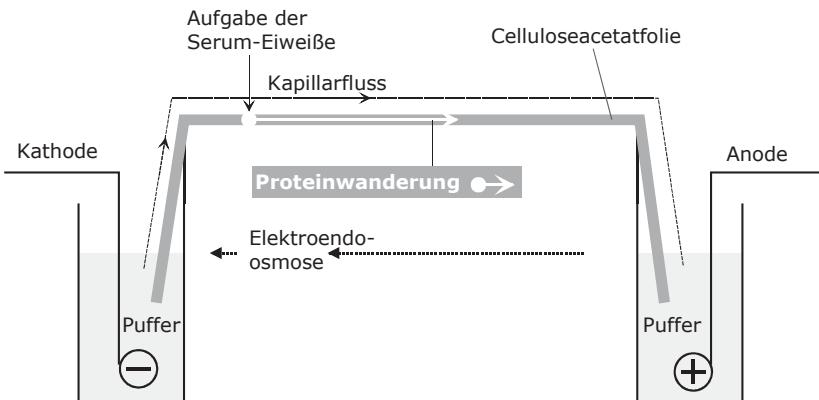


Abb. 8.5 Elektrophorese-Apparatur mit Celluloseacetat-Folie

Die Celluloseacetat-Folie wird mit einem Puffer (pH-Wert: 8,4 .. 8,8) getränkt und in die Vorrichtung eingespannt, so dass die Folienenden in die Puffergefäß eintauchen. Diese beinhalten je eine Elektrode (Kathode bzw. Anode), die mit einer Elektrophorese-Spannungsquelle verbunden sind. Nach Aufgabe der Serum-Eiweiße und Einschalten der Spannung beginnen die Proteine im elektrischen Feld zu wandern. Auf Grund des basischen pH-Wertes der Pufferlösungen und der pK-Werte der Serumeiweiße im sauren Bereich erhalten die Proteine eine negative Ladung und migrieren zur Anode. Am schnellsten wandert Albumin; die Bestandteile der Globulinfraktionen migrieren entsprechend langsamer (s. Abbildung 8.7).

Die sogenannte Elektroendoosmose wirkt dieser Proteinwanderung entgegen. Celluloseacetat ist negativ geladen und stößt die anionischen Eiweiße ab. Positiv geladene Ionen aus der Pufferlösung hingegen lagern sich um die Acetat-Anionen und bilden flächendeckend eine Art positiv geladenen Flüssigkeitsfilm.

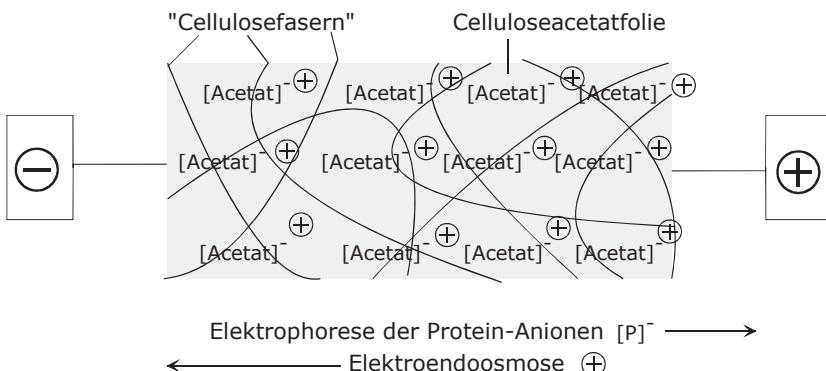


Abb. 8.6 Celluloseacetat-Folie (schematisch)

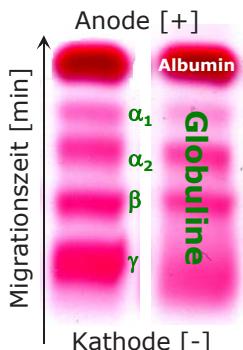


Abb. 8.7 Humanseren

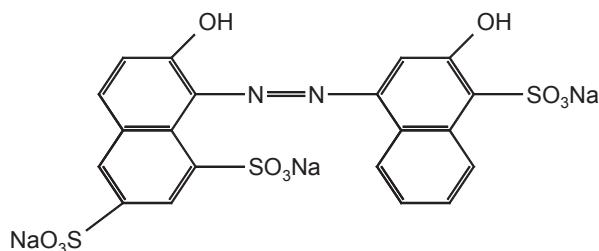


Abb.8.8 Färbereagens Ponceau R

Dieser wird im elektrischen Feld von der Kathode angezogen, ist aber weniger stark im Vergleich zur Migration der Proteine zur Anode.

Die elektrophoretische Trennung auf Celluloseacetat-Folien eines gesunden (rechts) und eines pathologischen Serums (links) ist in Abbildung 8.7 dargestellt.

Die Elektropherogramme zeigen die Trennung in Albumin und Globuline (α_1 , α_2 , β , γ). Zur Visualisierung der Serumproteinbanden dient der rote Farbstoff Ponceau R (s. Abbildung 8.8).

Das pathologische Serum (Abbildung 8.7, links) zeigt eine signifikante Erhöhung der Bande im γ -Globulinbereich. Für quantitative Analysen werden mit Hilfe eines Densitometers die „Farbintensitäten“ ermittelt und aufgezeichnet. Die resultierenden Kurven sind in den Abbildungen 8.9 und 8.10 dargestellt. Nach Integration dieser Densitogramme erhält man die prozentuale Verteilung zwischen dem Albumin und den entsprechenden Globulinen für die einzelnen Serumproteinfraktionen (vgl. Tabelle 8.1).

Besonders auffällig ist die starke Erhöhung im Bereich der γ -Globuline des pathologischen Serums. Das kann auf den Anstieg von Antikörpern (Immunglobuline: IgG) zurückgeführt werden.

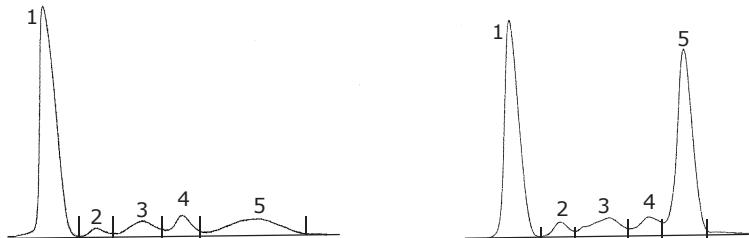


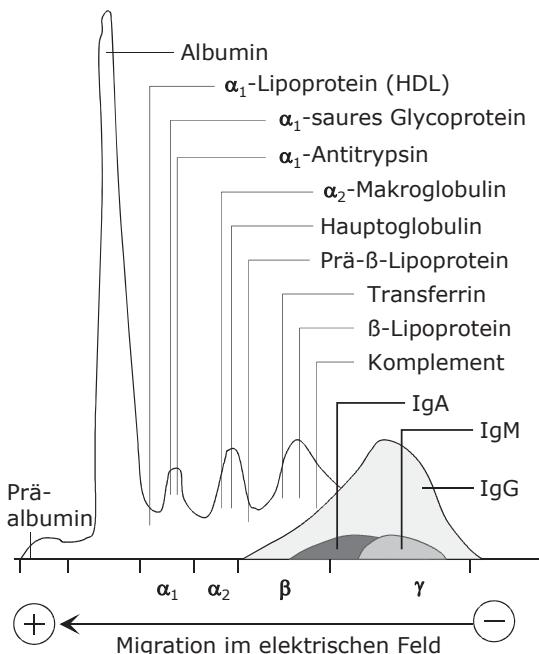
Abb. 8.9 und 8.10 Densitometrische Auswertung der Elektropherogramme eines gesunden Serums (links) und eines pathologischen Serums (rechts).

1: Albumin, 2: α_1 -, 3: α_2 -, 4: β -, 5: γ -Globulinfraktion.

Tabelle 8.1 Verteilung der Serumproteinfraktionen [%]

	Albumin	α_1 -Globulin	α_2	β	γ
Serum (Normalbereiche)	57 - 66	2 - 4,5	5 - 9	9 - 13	10 - 20
Serum - gesund	63,9	3,3	8,3	9,5	15,0
Serum - pathologisch	41,3	3,6	8,5	5,6	41,0

Beim Eintritt von Fremdstoffen (Antigenen) in den Organismus wird in Folge einer Immunantwort die Produktion der Antikörper gesteigert. Damit erhöht sich die Intensität der Proteinbanden in diesen Bereichen, was auf pathologische Veränderungen in humanen Blutseren hinweist. Dies sind erste Indizien für Erkrankungen wie Leberzirrhose, Entzündungen oder Krebs, die allerdings durch weitere Untersuchungsmethoden bestätigt werden müssen.

**Abb. 8.11** Detaillierte Zusammensetzung des Blutserums (schematisch)

8.3.4 Disk-Elektrophorese

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Elektrophorese werden sehr scharfe und hochaufgelöste Proteinbanden erzielt. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Anwendung von unterschiedlichen Gelstrukturen (klein- oder großporige) sowie verschiedenen pH-Werten, Ionenstärken und Arten der eingesetzten Pufferionen und -lösungen.

Das Prinzip der Disk-Elektrophorese ist in Abbildung 8.6 in drei Stufen schematisch dargestellt (Situation 1 bis 3).

Der Elektrodenpuffer enthält langsame anionische Folgeionen wie das Glycin, das jedoch beim pH-Wert des Sammelgels ungeladen ist. Im Gel werden andererseits Leitionen mit hoher Mobilität (z.B. Chlorid) verwendet.

Die gesamte Gelmatrix setzt sich aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporeigen Trengel zusammen. Dieses enthält einen Tris-HCl-Puffer mit einem pH = 8,8, während im Sammelgel der pH-Wert dieses Puffers auf 6,8 eingestellt ist (Situation 1).

Nach dem erfolgten Start einer Disk-Elektrophorese positionieren sich die Proteine entsprechend ihrer Mobilitäten in einzelnen sogenannten Stapeln, was als „Stacking-Effekt“ bezeichnet wird.

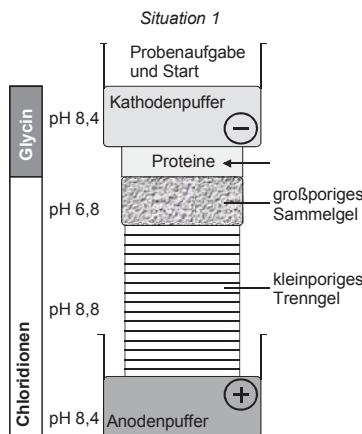


Abb. 8.12 Disk-Elektrophorese, Situation 1

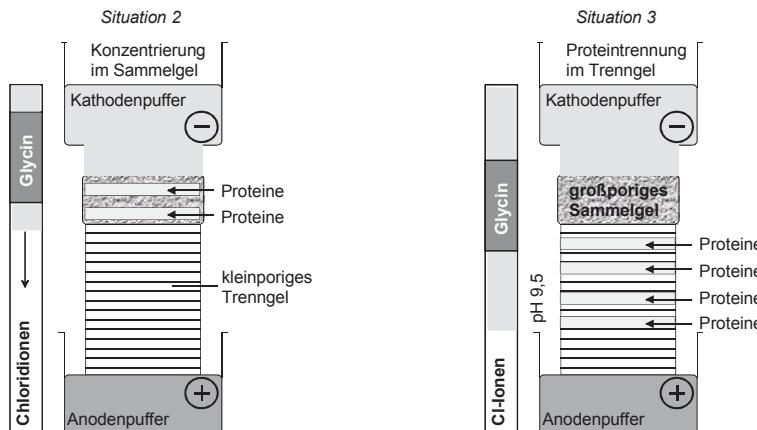


Abb. 8.13/8.14 Disk-Elektrophorese, Situation 2 und Situation 3

Wie aus Abbildung 8.6 hervorgeht, beginnen sich die einzelnen Substanzbänder im Sammelgel zu konzentrieren. Dies erfolgt ausschließlich nach ihren Ladungen, da der weitere Trenneffekt der Proteine nach Molekülgröße auf Grund der Großporigkeit des Gels nicht stattfindet.

Danach wandert der Substanzstapel kontinuierlich in Richtung Anode und zum kleinporeigenen Trengel weiter. Beim Übergang der Proteine in die kleineren Poren des Elektrophoresegels kommt es zu Anstauungseffekten, die eine Schärfung der Proteinbänder zur Folge haben.

Das Glycin als Folgeionmatrix wird von diesem Fokussierungseffekt nicht beeinflusst und fließt an den Proteinzonen vorbei. Diese beginnen sich ihrerseits innerhalb des vorhandenen homogenen Puffermilieus von einander zu trennen, was nach dem Prinzip der herkömmlichen Zonenelektrophorese geschieht.

Auf Grund der Kleinporigkeit des Trengels werden die Proteine jetzt zusätzlich nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt (Situation 3).

Dadurch entsteht in der Disk-Elektrophorese die hohe Bandenschärfe. Auch die Möglichkeit zur Aggregation der Proteine wird mit dieser spezialisierten und optimierten „Elektrophorese-Art“ vermieden.

8.3.5 Isotachophorese

Die Isotachophorese (ITP) wird auch als Gleichgeschwindigkeits-Elektrophorese („iso“ = gleich, „tacho“ = Geschwindigkeit) bezeichnet. Die elektrophoretische Trennung entweder von Kationen oder nur von Anionen erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Dieses besteht aus einem Leitelektrolyt (L) und einem Folgeelektrolyt (T: Abkürzung für *terminierend*).

Die zu trennende Probe wird zwischen dem Leitionenelektrolyt, der schneller als die Probeionen wandert, und dem Folgeionenelektrolyt, der die langsamste Mobilität aufweist, positioniert, wie im linken Teil der Abbildung 8.15 schematisch gezeigt wird.

Nach Anlegen eines elektrischen Feldes positionieren sich die Ionen in der Reihenfolge ihrer abnehmenden Mobilität und werden dabei getrennt. Im Gleichgewichtszustand folgt deshalb das Ion mit der höchsten Beweglichkeit dem Leitionenelektrolyt (Substanz B), während das Ion mit der geringsten Mobilität (Substanz A) vor dem Folgeionenelektrolyt positioniert ist.

Die Substanzzone mit der niedrigsten Beweglichkeit ist durch die höchste Feldstärke gekennzeichnet, während die niedrigste Feldstärke in der Zone der größten Ionenbeweglichkeit anliegt. Diffundieren nun Ionen in die Zone hoher Mobilität und demzufolge niedriger Feldstärke, werden diese Ionen solange abgebremst, bis sie wieder in ihre Zone hoher Feldstärke zurückwandern. Von dort werden die Ionen zu gegebener Zeit wieder nach vorn beschleunigt.

Durch diese ständig wechselnden Brems- und Beschleunigungseffekte kommt es zur Schärfung der Substanzbänder.

Im Vergleich zur CAF erhält man mit der ITP – wie auch mit der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) – besonders gut auswertbare Elektropherogramme.

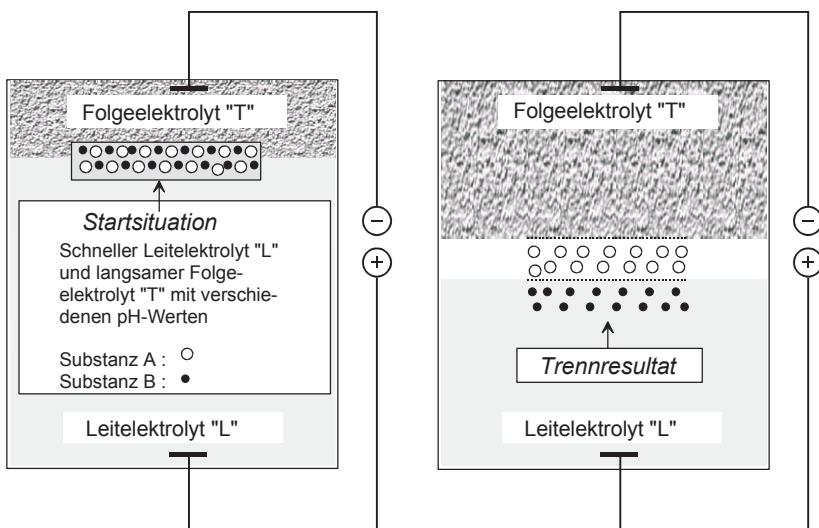


Abb. 8.15 Prinzip der Isotachophorese

8.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese) dient vor allem der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (MW: *molecular weight*) unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Struktur, s. Abbildung 8.16).

Als Trengel wird Polyarylamid, das durch Polymerisation von Acrylamid (Vorsicht giftig!) und Bisacrylamid entsteht, eingesetzt (Abbildung 8.17).

Das anionische Tensid (Detergens) SDS überdeckt bei diesem elektrophoretischen Trennvorgang die Eigenladungen von Proteinen. Pro 1g Protein binden ungefähr 1,4 g Natriumdodecylsulfat, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen.

Bei der Probenvorbereitung wird SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugefügt und die Probe auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen.

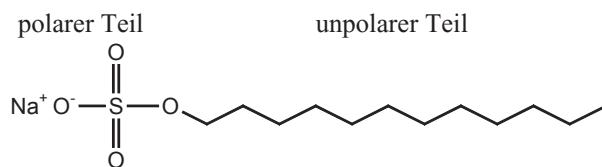


Abb. 8.16 SDS

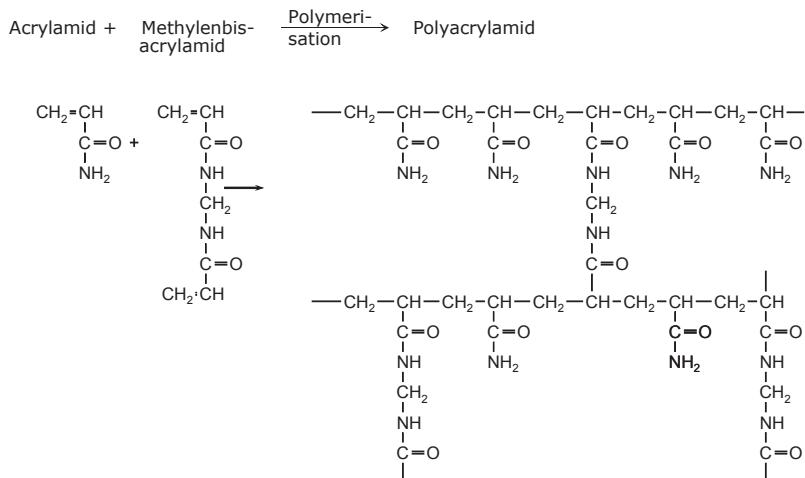


Abb. 8.17 Herstellung von Polyacrylamid

Weiterhin können Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden. Dazu werden reduzierende Thiolverbindungen wie β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythrit (DTE) dem Probenpuffer zugesetzt. Am Ende dieser denaturierenden Präparation weisen die mit SDS beladenen Proteine eine sogenannte „ellipsoide Gestalt“ auf.

Die SDS-PAGE von Proteinen wird meist in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt (Abbildung 8.18). Zur Auf trennung werden die denaturierten Proteine in die Probetaschen (Geltaschen) des Polyacrylamidgels appliziert.

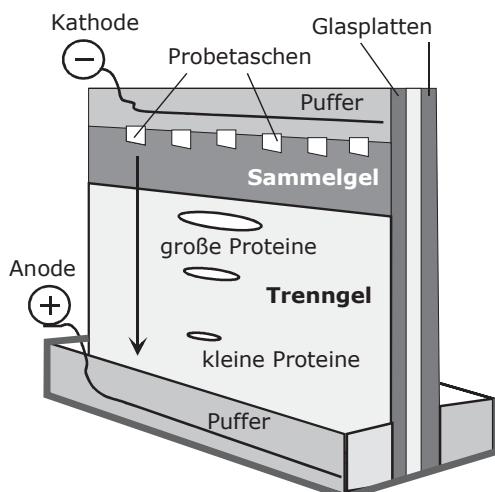


Abb. 8.18 Vertikale Elektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgt die Migration der negativ geladenen Analyte in Richtung Anode.

Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die „Maschen“ des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel migrieren. Nach der Trennung sind alle Proteine nach Größe sortiert und können durch weitere Verfahren (Färbung mit Coomasie-Brilliant Blau, s. Abbildungen 8.20 und 8.21) sichtbar gemacht werden (in der Elektrophorese nennt man das „Visualisieren“ – wie bereits erwähnt).

Zusätzlich zu den Proben wird meist ein Größenmarker (vgl. Tabelle 2, Abbildung 8.22) auf das Gel geladen. Dieser besteht aus Proteinen mit bekannter Molekulgröße und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Molekulargewichte von Proteinen in den eigentlichen Proben.

Die Vorgänge der Polyacrylamidgelektrophorese werden in der Abbildung 8.19 nochmals anschaulich zusammengefasst. Auch die Trennung von Proteinen im nativen Zustand ist möglich (A). Für die exakte Molekulargewichtsbestimmung werden jedoch die langgestreckten (denaturierten) Proteine (Zustand B) getrennt. Die Migrationen erfolgen meist unter Zusatz von geringen Mengen SDS (0,1%) zu den Pufferlösungen. Durch das Anlagern von SDS-Molekülen entstehen langgestreckte SDS-Protein-Micellen (Zustand C), die in einem Polyacrylamid-Gel definierter Porenstruktur nach der Größe der Molekulargewichte getrennt werden.

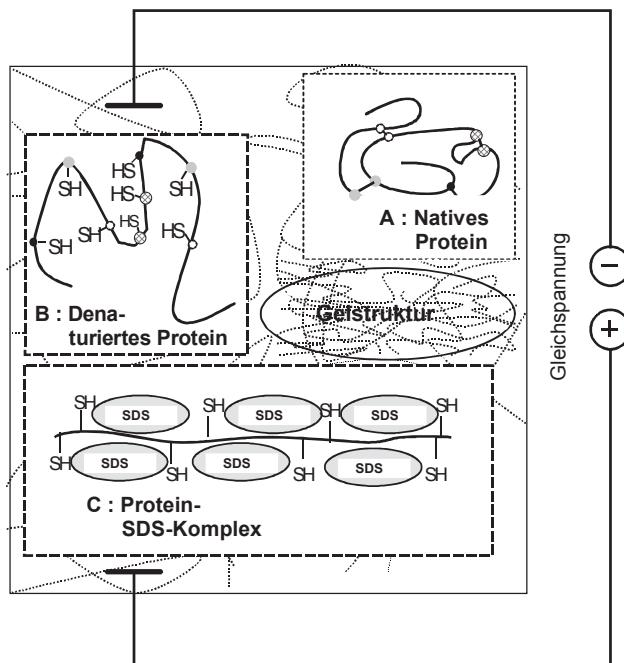
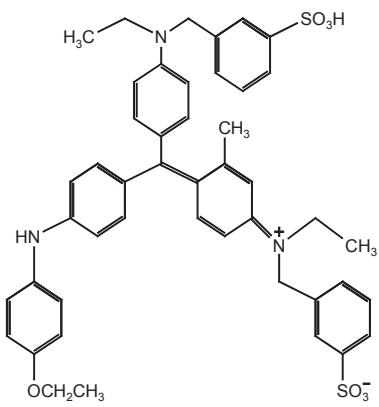
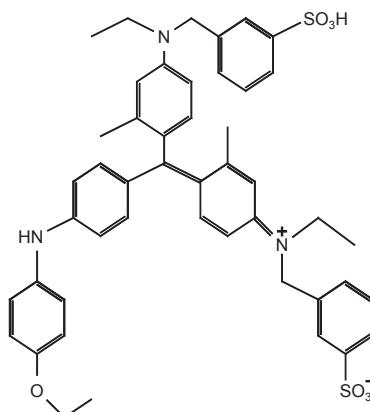


Abb. 8.19 Mögliche „Protein-Zustände“ im Polyacrylamid-Gel

**Abb. 8.20** Coomassie-Brilliant Blau R-250**Abb. 8.21** Coomassie B. G-250

Die Bestimmung des Molekulargewichtes (MW) eines bisher unbekannten Proteins erfolgt durch den Vergleich der elektrophoretischen Trennung von Standardproteinen bekannter Molekulargewichte (s. Tabelle 8.2) mit den Migrationszeiten. Basis ist die lineare Beziehung zwischen dem Molekulargewicht (bei großen Unterschieden erfolgt die logarithmische Darstellung) und der relativen Wanderungsstrecke (R_F -Werte) der SDS-Protein-Micellen. Es werden auch Gele mit unterschiedlich großen Poren (Porengradienten) eingesetzt, die einen größeren linearen Trennbereich aufweisen und eine schärfere Bandentrennung ermöglichen.

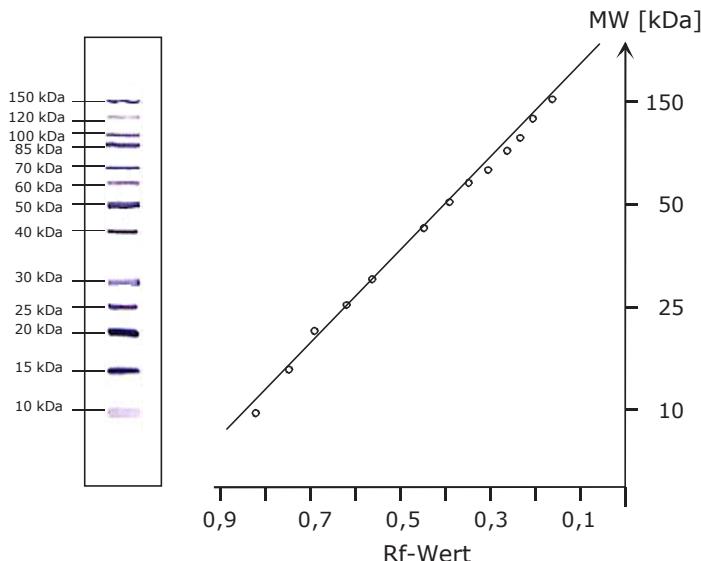
**Abb. 8.22** Ermittlung von Molekulargewichten, MW (s. a. Molekülmassen)

Tabelle 8.2 Zusammensetzung kommerzieller Proteinstandards (Fa. Anamed)

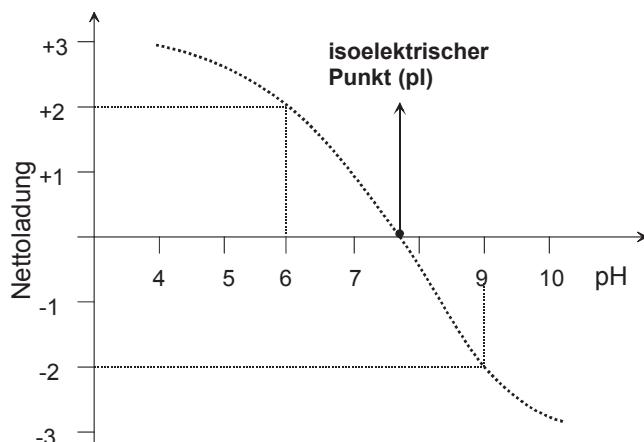
Protein	Herkunftsorganismus	aus Gewebe	MW [kDa]
Myosin	<i>Oryctol. cuniculus</i>	Muskel	220,0
β -Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>		116,0
Glycogen-Phosphorylase	<i>Oryctol. cuniculus</i>	Muskel	97,0
Albumin	<i>Bos taurus</i>	Serum	66,0
Glutamatdehydrogenase	<i>Bos taurus</i>	Leber	55,6
Lactatdehydrogenase	<i>Sus scrofa</i>	Muskel	36,5
Carboanhydrase	<i>Bos taurus</i>	Erythrocyten	29,0
Trypsin-Inhibitor	<i>Glycine max</i>		20,0
Lysozyme	<i>Gallus gallus</i>	Eiklar	14,0
Aprotinin	<i>Bos taurus</i>	Lunge	6,1
Insulin A	<i>Bos taurus</i>	Pankreas	3,4
Insulin B	<i>Bos taurus</i>	Pankreas	2,5

8.3.7 Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierung (IEF: *isoelectric focussing*) ist prädestiniert für die Trennung von amphoteren Molekülen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten.

Amphotere Substanzen sind Proteine, Glycoproteine oder Nucleinsäuren, die nach außen positiv *und* negativ geladen sein können. Der isoelektrische Punkt (pI) ist der pH-Wert, bei dem diese Moleküle als sogenannte Zwitterionen ohne Netto-ladung vorliegen. In einem elektrischen Feld wandern die Biomoleküle innerhalb eines pH-Gradienten genau zu der Stelle im Trengel, an der ihre Nettoladung gleich Null ist bzw. wo sich ihr isoelektrischer Punkt befindet.

Bezüglich der Ladungsverhältnisse eines Proteins gelten folgende Regeln: Bei niedrigem pH-Wert wird die Dissoziation der Carboxylgruppen der Aminosäuren unterdrückt und ihre Ladung ist nach außen neutral.

**Abb. 8.23** Abhängigkeit der Nettoladung eines Proteins vom pH-Wert

Die Aminogruppen tragen dagegen im sauren Bereich positive Ladungen, so dass auch für das Protein eine positive Nettoladung resultiert. Bei Erhöhung des pH-Wertes (bis in den basischen Bereich) dissoziieren die Carboxylgruppen und die funktionellen Aminogruppen bleiben neutral geladen, woraus sich für das Protein eine nach außen gerichtete negative Nettoladung ergibt. Durch Auftragen der jeweiligen Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert resultiert eine Kurve, die aus der Abbildung 8.9 hervor geht. Ihr Schnittpunkt (Abb. 8.23) mit der Abszisse entspricht dem isoelektrischen Punkt des Proteins.

Zur Herstellung von IEF-Gelen mit definierten pH-Gradienten dienen Trägerampholyte, die sich aus verschiedenen Polyaminocarbonsäuren zusammensetzen. Diese Verbindungen einer homologen Reihe unterscheiden sich nur geringfügig in ihren pI-Werten.

Abbildung 8.10 zeigt schematisch die Präparation von IEF-Gelen. Die Ampholyte befinden sich nach dem Auftragen völlig ungeordnet (Situation 1) innerhalb der Gelmatrix. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (Situation 2) beginnen die Ampholyte entsprechend ihrer Ladung zu wandern. Die negativ geladenen Moleküle wandern zur Anode und die positiv geladenen Trägerampholyte orientieren sich zur Kathode.

Anders ausgedrückt, Ampholytmoleküle mit niedrigem isoelektrischen Punkt wandern zur Anode und die mit hohem pI-Wert zur Kathode. Die anderen Ampholyte positionieren sich dazwischen, wodurch ein kontinuierlicher pH-Gradient ausgebildet wird (Situation 3).

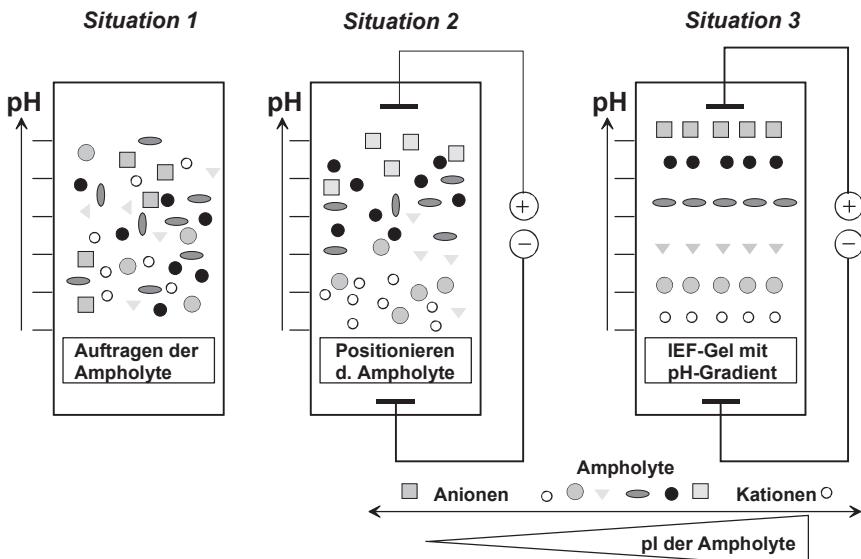


Abb. 8.24 Herstellung von IEF-Gelen

Nach der Aufgabe einer Proteinmischung an einer Stelle innerhalb dieses pH-Gradienten besitzen die einzelnen Proteine bei diesem pH-Wert unterschiedliche Nettoladungen. Im elektrischen Feld wandern die Proteine zu ihrem entsprechenden pI-Wert (Abbildung 8.25).

Heutzutage werden meist (kommerzielle) immobilisierte IEF-Gele verwendet.

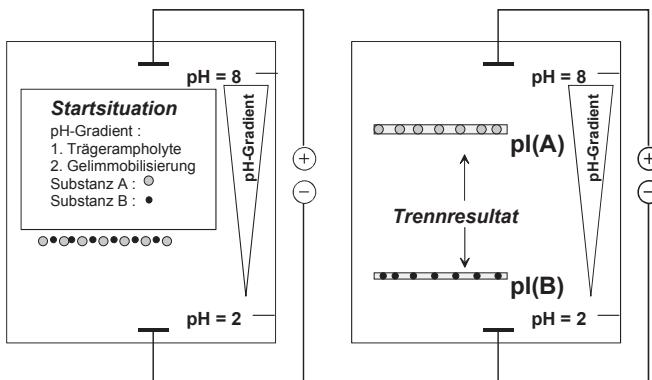


Abb. 8.25 Prinzip der isoelektrischen Fokussierung (IEF)

8.4 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE: *capillary electrophoresis*) geht insbesondere auf die Arbeiten von Jorgenson und Lukacs zurück und ist eine etablierte Methode der instrumentellen (Bio)analytik. Die Elektrophorese beruht wie bereits ausgeführt auf der Wanderung von geladenen und in einer Lösung befindlichen Teilchen (Moleküle, Ionen) im elektrischen Feld. Nach Anlegen einer Spannung migrieren diese zu den entsprechenden Gegenpolen (Anode oder Kathode). Die Mobilität der Moleküle (Analyte) hängt von ihrer Ladung, Größe und der angelegten Spannung ab. Die Temperatur, der pH-Wert oder die Ionenstärke der Lösung sind weitere Faktoren, die die Migration beschleunigen oder verzögern können.

8.4.1 Apparative Grundlagen

8.4.1.1 Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur

Der Aufbau einer CE-Apparatur beinhaltet zwei Puffergefäße, die durch eine Hochspannungsquelle ($U \geq 30$ kV) verbunden sind (Abbildung 8.26). Die Enden der Kapillare tauchen in die Pufferlösungen ein. Für die Probeninjektion wird ein Kapillarende kurzzeitig in das Probegefäß eingeführt, um die Analyte durch unterschiedliche Injektionstechniken in die Kapillare zu applizieren. Im elektrischen Feld wandern sie zur Gegenelektrode und passieren den Detektor.

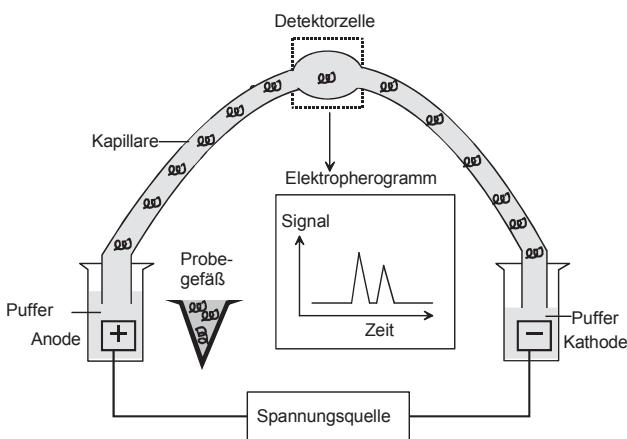


Abb. 8.26 CE-Apparatur (schematisch)

Die Kapillare selbst dient als Küvette und wird direkt von einer Lichtquelle durchstrahlt. Die getrennten und detektierten Analyte werden in einem Elektropherogramm registriert.

8.4.1.2 Injektionstechniken

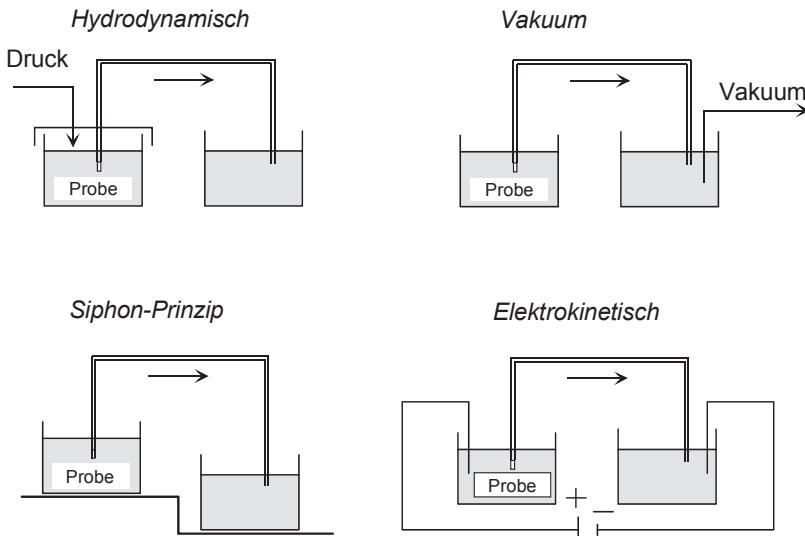
Die Injektion von Proben in CE-Kapillaren ist im Vergleich zur HPLC deutlich schwieriger, da hier wesentlich kleinere Probevolumina (nur wenige Nanoliter, ca. 1–5 nl) zu applizieren sind. Auch die Reproduzierbarkeit der Injektion derartig kleiner Probevolumina war längere Zeit ein unzureichend gelöstes Problem in der CE. Als Injektionstechniken werden die in Abbildung 8.27 dargestellten Varianten vorzugsweise angewendet.

Bei der hydrodynamischen Methode wird Druck im Probegefäß angelegt und es entsteht eine Druckdifferenz zwischen Kapillaranfang und -ende. Je größer die Druckdifferenz und die Injektionsdauer sind, desto mehr Probevolumen wird appliziert.

Durch Anlegen von Vakuum im Puffergefäß, in welches das Kapillarende ein taucht, entsteht eine Druckdifferenz, die gleichermaßen zur Probeinjektion führt.

Das Siphon-Prinzip beruht auf der Ausnutzung der Höhendifferenz zwischen Probegefäß und dem zweiten Puffergefäß. Die applizierten Probevolumina sind von der eingestellten Höhendifferenz und Injektionsdauer abhängig. Üblich sind 10–30 s bei Höhenunterschieden von ca. 10 cm.

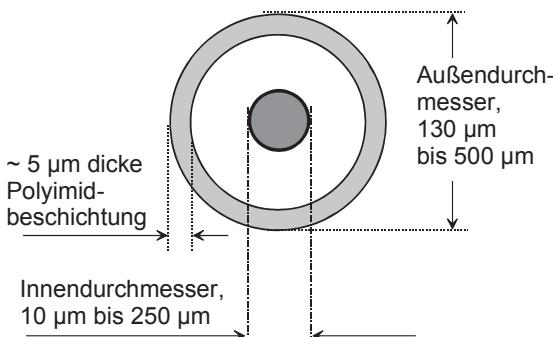
Bei der elektrokinetischen Injektion wird der Kapillaranfang in das Probegefäß eingeführt. Durch kurzzeitige Spannungsintervalle erfolgt die Injektion der Probenmoleküle. Das injizierte Volumen hängt von der Höhe der Spannung und der Zeit ab. In der Kapillarelektrophorese sind weitere Injektionstechniken in Entwicklung und Erprobung (z.B.: elektrischer Splitter). Auch die intensiven Bemühungen zur Miniaturisierung (Chip-Technologien) lassen weitere Fortschritte erwarten.

**Abb. 8.27** Injektionstechniken

8.4.1.3 Trennkapillaren

Als Trennkapillaren dienen meist Fused-Silica-Kapillaren, aber auch Glas oder Polymermaterialien finden Anwendung. Ihre Längen betragen etwa 10 bis 50 cm und der Innendurchmesser liegt zwischen 50 und 100 µm (Abbildung 8.28). Zur Verbesserung der Flexibilität und Handhabung der Kapillaren werden sie mit einem Polyimidpolymer beschichtet.

Applikationen zum Einsatz dieser CE-Kapillaren sind in den Abbildungen 8.47 und 8.48 und in den Kapiteln 15.5.6 (Thiole, Disulfide), 15.5.7 (Phytochelatine), 15.6.2 (Nucleobasen/Nucleoside) sowie in 15.11.2 (DNA-Fragmente) dargestellt.

**Abb. 8.28** Querschnitt einer Kapillare

8.4.1.4 Detektion

UV/VIS-Spektralphotometer wie in der HPLC werden vorrangig eingesetzt. Auch die Fluoreszenzdetektion, elektrochemische Detektoren, optische Glasfasern und die Kopplung mit der Massenspektrometrie gewinnen für spezielle Anwendungen zunehmend an Bedeutung.

Bei der optischen Detektion (i.d.R. UV/VIS-Bereich) wird die Kapillare direkt durchstrahlt. Die Polyimidschicht wird an dieser Stelle entfernt. Die Schichtdicke für eine derartige „Küvette“ ist jedoch sehr gering, woraus entsprechend den Zusammenhängen des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Abschnitt 10.2.6) eine geringe Empfindlichkeit resultiert. Diese kann durch Aufweiten der Kapillare verbessert werden, wie in Abbildung 8.29 (Bubble-Zelle) schematisch dargestellt ist.

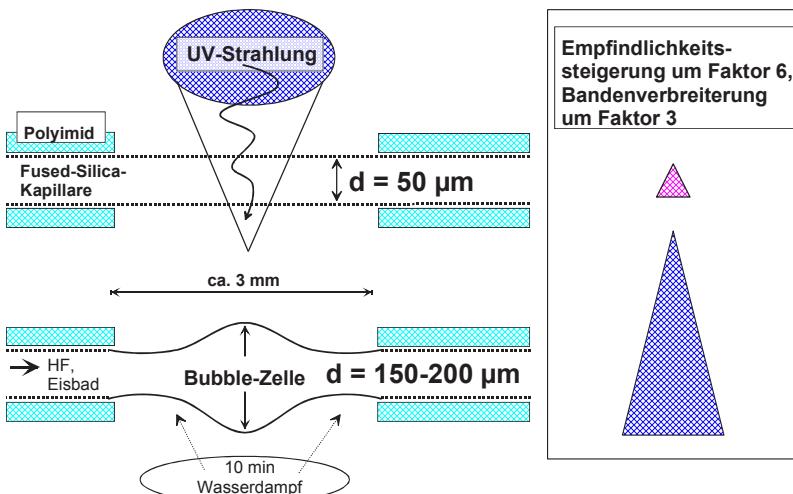


Abb. 8.29 Funktion einer Bubble-Zelle innerhalb der CE-Detektion

Dazu wird die Kapillare mit Flussäure gespült und im Eisbad gekühlt. Die Aufweitung an der entsprechenden Stelle auf die drei- bis vierfache Schichtdicke erfolgt mit Wasserdampf.

Die Empfindlichkeit wird ca. um den Faktor 6 erhöht. Das vergrößerte Volumen bewirkt jedoch auch eine Verbreiterung der Peaks um den Faktor 3.

Substanzen, die keine Chromophore oder intensiv absorbierende funktionelle Gruppen enthalten (z.B. Zucker) und deshalb sehr niedrige Extinktionskoeffizienten besitzen, können mit der Methode der indirekten UV-Absorption detektiert werden (Abbildung 8.30). Dem Migrationspuffer wird ein stark absorbierender Elektrolyt (z.B. Sorbinsäure) zugemischt, der eine den Probeionen vergleichbare Mobilität besitzt. Die Substanzzonen von getrennten und nicht oder nur gering absorbierenden Probeionen (Peak 1 und 2) bewirken eine Abschwächung der Gesamtabsorption im Migrationspuffer und werden in Form von negativen Peaks detektiert.

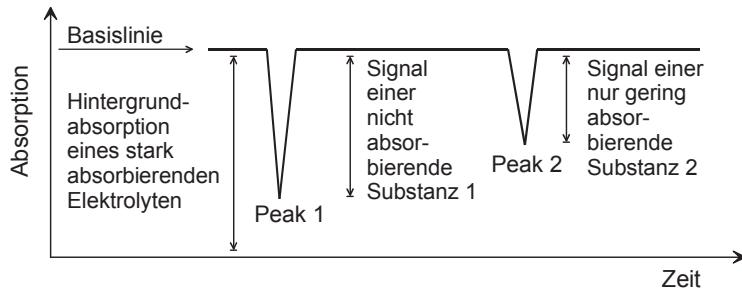


Abb. 8.30 Signalentstehung bei der indirekten UV-Detektion

8.4.2 Trennphänomene

Die Kapillarelektrophorese beruht auf dem Elektrophoresprinzip, das die Trennung der Analyte nach ihrer unterschiedlichen Mobilität im elektrischen Feld bewirkt, und der Elektroosmose, die die Wanderung von Pufferionen in der Kapillare hervorruft (elektroosmotischer Fluss).

8.4.2.1 Elektrophoresprinzip

Beim Anlegen einer Spannung wandern positiv geladene Analyte innerhalb der Pufferlösung zur Kathode, wobei kleinere gegenüber größeren Ionen und mehrfach im Vergleich zu einfach geladenen Ionen größere Mobilitäten aufweisen.

Ungeladene Analyte (Neutralteilchen) migrieren bei der Elektrophorese nicht. Die Anionen zeigen bezüglich Ladungszahl und Molekülgöße den Kationen gegenüber ein vergleichbares Mobilitätsverhalten, welches entgegengesetzt zur Anode gerichtet ist.

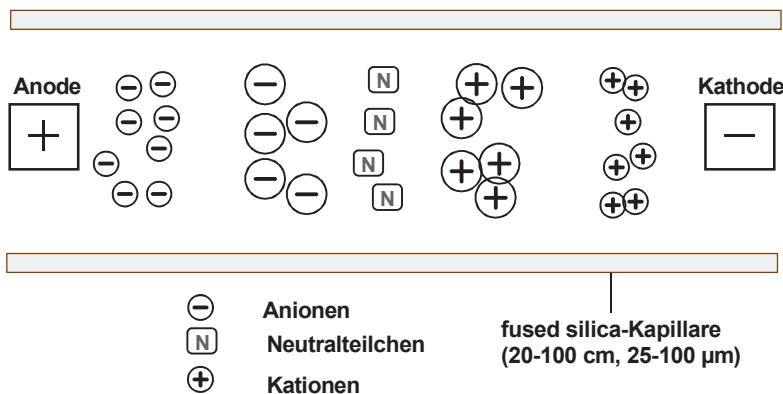


Abb. 8.31 Prinzip einer kapillarelektrophoretischen Trennung

8.4.2.2 Elektroosmotischer Fluss

Der elektroosmotische Fluss (EOF; *electroosmotic flow*) ist das charakteristische Trennphänomen in der CE und besitzt oft einen stärkeren Einfluss auf die Trennung im Vergleich zur elektrophoretischen Mobilität der Analyte. Er bewirkt, dass Neutralteilchen und sogar Anionen zur Kathode wandern. Zur näheren Erklärung des EOF dienen die folgenden Schemata.

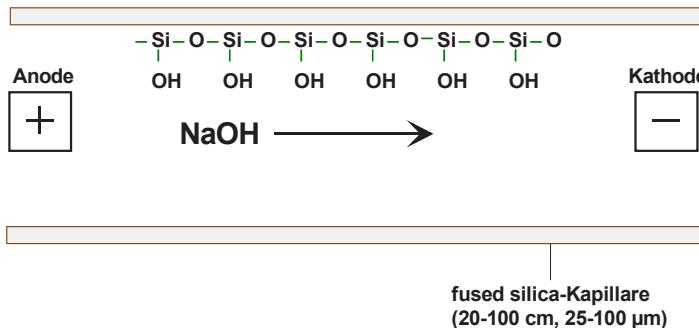
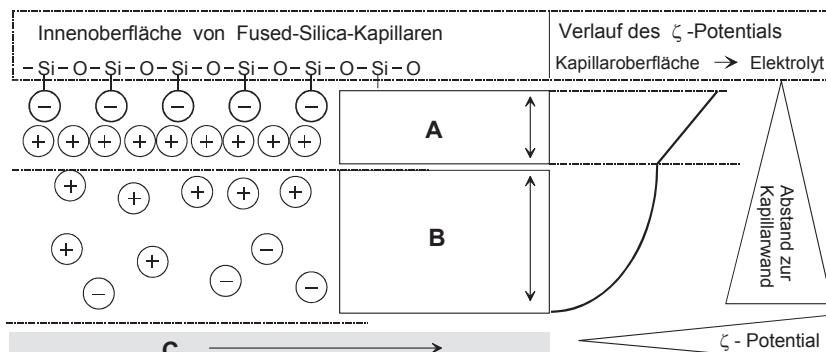


Abb. 8.32 Entstehung des EOF, Situation 1

Abbildung 8.32 veranschaulicht, dass ungefüllte Fused-Silica-Kapillaren neutrale Oberflächensilanolgruppen besitzen. Durch ihren Kontakt mit Pufferionen erfolgt ab einem pH-Wert von ca. 4 die Abspaltung von Wasserstoffionen, und es entsteht eine negativ geladen Oberflächenschicht.

Daran lagern sich positiv geladene Ionen aus dem Migrationspuffer an, was zur Ausbildung einer starren Doppelschicht führt (s. Bereich „A“ in Abbildung 8.33).



- A: Starre Doppelschicht
- B: Sternschicht oder diffuse Doppelschicht
- C: Elektrolyt

Abb. 8.33 Doppelschicht an der Kapillarinnenwand und ζ -Potential

Im größeren Abstand dazu positionieren sich Kationen und Anionen mehr oder weniger orientiert, weshalb dieser Bereich als diffuse Grenzschicht oder Sternschicht (B) bezeichnet wird. Mit größer werdenden Abstand von der Kapillarwand nimmt die Affinität der positiven Teilchen bis zur Zone der „reinen“ Elektrolytmoleküle (C) ständig ab. Diese exponentielle Abnahme ist der Grund für den Effekt der Elektroosmose und wird durch das Zeta (ζ)-Potential beschrieben.

Es entsteht eine Art „Sog“ (Abbildung 8.34), der in Richtung Kathode gerichtet ist. Dies bezeichnet man auch als elektroosmotischen Fluss, EOF (s. Abbildung 8.35).

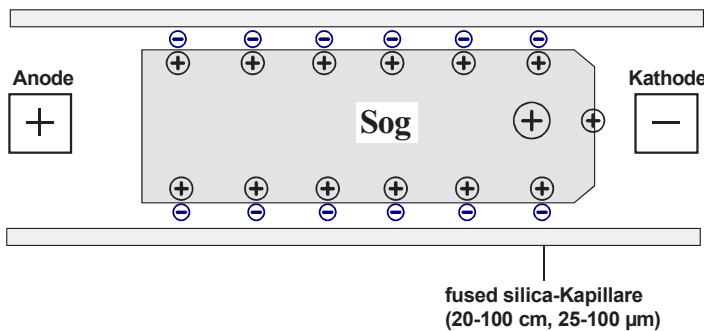


Abb. 8.34 Entstehung des EOF, Situation 2

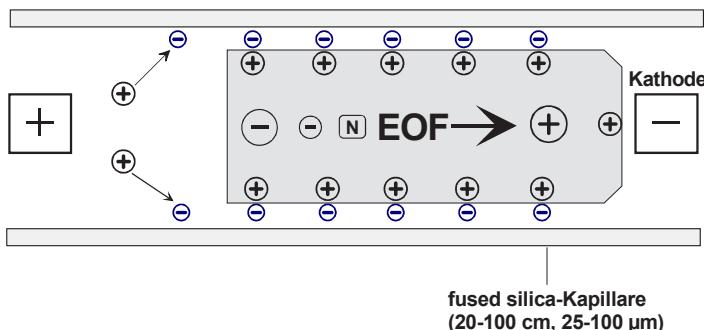


Abb. 8.35 Entstehung des EOF, Situation 3

Das Phänomen der Anlagerung von kationischen Species an und in der Nähe der Kapillarwand bewirkt, dass im elektrischen Feld diese „positiven Flüssigkeitsbereiche“ als Ganzes zur Kathode gezogen werden („*als ob alles an einem Faden hing*“), weshalb auch darin gelöste Neutralteilchen sowie große und kleine bzw. einfache und mehrfach geladene Anionen in dieser Reihenfolge im Sog des Analyten mitgerissen werden. Mit steigendem pH-Wert des Migrationspuffers nimmt der elektroosmotische Fluss zu.

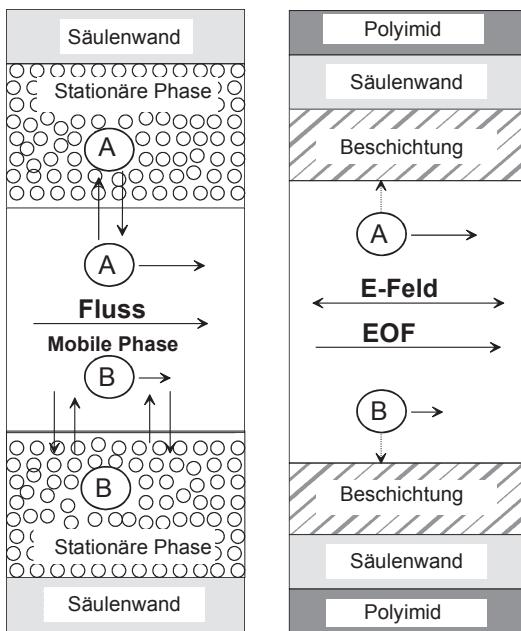


Abb. 8.36 Vergleich der Trennung zwischen HPLC und HPCE

Die Entstehung unterschiedlicher Peakprofile bei flüssigchromatographischen und CE-Trennungen verdeutlichen die Abbildungen 8.36 und 8.37.

In einer HPLC-Säule findet ein ständiger Stoffaustausch der Probemoleküle (A und B) zwischen mobiler und stationärer Phase statt. Die Substanzen wandern unter idealer Betrachtungsweise senkrecht zur Flussrichtung mit der Trennphase (vgl. Van-Deemter-Kurve) und werden stärker retardiert, wodurch eine größere Peakverbreiterung innerhalb der Säule entsteht. In der Kapillarelektrophorese treten die Stoffaustauschphänomene nicht oder kaum auf. Der EOF und die Migration der Teilchen im elektrischen Feld sind beide in Längsrichtung positioniert.

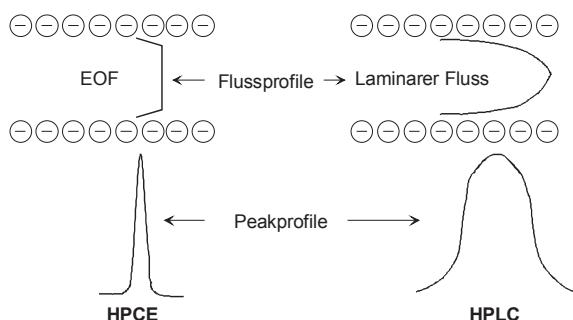


Abb. 8.37 Fluss- und Peakprofile: HPLC vs. HPCE

Daraus resultiert ein „plugförmiges“ Flussprofil. In HPLC-Säulen ist dagegen der Fluss laminar. Für die CE resultieren geringere Peakverbreiterungen und damit höhere Trenneffizienzen. Bisher werden schon mehrere Millionen theoretische Trennstufen bezogen auf eine Kapillarlänge von einem Meter (N/m) erreicht. Für sehr leistungsfähige HPLC-Säulen liegt dieser Wert bei 100 000.

8.4.3 Trennmechanismen

8.4.3.1 Kapillarzonenelektrophorese

Die Zonenelektrophorese (CZE: *capillary zone electrophoresis*) gehört zu den wichtigsten Trenntechniken in der CE und findet die breiteste Anwendung in der kapillarelektrophoretischen Analytik.

Das Prinzip und die Durchführung erscheinen relativ unkompliziert, da der pH-Wert und die Ionenstärke des Migrationspuffers sowie die elektrische Feldstärke konstant sind. Der prinzipielle Ablauf einer Zonenelektrophorese ist in Abbildung 8.38 anschaulich dargestellt.

Für selektive Kapillarelektrophoresen mit Basislinientrennungen sind diese Parameter und weitere zu optimieren. Detergenzien, organische Modifier oder die speziellen Cyclodextrine für Enantiomerentrennungen sind einige Beispiele dafür.

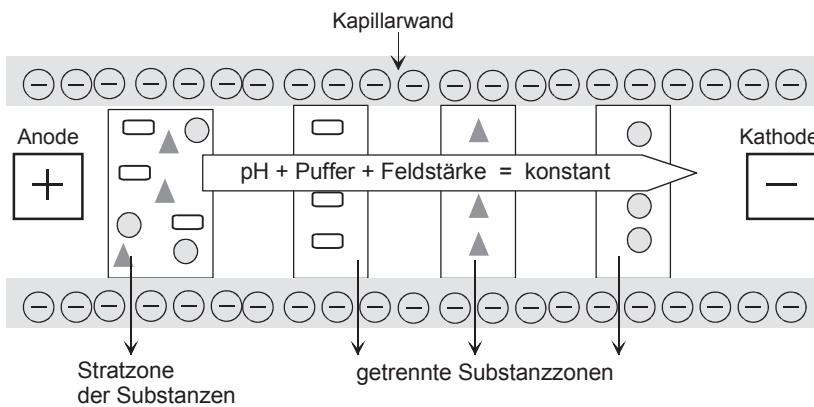


Abb. 5.38 Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese

8.4.3.2 Kapillargelelektrophorese

In der Kapillargelelektrophorese (CGE: *capillary gel electrophoresis*) ist die Kapillare mit einem Polymeren, z.B. mit Polyacrylamid, gefüllt. Damit nutzt man zusätzlich Molekularsieeffekte zur Verbesserung der elektrophoretischen Trennung. Anders ausgedrückt: Größere Moleküle werden bei ihrer elektrophoretischen Wanderung durch das Gelmedium stärker behindert als kleine Moleküle. Es werden lineare und quervernetzte Gele in der CGE (Abbildung 8.39) eingesetzt.

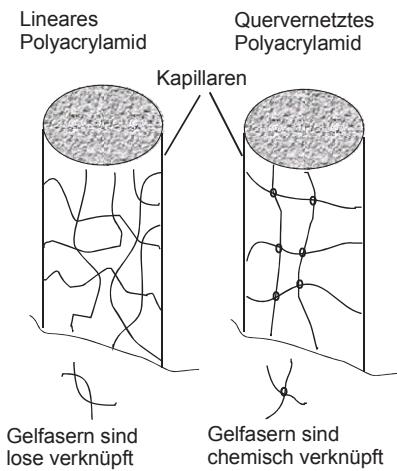


Abb. 8.39 Kapillargel-elektrophorese

Quervernetztes Polyacrylamid kann mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden und damit verschiedenen Porengrößen in den Kapillaren realisiert werden, so wie das von der „klassischen“ Gelelektrophorese her bekannt ist. Aber auch lineare Polymere wie Agarose, Dextrane oder Polyethylenglycole können neben dem Acrylamid als Kapillarfüllungen dienen.

Vorteile gegenüber der Slab-Gelelektrophorese bestehen im hohen Automatisierungsgrad sowie in schnellen und effizienten Trennungen. Nachteilig ist, dass präparative Probentrennungen weniger effektiv sind. Auch die Kapillarpräparationen und ihre „Robustheit“ können problematisch sein.

Die Gelkapillarelektrophorese findet hauptsächlich in der Protein- und DNA-Analytik (Abschnitt 15.11.2) Anwendung. Auch hier kann der lineare Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht (Logarithmus) und der Migrationszeit zur Bestimmung der Molekülgröße unbekannter Proteine ausgenutzt werden.

8.4.3.3 Kapillar-Isotachophorese

Als weiteres Trennsystem dient die Isotachophorese (ITP: *isotachophoresis*). Unter den Bedingungen der CE kann diese Trenntechnik auch als ITCE (*isotachophoresis capillary electrophoresis*) bezeichnet werden. Dabei wird ein diskontinuierliches Puffersystem aus Leit- und Endecktrolyt in Kapillaren verwendet, wie in der Abbildung 8.40 schematisch dargestellt ist.

Der Leitelektrolyt ist durch eine hohe Mobilität gekennzeichnet, während der Endecktrolyt eine niedrige Mobilität besitzt. Durch diese Unterschiede bildet sich beim Anlegen eines konstanten Stromes ein Potentialgradient (Feldstärkegradient) innerhalb der Kapillare aus. Im Bereich des Leitelektrolyten ist die Feldstärke geringer als innerhalb der Endecktrolyten-Zone. Das Applizieren der Analyte erfolgt im Grenzbereich zwischen beiden Elektrolyten (Situation 1, Abbildung 8.40). Entsprechend ihrer Mobilität beginnen die Ionen unterschiedlich schnell zu wandern (migrieren).

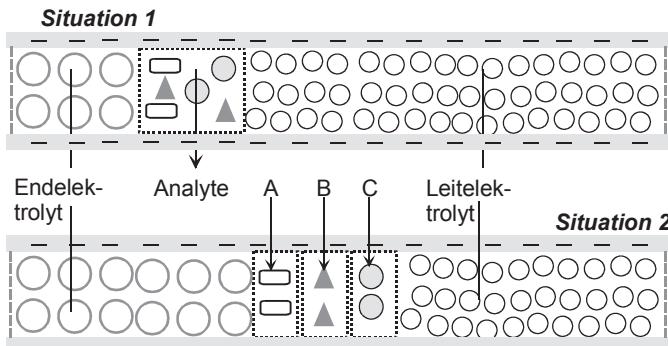


Abb. 8.40 Prinzip der Kapillar-Isotachophorese

Schnell migrierende Analytionen positionieren sich direkt an der Vorderfront der Elektrolyt-Zone und die langsamsten Ionen ordnen sich am Ende dieser Zone an (Situation 2). Nach Erreichen eines stationären Zustandes, liegen die einzelnen Analyte als getrennte Banden vor. Diese entsprechen einer für ihre Mobilität charakteristischen Feldstärke. Die getrennten Banden migrieren nun mit der konstanten Geschwindigkeit des Leitelektrolyten durch die Kapillare und können einzeln detektiert werden.

8.4.3.4 Isoelektrische Fokussierung in Kapillaren

Das Trennprinzip dieser CIEF (*capillary isoelectric focussing*) ist dem der Slab-gel-IEF-Variante (Abschnitt 8.3.7) vergleichbar. Bei einer isoelektrischen Fokussierung werden amphotere Probenbestandteile entlang eines pH-Gradienten separiert. Es kommt zu einer elektrophoretischen Trennung, da z.B. Aminosäuren als amphotere Verbindungen nur solange migrieren, bis sie ihren entsprechenden isoelektrischen Punkt (pI) in einem Gel oder in einer Kapillare erreicht haben. An diesem Punkt sind sie neutral bzw. ihre nach außen gerichtete Gesamtladung hat den Wert Null angenommen.

Die CIEF ist für die Trennung weiterer amphoterer Substanzen wie Proteine und Peptide besonders effizient. Zur Erzeugung von pH-Gradienten im Allgemeinen werden die Kapillaren mit Ampholyten gefüllt, die durch Anlegen einer Spannung bis zu ihren pI-Werten wandern und dadurch einen Trennbereich mit minimalen Unterschieden in den pH-Werten ausbilden.

Als Ampholyte dienen aliphatische Aminocarbonsäuren mit verschiedener Anzahl von Amino- und Carboxylsäuregruppen. Je ähnlicher die einzelnen Ampholytkomponenten in ihren pI-Werten sind, um so enger ist der pH-Gradient angeordnet. Diese Voraussetzung garantiert sehr scharfe und selektive Trennungen.

Der kapillarelektrophoretische (CIEF) Vorgang im Speziellen geht schematisch aus der Abbildung 8.41 hervor. Zuerst wird die Kapillare mit den Ampholyten und dem Proteingemisch gefüllt (Situation 1).

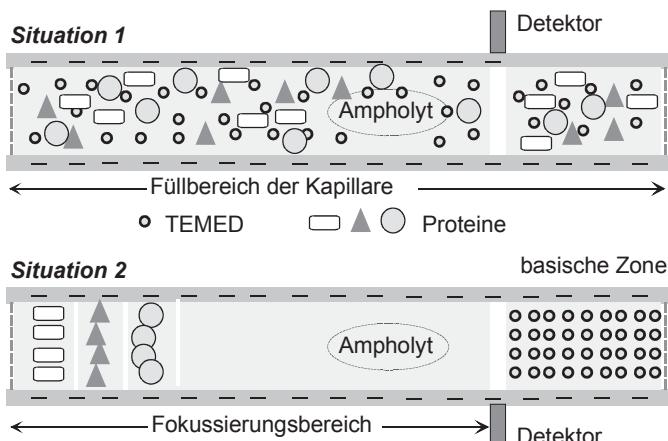


Abb. 8.41 Prinzip der Kapillar-Isoelektrische Fokussierung

Zu beachten ist, dass die Fokussierung im vorderen Teil der Kapillare erfolgen muss. Für die Detektion der einzelnen Analyte ist es danach notwendig, die IEF-Banden in Richtung Detektor zu mobilisieren, damit jede einzelne Bande registriert werden kann.

Der pH-Gradient ist demzufolge nur im Kapillarabschnitt vor dem Detektor auszubilden. Dafür ist es notwendig, dass der hintere Kapillarabschnitt mit einem separaten Reagenz gefüllt wird, das den Zugang der Probeproteine zu diesem Kapillarteil verhindert. Das wird mit Hilfe von TEMED (N, N, N', N' -Tetramethylendiamin) erreicht. Dies ist eine sehr basische Substanz und demzufolge migriert sie schnell und vollständig zum basischen Ende des pH-Gradienten und blockiert somit den hinteren Kapillarteil für die Probenproteine. Nun müssen die im vorderen Teil der Kapillare fokussierten Proteine mobilisiert und am Detektionsfenster vorbei bewegt werden. Dafür existieren verschiedene Fokussierungsvarianten wie z.B. die Einschrittfockussierung (Fokussierung und Mobilisierung der Analytionen gleichzeitig) oder die Fokussierung mit chemischer Modifizierung, bei der beide Vorgänge getrennt sind.

Die CIEF wird vielerorts sicher noch nicht bevorzugt angewandt, obwohl sie durch die gute Automatisierung und den Verzicht auf das Anfärben der Analyte durchaus wichtige Vorteile gegenüber der herkömmlichen IEF besitzt.

8.4.3.5 Micellare Elektrokinetische Chromatographie

Mit Hilfe der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC: *micellar electrokinetic chromatography*), die auf Arbeiten von Terabe (1984) zurückgeht, kann das Problem der kapillarelektrophoretischen Auftrennung von neutralen Molekülen gelöst werden.

Wie an Hand der Funktionsweise des elektroosmotischen Flusses bereits demonstriert wurde, migrieren neutrale Analyte zwischen den Anionen und Kationen zur Kathode und erscheinen im Elektropherogramm als ein Gruppenpeak.

Grundlage der MEKC-Technik ist, dem Migrationspuffer Detergenzien (s. auch Abschnitt 2.3 und 2.4) zuzusetzen. Beim Überschreiten der sogenannten kritischen micellaren Konzentration werden aus den Detergenzien und den Analyten die Micellen gebildet. Nach außen sind sie positiv oder negativ geladen, was ihre Migration in einem elektrischen Feld ermöglicht. Wenn SDS als Detergens zugesetzt wird, sind die Micellen negativ geladen und wandern zur Kathode.

Im Inneren sind die Micellen hydrophob, woraus ihre Bindungsfähigkeit zu den Neutralmolekülen resultiert. Je hydrophober die Analyte sind, um so stärker werden sie von den Micellen solubilisiert (s. Abbildung 8.42, Fall A: Gleichgewicht liegt auf der rechten Seite bei Micelle 2). Neutrale Substanzen mit geringer Hydrophobizität werden nur partiell solubilisiert (Fall B: ausgewogenes Gleichgewicht für die Micelle 3), während stark polare Moleküle (1) nicht in die Micellen eindringen und keine hydrophoben Interaktionen ausführen können (Fall C: Gleichgewicht liegt auf der linken Seite).

Die polaren Moleküle sind im Migrationspuffer gelöst und wandern durch den elektroosmotischen Fluss in Richtung Kathode. Sie werden vom Detektor mit der Totzeit t_0 zuerst registriert.

Wenn die elektrophoretische Mobilität der Micellen (μ_{MC}) geringer ist als die elektroosmotische Mobilität (μ_{eo}), wandern die Micellen insgesamt zur Kathode. Die ausgebildeten Micellen selbst werden auf Grund ihrer Hydrophobizität am stärksten verzögert und erscheinen zuletzt im Elektropherogramm mit der Zeit t_{MC} .

Moleküle, die sich zwischen dem hydrophoben Inneren und dem Migrationspuffer verteilen, werden retardiert und erscheinen zwischen t_0 und t_{MC} . Partiell solubilisierte Analyte (t_{R1}) migrieren schneller als total solubilisierte Substanzen (t_{R2}). Die ständige Verteilung der Analyte zwischen den Micellen und Pufferionen während der elektrophoretischen Trennung ist Ausdruck dafür, weshalb die MEKC auch als chromatographisches Trennverfahren eingestuft wird.

Die Vorgänge der micellaren elektrokinetischen Chromatographie, wie sie innerhalb einer Fused-Silica-Kapillare ablaufen, sind in den Abbildungen 8.43 bis 8.46 schematisch zusammengefasst.

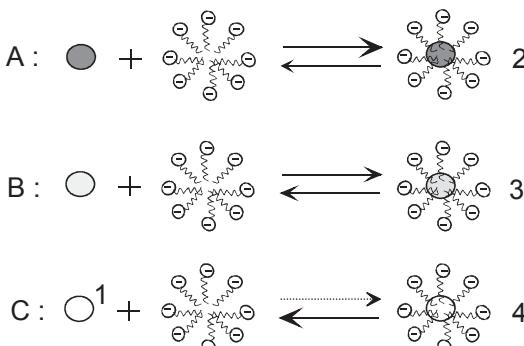


Abb. 8.42 Wechselwirkungen der Analyte mit den Micellen

Die Detergenz-Moleküle, die dem Migrationspuffer zugesetzt worden, formieren sich zu Micellen. In diesem Fall sind die hydrophoben Ketten der Moleküle nach Innen zusammengelagert und die negativen Kopfgruppen bilden die Außenladungen der Micellen. Ihre elektrophoretische Mobilität erfolgt in Richtung Anode. Nur wenn der elektroosmotische Fluss (EOF) stärker ist, können sich die gebildeten Micellen zur Kathode bewegen.

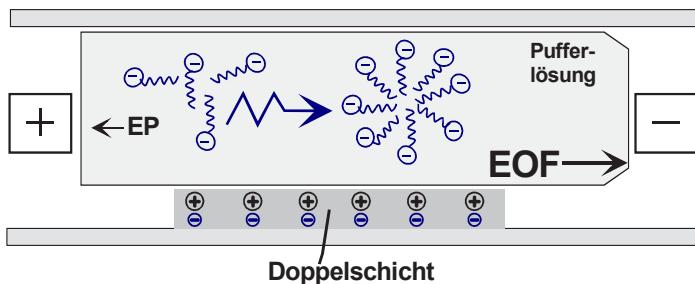


Abb. 8.43 Entstehung der Micellen in der CE-Kapillare

Die Abbildung 8.44 zeigt nun die Situation, in der die Analyte auf die Kapillare bereits appliziert worden sind. Zuerst sollen nur die Neutralmoleküle (N) betrachtet werden. Diese wandern in die unpolaren Innenräume der Micellen und können dort durch hydrophobe Wechselwirkungen längere Zeit eingeschlossen bleiben. Andererseits können sie auch wieder verdrängt werden und in die freie Pufferlösung zurückkehren (Abbildung 8.45). Zwischen den Neutralanalyten 1 und 2 werden aber auch unterschiedlich starke „Affinitäten“ (demzufolge verschiedene Verteilungskoeffizienten) existieren, in die Micelle einzudringen bzw. wieder heraus zu gelangen. Diese führt dazu, dass die Micellen zeitlich verzögert werden und im Elektropherogramm als getrennte Komponenten erscheinen (Abbildung 8.46).

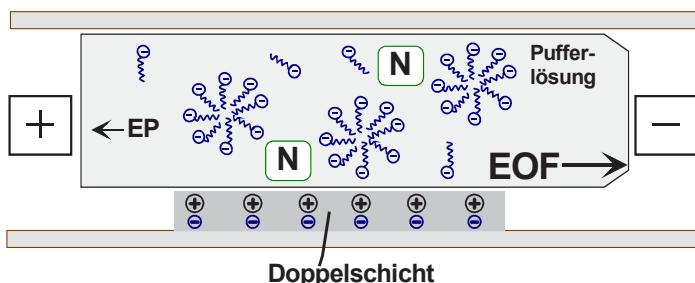


Abb. 8.44 Wechselwirkungen der Analyte mit den Micellen, Situation 1

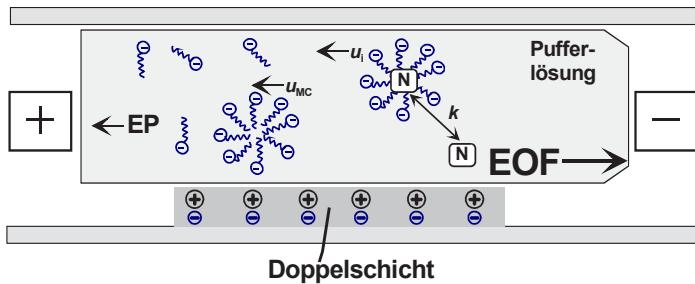


Abb. 8.45 Wechselwirkungen der Analyte mit den Micellen, Situation 2

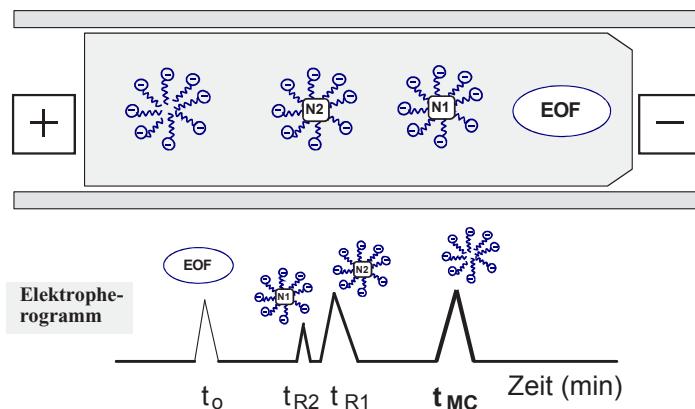


Abb. 8.46 Ergebnis der MEKC-Trennung

8.4.4 CE-Applikationen

Die Abbildung 8.47 zeigt die Trennung von drei ausgewählten Lokalanästhetika (Procain, Tetracain, Lidocain) mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese.

Anästhetika sind Medikamente, deren Einsatz zur reversiblen Verminderung oder Ausschaltung der Schmerzempfindung führt. Als Lokalanästhetika werden Anästhetika zur örtlichen Betäubung bezeichnet. Procain z.B. ist ein Lokalanästhetikum vom Ester-Typ, das zuerst in der Zahnmedizin eingesetzt wurde. Es ist hauptsächlich unter dem Markennamen Novocain bekannt. Lidocain (Handelsname: z.B. Xylocain®) ist ein Lokalanästhetikum vom Typ der Amide. Es ist vom Kokain abgeleitet, besitzt aber nicht dessen rausch- und suchterzeugende Komponente. Diese Substanzen dienen auch als „Streckungsmittel“ für Cocain.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer Fused-Silica-Kapillare der Dimension 50 cm · 50 µm i.D. und mit Hilfe eines 50 mmol Phosphatpuffers (pH-Wert = 2,7). Die hydrodynamische Probeninjektion dauerte bei 50 mbar 3 Sekunden. Die Spannung betrug 20 KV und detektiert wurde bei 227 nm.

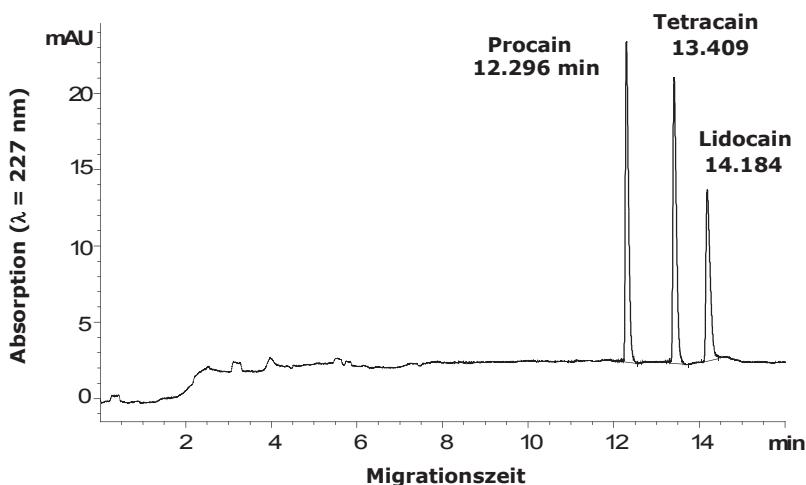


Abb. 8.47 CE-Trennung von Lokalanästhetika

In der Abbildung 8.48 ist die Trennung von fünf verschiedenen Proteinen (1: Cytochrome C, 2: Lysozyme, 3: Myoglobin, 4: Ribonuclease, 5: Chymotrypsinogen A) dargestellt, wobei die CZE-Trennung unter Zusatz des Modifiers Piperazin im Puffer (0,02 mol/l KH_2PO_4 , 0,05 mol/l Piperazin, pH = 3,0) erfolgte. Es wurde eine unmodifizierte Fused-Silica-Kapillare (65 cm · 75 μm i.D.) eingesetzt.

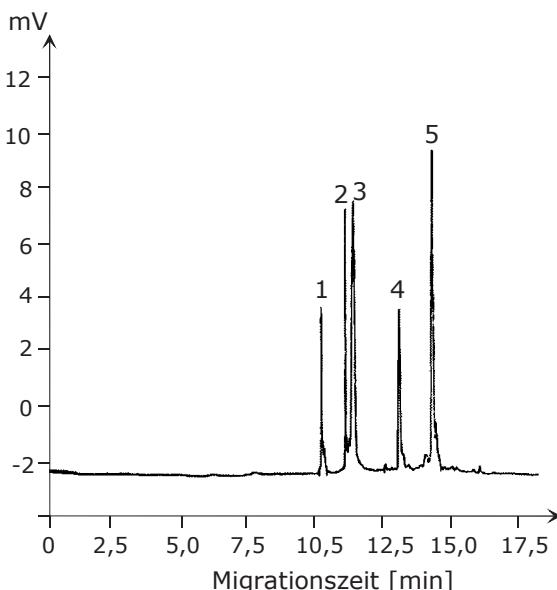


Abb. 8.48 CE-Trennung von Proteinen

Die angelegte Spannung betrug 12 KV und die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch (Injektionszeit: 2 Sekunden). Dabei wurden Proteinkonzentration von je 1mg/ml eingesetzt und zur Detektion der Peaks im Elektropherogramm diente auch hier eine Wellenlänge im nahen UV-Bereich (λ : 214 nm).

Weitere Applikationen zum effizienten Einsatz der Kapillarelektrophorese betreffen die CE von Thiolen-, Disulfiden- und Phytochelatinen (Kapitel 15.6.6, 15.5.7) sowie weitere bioanalytische Beispiele zur CE von Nucleobasen/Nucleosiden (Kapitel 15.6.2) und DNA-Fragmenten (Kapitel 15.11.2).

8.5 Kapillar-Elektrochromatographie

Die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC: *capillary electro chromatography*) ist ein Trennverfahren, das die Prinzipien der schnellen Flüssigchromatographie (HPLC) mit denen der Kapillarelektrophorese (CE) kombiniert. Man bezeichnet diese gelungene „Symbiose“ als eine Hybridmethode, die auch zukünftig ein hohes Innovationspotential innerhalb des Gebietes „Separation Sciences“ besitzt.

Grundlage dieser Kapillartechnik sind stationäre Phasen, die als Beschichtung an der Innenwand der Kapillare immobilisiert sind (offene Kapillaren) oder als kleine Partikel in die Kapillare wie in der HPLC gefüllt sind (gepackte Kapillaren). Der schematische Aufbau einer CEC-Apparatur (s. Abbildung 8.31) zeigt, dass das eine Ende der gepackten Kapillare in das Gefäß, in dem sich der Migrationspuffer und eine Platinelektrode befinden, hineintaucht. Das andere Ende der Kapillare mündet in einem T-Stück, das geerdet ist und als zweite Elektrode fungiert. Dazwischen ist die Hochspannungsquelle angeordnet. Ein weiterer Ausgang des T-Stückes ist mit dem Probeaufgabesystem verbunden; der andere stellt die Kopplung mit einer HPLC-Pumpe her. Zwischen dem T-Stück und dem Migrationspuffer ist das Detektionssystem angeordnet.

Nach dem Applizieren der Probe wandern die Analyte unter dem Einfluss des elektrischen Feldes innerhalb der Kapillare. Sie werden nach ihren unterschiedlichen Mobilitäten getrennt. Zusätzlich wird mit Hilfe der Pumpe eine mobile Phase durch die Kapillare gefördert, die zur weiteren Elution der Probemoleküle beiträgt. Dabei kommt es zu Stoffaustauschphänomenen zwischen den Partikeln der stationären Phase in der Kapillare, den Pufferionen und den Probemolekülen. Somit resultiert ein weiterer Trenneffekt.

Die hohe Selektivität der stationären Phase wird zusätzlich zu den elektrophoretischen Trennphänomenen genutzt, so dass gut aufgelöste Peaktrennungen möglich sind.

Die Kapillar-Elektrochromatographie besitzt gegenwärtig in der bioanalytischen Forschung oft nur akademisches Interesse. Ein signifikanter und apparativer Durchbruch für die Routineanalytik und Applikation ist zunehmend in Sicht und wird auch innerhalb der Miniaturisierung leistungsfähiger analytische Methoden eine wichtige Rolle spielen. Die Kombination von zwei so sehr unterschiedlichen Trennmethoden kann auch als „hyphenated technique“ bezeichnet werden.

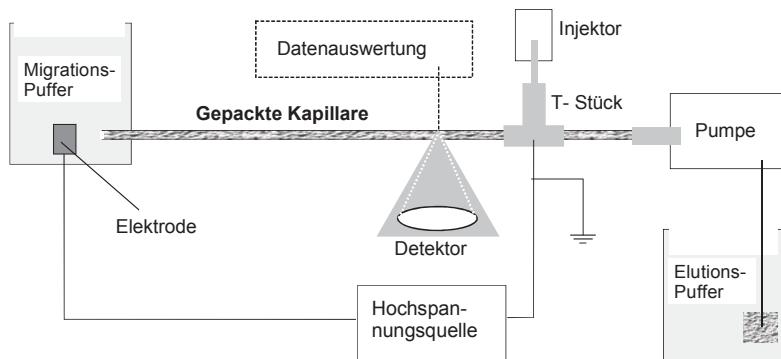


Abb. 8.49 Prinzipieller Aufbau der Kapillar-Elektrochromatographie

8.6 Literatur

- Andrews AT (1986) Electrophoresis, theory techniques and biochemical and clinical applications, Clarendon Press, Oxford
- Wagner H, Kuhn R, Hofstetter S (1989), In: Wagner H, Blasius E (Hrsg.): Praxis der elektrophoretischen Trennung, Springer-Verlag, Heidelberg
- Westermeier R (1990): Elektrophorese-Praktikum, VCH-Verlag, Weinheim
- Tiselius A (1937) Trans Faraday Soc 33:534
- Maurer, RH (1968) Disk-Elektrophorese - Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese, Walter de Gruyter, Berlin
- Sanger F, Coulson AR (1975) J Mol Biol 94:441
- Schägger H, von Jagow G (1987) Anal Biochem 166:368
- Everaerts FM, Becker JM, Verheggen ThPEM (1976) Isotachophoresis, theory, instrumentation and applications, J Chromatogr Library Vol 6, Elsevier, Amsterdam
- Görg A, Postel W, Westermeier R (1978) Anal Biochem 89:60
- Righetti PG, In: Works TS, Burdon RH (Eds.) (1983) Isoelectric focusing: theory, methodology and applications, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) J Chromatogr 218:209
- Hjertén S (1983) J Chromatogr 270:1
- Li SFY (1992) Capillary electrophoresis: principles, practice, and applications, J chromatogr lib, Vol 52, Elsevier, Amsterdam
- Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S (1993) Capillary electrophoresis: principle and practice, Springer-Verlag, Berlin
- Foret F, Kriváková L, Bocek P (1993) Capillary Zone Electrophoresis, VCH-Verlag Weinheim
- Engelhardt H, Beck W, Schmitt T (1994) Kapillarelektrophorese, Friedr. Vieweg & Sohn Verlag, Braunschweig
- Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G (1983) J Chromatogr 264:385

- Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T (1984) Anal Chem 56:113
Rose DJ, Jorgenson JW (1988) Anal Chem 60:642
Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) Clin Chem 27:209
Schomburg G (1991) Trends Anal Chem 10:163
Cohn AS, Paulus A, Karger BL (1987) Chromatographia 24:14
Hjerten S, Liao JL, Yao K (1987) J Chromatogr 387:127
Görg A, Fawcett JS, Chrambach A (1988) Adv Electrophoresis 2:1
Righetti PG (1990) Immobilized pH gradients: Theory and methodology, Elsevier, Amsterdam
Bocek P, Deml M, Gebauer P, Dolnik V (1988) Analytical isotachophoresis, VCH-Verlag, Weinheim
Everaerts FM, Verheggen PEM, In: New directions in electrophoretic methods, Jorgenson JW, Phillips M (1987) Amer Chem Soc Symp Vol. 335, Washington DC, Chap 4
Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T (1984) Anal Chem 56:111
Terabe S, Otsuka K, Ando T (1985) Anal Chem 57:834
Nishi H, Terabe S (1990) Electrophoresis 11:691
Eimer T, K. Unger KK, Tsuda T (1995) Fresenius J Anal Chem 352:649
Pyell U, Rebscher H, Banholzer A (1997) J Chromatogr 779:155
Gey MH (1998) Instrumentelle Bioanalytik, Friedr Vieweg & Sohn Verlag Braunschweig Wiesbaden
Lottspeich F, Engels JW (2006) Bioanalytik, Spektrum Acad Verlag München
Lieber DC (2002) Introduction to proteomics, Humana Press Totowa New Jersey

Der Optimist sieht in jeder Schwierigkeit
eine Gelegenheit. Der Pessimist sieht in
jeder Gelegenheit eine Schwierigkeit.

Günter F. Gross

9 Atomspektroskopie

9.1 Einführung in die Atomspektroskopie

Die ersten Entdeckungen und Arbeiten über die Grundlagen der Spektroskopie im allgemeinen und der Atomspektroskopie im besonderen reichen weit zurück. Bereits im Jahre 1648 beschrieb J. M. Marci die Entstehung des Regenbogens auf der Basis von Streuung und Beugung des Lichtes in Wassertröpfchen. Im Jahre 1815 wurden von Fraunhofer im kontinuierlichen Spektrum der Sonne dunkle Linien entdeckt. Durch Kirchhoff und Bunsen, die verdampfte Salze in Flammen untersuchten (1860), konnte das Phänomen der Fraunhoferschen Linien aufgeklärt werden. Aus ihren Experimenten resultierten folgende Schlussfolgerungen:

1. Die beobachteten Linien sind auf Atome und nicht auf ihre Verbindungen zurückzuführen.
2. Atome, die bei einer bestimmten Wellenlänge Licht absorbieren, emittieren das Licht bei der gleichen Wellenlänge. (Gesetz von der Gleichartigkeit von Absorption und Emission).
3. Die gemessenen Linienspektren sind für eine Atomart charakteristisch.

Die Zusammenhänge zwischen Atombau und der Wechselwirkung der Atome mit elektromagnetischer Strahlung konnte um 1900 Max Planck im Gesetzt der quantenhaften Absorption und Emission darstellen. Danach absorbiert ein Atom nur Strahlung einer bestimmten Wellenlänge und Frequenz. Es kann nur diskrete Energiebeträge aufnehmen und wieder abgeben.

Die Atomspektroskopie ist heute eine etablierte physikalische Methode der Analytischen Chemie, die auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und isolierten Atomen beruht. Diese Wechselwirkung ist dabei mit der Änderung des Energiezustandes von äußeren Elektronen verbunden. Freie Atome entstehen durch Atomisierung der Analysenprobe in einer Flame oder in einem Plasma. Als Phänomene treten die Atomabsorption, Atomemission und die Atomfluoreszenz auf (Abbildung 9.1). Bei der Atomabsorption absorbieren die Atome Teile der elektromagnetischen Strahlung (ultravioletter und sichtbarer Spektralbereich, vgl. auch Abbildung 10.6) einer Lichtquelle und das nichtabsorbierte Licht wird vom Detektor registriert. Elektronen der Atome gelangen dabei vom Grundzustand in einen angeregten Zustand. Der Emissionsvorgang findet bei Atomen statt, die sich auf Grund der hohen thermischen Energie einer Flamme oder eines Plasmas bereits im angeregten Zustand befinden. Beim Zurückspringen der Elektronen in den Grundzustand wird Licht emittiert.

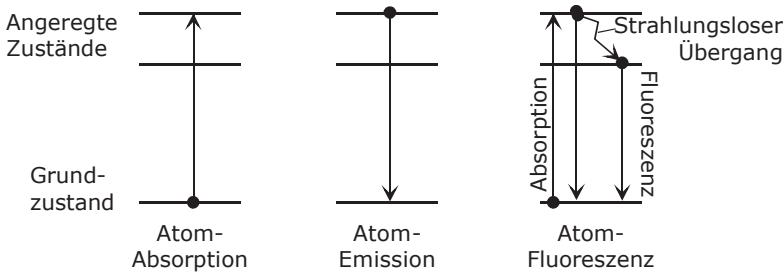


Abb. 9.1 Absorption, Emission, Fluoreszenz durch Atome in einem Atomisator

Zur Erzeugung von Fluoreszenz müssen die Atome mit Hilfe einer externen Lichtquelle oder mit einem Laser angeregt werden. Das Atom kann die absorbierten Wellenlänge wieder emittieren oder die Elektronen können in ein geringfügig niedrigeres Energieniveau übergehen (strahlungsloser Übergang) und von dort unter Aussendung von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand zurückkehren.

Bei der qualitativen atomspektroskopischen Analyse werden für jedes Element charakteristische Linien registriert. Diese Atomlinien sind i.d.R. äußerst schmal (10^{-3} bis 10^{-2} nm), so dass die Spektrallinien mehrerer Elemente ohne Überlappungen (Interferenzen) gleichzeitig registriert werden können (Abbildung 9.2).

Im Falle einer quantitativen Analyse gibt die Intensität, mit der die Atomlinien emittiert oder absorbiert werden, Auskunft über die Konzentration des betreffenden Elementes in der Probe. Dafür ist auch eine Kalibrierkurve zu erstellen.

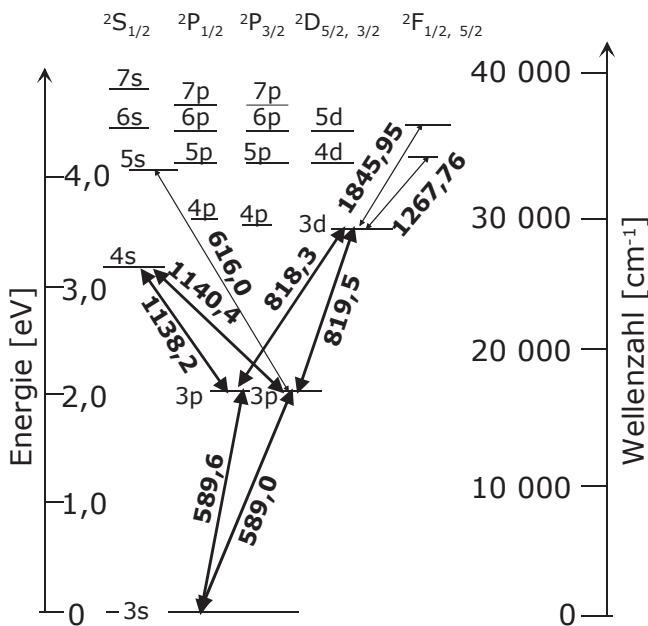


Abb. 9.2 Termschema und ausgewählte Linien des Na-Spektrums (Ausschnitt)

9.2 Atomemissionsspektroskopie

In der Atomemissionsspektroskopie erfolgt die Atomisierung der Elemente meist in einer Flamme (Flammen-Atomemissionsspektroskopie; F-AES: *flame–atom emission spectroscopy*) oder in einem Plasma (Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma; ICP-OES: *inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy*). Zur Anregung der Atome können auch elektrische Funken oder Bögen sowie Laser dienen.

Die Zahl aller Elektronenübergänge, die auch die Anzahl aller Atomlinien repräsentiert, wird durch die Zahl und Anordnung der äußeren Elektronen bestimmt. Atome, die nur wenige Außenelektronen besitzen, weisen somit relativ linienarme Spektren (und umgekehrt) auf.

9.2.1 Flammen-Atomemissionsspektroskopie

In Abbildung 9.3 ist der prinzipielle Aufbau eines F-AES-Gerätes dargestellt. Im Gegensatz zur AAS ist keine Lichtquelle erforderlich. Die Probe wird direkt in die Flamme – dem Atomisator – appliziert. Bedingt durch die hohe Energie und Temperatur der Flamme (Tabelle 9.1) erfolgt eine schlagartige Transformation der Analyte in den angeregten Zustand. Die emittierenden Atomlinien gelangen anschließend durch einen Monochromator, wobei aber auch bestimmte Spektralbereiche bzw. Atomlinien damit ausgeblendet werden können. Als Monochromatoren dienen Gitter, deren Vorteil in einer hohen Auflösung der Atomlinien besteht und die aber im Vergleich zu einem Prisma eine geringere Lichtintensität hindurch lässt. Das Prisma besitzt aber nur ein geringes spektrales Auflösungsvermögen. Der Detektor registriert die einzelnen Spektrallinien, die er in Form eines „Linien-Spektrums“ abbildet. In der Atomemissionsspektroskopie können mehrere Linien eines Elementes sowie die von verschiedenen Elementen simultan erfasst und dargestellt werden. F-AES und ICP-OES gelten deshalb als sogenannte Multielementmethoden.

Die Vorgänge der Atomisierung in einer Flamme lassen sich im klassischen Sinne anschaulich am Beispiel einer Natriumchlorid-Lösung zusammenfassen, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist.

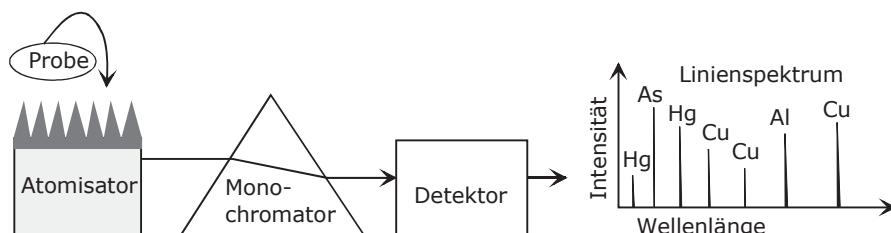
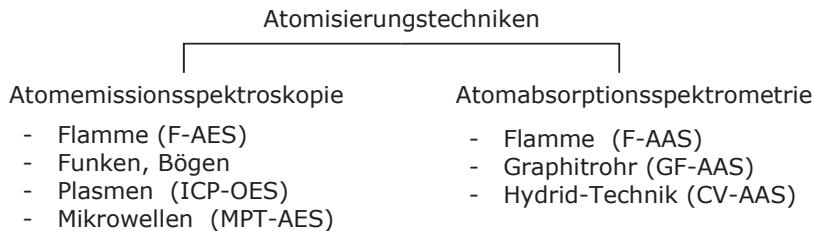


Abb. 9.3 Prinzipieller Aufbau eines F-AES-Gerätes

Tabelle 9.1 Vorgänge in der Flamme

Reaktionsvorgang	Reaktionsart
1. NaCl-Lösung in die Flamme sprühen ⇒ Lösungsmittel Wasser verdampft ⇒ NaCl _{solid} bleibt zurück	Verdampfung 1
2. NaCl _{solid} → NaCl _{gas}	Verdampfung 2
3. NaCl _{gas} → Na _{gas} + Cl _{gas}	Dissoziation
4. Na _{gas} → Na _{gas} [*]	Anregung (Ionisation)
5. Na _{gas} [*] → Na _{gas}	Emission (gelbe Na-Linie bei 589 nm)

Die einzelnen Atomisierungsarten sind für die verschiedenen atomspektroskopischen Methoden gleichermaßen wichtig. In der Abbildung 9.4 sind die technischen Möglichkeiten von Atomisierungen zusammengestellt. Weitere Informationen gehen aus den Tabellen 9.2 und 9.3 hervor.

**Abb. 9.4** Atomisatoren in der Atomspektroskopie (Auswahl)

9.2.2 Induktiv-gekoppeltes Plasma - OES

Die Optische Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES) gehört zu den Multielementanalysen und zeichnet sich auf Grund der Verwendung eines sehr heißen Plasmas (ca. 10 000 K) durch einen hohen Atomisierungsgrad aus. Unter Plasma versteht man eine Art „elektrische“ Flamme. Es ist ein in positive (Ionen) und negative (Elektronen) dissoziertes Gas und verfügt somit über frei bewegliche, elektrisch geladene „Partikel“. Um das Plasma aufrecht zu erhalten, wird elektrische Energie auf ein Arbeitsgas (Argon, Helium) übertragen. Dabei wirken elektromagnetische Felder und Wellenlängen im Radio- und Mikrowellenbereich.

Aus dem hohen Atomisierungsgrad resultieren eine längere Verweilzeit, eine bessere Temperaturhomogenität, höhere Präzisionen und Reproduzierbarkeiten sowie sehr niedrige Nachweisgrenzen (NWG). Simultan können bis zu 70 Elemente bestimmt werden.

Bevorzugte Einsatzgebiete der ICP-OES liegen vor allem im Bereich der Umweltanalytik, wo die Elementzusammensetzung von Wasser, Böden, Abfällen, Düngemittel und Pflanzen ermittelt wird.

Die relativ hohen aber auch unterschiedlichen Temperaturen in einem induktiv gekoppelten Plasma, die in den einzelnen Zonen einer Argonatmosphäre gemessen wurden, sind in der Abbildung 9.5 schematisch dargestellt. Die höchste Temperatur besitzt der „Plasmakern“ mit 10 000 K. In vertikaler Richtung der Plasmaflamme (nach oben) verringert sich die Temperatur auf 6 000 K.

Als weitere Anregungsquellen zur Atomisierung kommen neben dem ICP in der optischen Atomemissionsspektroskopie auch Flammen (2 400–3 400 K), Bögen (6 000 K), Funken (10 000 K), das stromführende Gleichstromplasma (DCP: *direct current plasma*; 5 000 K) und das durch Mikrowellen unterstützte Plasma (MIP: *microwave induced plasma*; Frequenzbereich: 2,45 GHz, Wellenlängen: 30 cm–0,3 mm) zum Einsatz.

Ausgewählte Applikationsbeispiele des Einsatzes der ICP-OES-Technik in der Elementanalytik sind in der Abbildung 9.6 schematisch und stark vereinfacht dargestellt. Anhand der Analyse von Kupfer und Phosphor (A) wird die Leistungsfähigkeit dieser Methode sichtbar. Trotz der sehr geringen Unterschiede zwischen den Linien im Spektrum, können beide Elemente simultan bestimmt werden. Die Abbildung 9.6 (B) zeigt, dass sehr nah beieinander liegende Atomlinien des Elementes Eisen vergleichbar gut erfasst werden können.

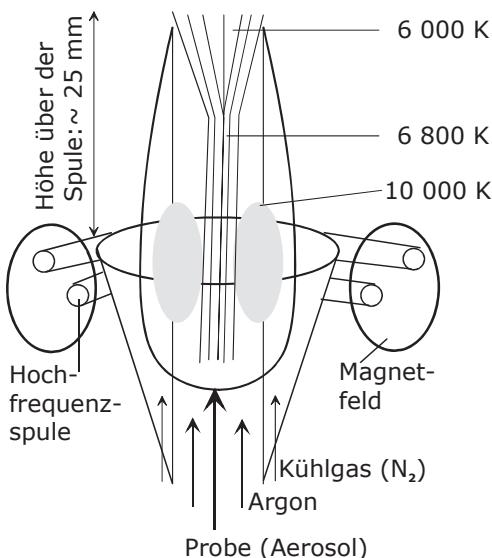


Abb. 9.5 Plasma-Flamme

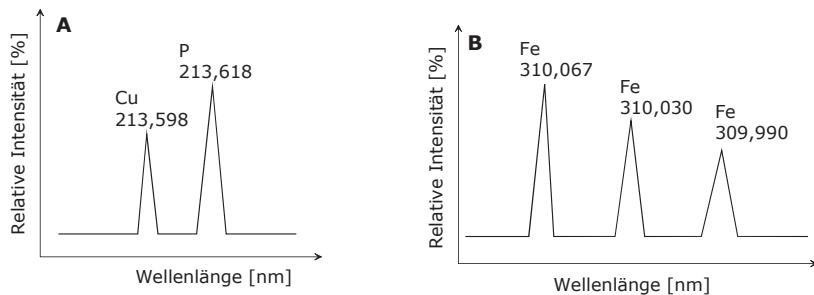


Abb. 9.6 Applikationen der ICP-OES (schematisch)

- A: Analyse von Kupfer und Phosphor
- B: Analyse von Eisen (Ausschnitt)

9.3 Atomabsorptionsspektrometrie

In der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) absorbieren freie Atome das für sie charakteristische Licht, das von einer elementspezifischen Lichtquelle (HKL: Hohlkathodenlampe) ausgeht. Man unterscheidet zwischen der Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS), der Graphitrohr-Technik (GF-AAS: *graphite furnace*-AAS) und der Hydrid-Technik, die auch als CV-AAS (*cold vapour*-AAS) bezeichnet wird.

9.3.1 Aufbau eines AAS-Gerätes

Die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) geht auf Walsh (1955) zurück. Er konnte als Erster den analytischen Nutzen der Absorption von freien Atomen nachweisen.

In der Abbildung 9.7 ist der prinzipielle Aufbau eines herkömmlichen AAS-Gerätes dargestellt. Es besteht aus Hohlkatodenlampe (HKL), Atomisator, Monochromator und Empfänger (Detektor). Die HKL emittiert Licht des zu bestimmenden Analyten (Elements). Im Atomisator wird die zugeführte Probe in einzelne Atome zerlegt. Diese werden durch das UV/VIS-Licht der Hohlkathodenlampe in einen angeregten Zustand überführt. Dabei wird Licht absorbiert.

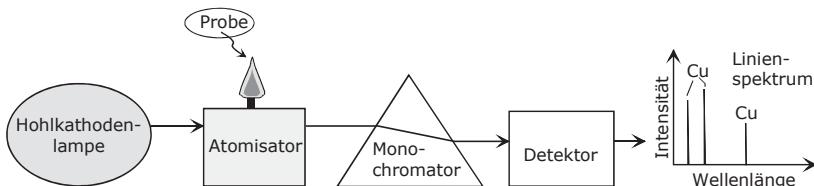


Abb. 9.7 Prinzipieller Aufbau eines AAS-Gerätes

Zur Ausblendung störender Strahlung dient der Monochromator. Mit Hilfe eines Empfängers (SEV: Sekundärelektronenvervielfacher) erfolgt die Registrierung der einzelnen sehr schmalen Atomlinien des Elements.

9.3.1.1 Funktionsweise einer Hohlkathodenlampe

Im Glaskörper einer Hohlkathodenlampe befinden sich eine Kathode, die aus dem zu bestimmenden Element (Analyt) besteht sowie ein Edelgas wie z.B. Argon oder Neon. Die Zündung der Lampe erfolgt durch Anlegen einer Gleichspannung (ca. 600 V). Dadurch kommt es zu einer Glimmentladung, die die Emission von Lichtstrahlung aus dem Kathodenmaterial hervorruft. Der in der Hohlkathodenlampe vorhandene Niederdruck von 200 bis 600 Pa bewirkt eine sogenannte kalte Emission, die Emissionslinien mit einer Breite von 10^{-3} bis 10^{-4} nm hervorruft. Diese treten durch das Quarzfenster, das auch UV-Licht passieren lässt, und gelangen in den Atomisator.

Zur Kompensation des Untergrundes bei einer AAS-Messung wird alternierend zur Hohlkathodenlampe eine Deuteriumlampe im Strahlengang angeordnet, die auf die gesamte Spaltbreite des Monochromators von 0,1 bis 3 nm abgebildet wird. Beide Lampen werden auf gleiche Strahlungsintensität abgeglichen.

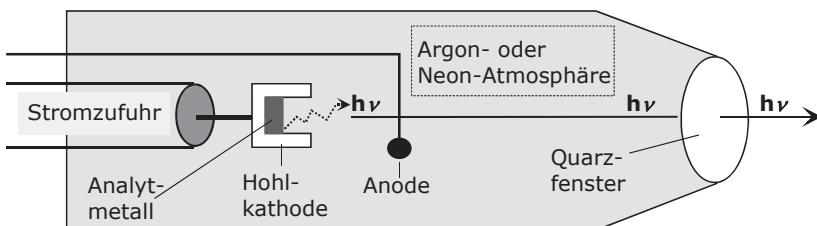


Abb. 9.8 Schematischer Aufbau einer Hohlkathodenlampe, HKL

9.3.2 Atomisierung

Ziel der Atomisierung ist, einen möglichst großen Anteil von Atomen in den gasförmigen Aggregatzustand zu überführen. Dazu müssen die Analyte einer Probe verdampft werden und in freie Atome dissoziieren. Zur Atomisierung dienen in der AAS vorwiegend Flammen (F-AAS) und Graphitrohröfen (GF-AAS).

9.3.2.1 Flammen-Absorptionsspektrometrie

Die Überführung der Analyte einer gelösten Probe in einzelne Atome erfolgt im einfachsten Falle mit Hilfe einer Flamme. Die Abbildung 9.9 zeigt den schematischen Aufbau eines Laminarbrenners mit Vorkammerzerstäuber für die Flammen-AAS. Als Gase werden das Brenngas und Oxidationsgas zugeführt. Das Oxidationsgas kann als Hilfsgas oder Zerstäubergas zugeleitet werden.

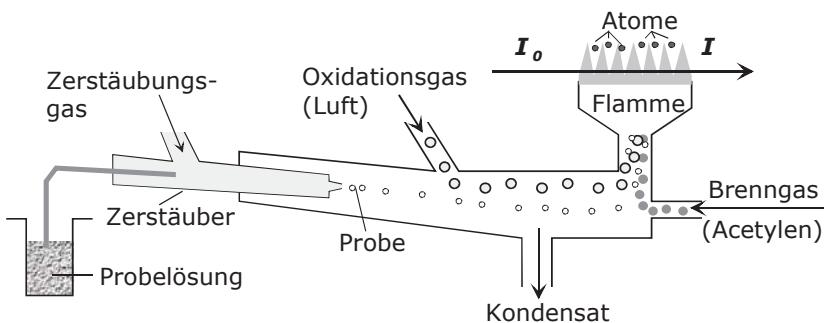


Abb. 9.9 Brenner mit Zerstäuber für die Flammen-AAS

Einige typische Flammenkombinationen sind in Tabelle 9.2 enthalten. Für die meisten Elemente ist ein Gasgemisch aus Acetylen und Luft geeignet. Für schwer verdampfbare Elemente (z.B. Mg, Ca, Sr, Mo, W) oder Seltenerdelemente sind Gaskombinationen höherer Temperatur (Acetylen/Lachgas: 3 100 K) erforderlich, während für die Analyse von Alkalimetallen eine Methan/Luftflamme mit Temperaturen um 2 000 K bereits ausreichend ist.

Tabelle 9.2 Kombinationen von Verbrennungsflammen für Atomisierung von Elementen

Brenngas	Oxidationsgas	Temperatur [K]	Elementspecies
Acetylen	Lachgas	3 200	Al, B, Si u.a.
Acetylen	Sauerstoff	3 000	die meisten Elemente
Acetylen	Luft	2 200	die meisten Elemente
Wasserstoff	Luft	2 100	As, Se
Butan	Luft	1 700	Alkalimetalle
Butan	Sauerstoff	2 600	

Folgende Reaktionen laufen bei der Atomisierung in der Flamme ab:

1. Verdampfung der Probelösung und ihrer Bestandteile.
2. Dissoziation der Metallsalze in freie Atome.
3. Anregung der freien Atome durch die Emissionsstrahlung aus der HKL.
4. Ionisierung der Atome parallel zur Dissoziation.

9.3.2.2 Graphitrohr-Technik

Auch in der elektrothermischen Atomisierung (GF-AAS) sind vergleichbare Reaktionsverläufe zu erwarten. Diese Atomisierungsart erfolgt in einem Kohlerohrofen, der als Graphitrohrküvette bezeichnet wird und auf Arbeiten von L'VOV (1958) und MASSMANN (1970) zurückgeht.

Das Graphitrohr selbst ist ca. 4 cm lang und hat einen Durchmesser von 1 cm (Abbildung 9.10). Die Probelösung wird mit einer Mikroliterspritze in die obere Öffnung des Graphitrohrs dosiert. Das Aufheizen des Ofens erfolgt mit Hilfe eines Temperaturprogramms (Abbildung 9.11). Dazu dient ein Metallblock, der mit einer Spannungsquelle verbunden ist.

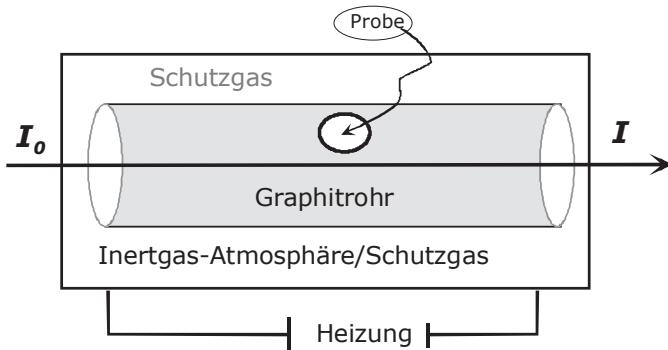


Abb. 9.10 Schematischer Aufbau der Graphitrohrküvette

Der Aufheizvorgang beginnt mit dem Trocknen der Probe bei ca. 450 K innerhalb einer Schutzgasatmosphäre (z.B. Argon). Es schließt sich die Veraschung der Probe bei 600 bis 700 K an, um sie in eine für die Verdampfung geeignete Form zu überführen. Die Vorgänge der Dissoziation, Reduktion oder Ionisation verlaufen bei entsprechend hohen Temperaturen (2 000–3 000 K).

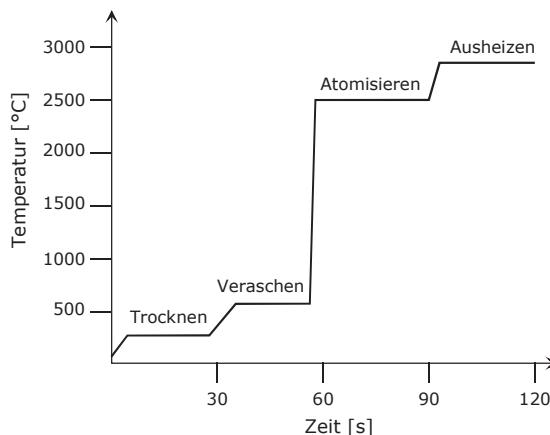


Abb. 9.11 Temperaturprogrammierung einer Graphitrohrküvette

9.3.2.3 Hydrid-Technik in der AAS

Einige Elemente wie Arsen, Antimon, Bismut, Selen, Tellur und Zinn können nach der Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH_4) als Hydride (z.B. AsH_3 , SnH_4 oder H_2Se) verflüchtigt werden (Abbildung 9.12). Die Hydride werden in eine bis auf ca. $1\,000\text{ }^\circ\text{C}$ beheizte Quarzküvette überführt. Dort erfolgt ihre Atomisierung infolge einer thermischen Zersetzung. Dabei zerfallen die Hydride wieder in Wasserstoff und in das zu bestimmenden Element.

Als Küvettenheizung dient entweder eine Elektroheizung oder die Flamme eines Flammen-AAS-Gerätes. Ein Vorteil der Elektroheizung liegt in der günstigeren Temperaturregulation, da nicht jedes zu analysierende Element sein Empfindlichkeitsmaximum bei der gleichen Temperatur hat. Die Hydridtechnik kann in der AAS, aber auch in der ICP-OES eingesetzt werden.

Als eine Art Modifikation der Hydridtechnik dient die sogenannte Kaltdampftechnik (CV-AAS, *cold vapour*-AAS). Diese wird zur Bestimmung von Quecksilber eingesetzt. Das Element kann auf Grund seines hohen Dampfdruckes in metallischer Form bestimmt werden. Die Quecksilberbestimmung bezeichnet man als Kaltdampftechnik, da die Quarzzelle nicht oder kaum beheizt werden muss, wie das in der Hydridtechnik erforderlich ist.

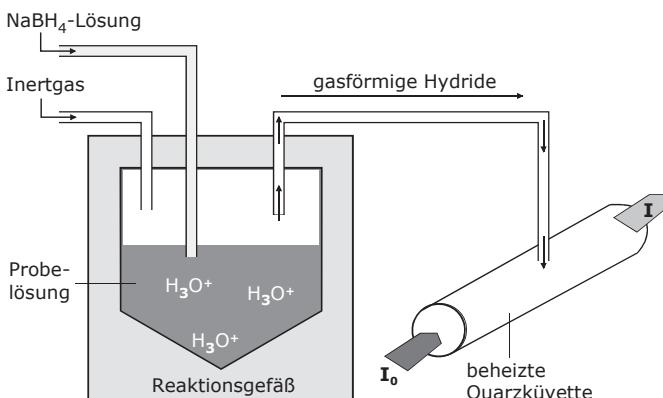


Abb. 9.12 Aufbau der Hydridtechnik

9.3.3 Monochromator und Detektor

In der Atomabsorptionsspektrometrie erfolgt die Anregung der Atome der Analyte auf einer Resonanzlinie durch das Emissionslicht der Hohlkathodenlampe mit hoher Spezifität. Ein Monochromator ist trotzdem erforderlich, um weitere Emissionslinien der Hohlkathodenlampe sowie Streulicht auszublenden.

Der für die AAS signifikante Spektralbereich liegt im ultravioletten und sichtbaren Gebiet (UV/VIS). Er wird von der Ar-Resonanzlinie bei 193,7 nm und der Cs-Linie bei 851 nm begrenzt. Auf Grund der sehr geringen Linienbreite der Atomlinien kommen Prismen als Monochromatoren nicht in Betracht. In der AAS werden hochauflösende Gitter eingesetzt, die eine Gesamtstrichzahl von ca. 10^5 besitzen und 500 bis 3 000 Striche/mm aufweisen.

Als Empfänger werden üblicherweise sogenannte Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet.

9.3.4 Änderung der Spektrenverläufe in der AAS

In der Abbildung 9.7. wurden prinzipieller Aufbau und Funktion eines AAS-Gerätes bereits vorgestellt. Die Hohlkathodenlampe emittiert das Spektrum der charakteristischen Atomlinien des zu bestimmenden Elementes. Im Falle des Kupfers sind die Atomlinien seines Emissionsspektrums in der Abbildung 9.13 schematisch dargestellt. Im Atomisator werden nun entsprechende Intensitäten der Kupferlinien durch den in der aufgegebenen Probe enthaltenen „Analyt Kupfer“ absorbiert. Die Intensitäten werden um die Beträge $x_1 \dots x_5$ reduziert (s. Abbildung 9.14). Der Monochromator kann auf eine signifikante Wellenlänge eingestellt werden.

Innerhalb des Beispiels der Kupferanalyse mittels Atomabsorptionsspektrometrie erfolgte die Auswahl der Atomlinie bei 324,7 nm (Abbildung 9.15). Die übrigen Wellenlängen wurden heraus gefiltert. Dies sind die Linien bei 222,6 nm bis 327,4 nm.

Schließlich wird das Kupferspektrum durch Vergleich mit der Ausgangsintensität vom Detektor aufgezeichnet (Abbildung 9.16).

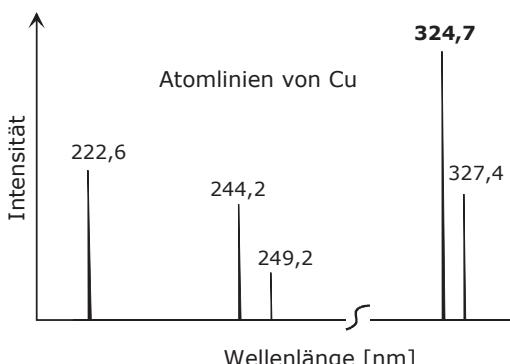


Abb. 9.13 Emissionsspektrum von Cu aus einer HKL (schematisch)

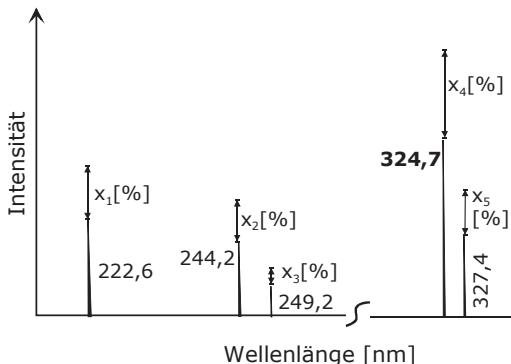


Abb. 9.14 Spektrum von Cu nach der Absorption im Atomisator (schematisch)

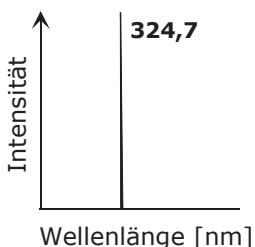


Abb. 9.15 Spektrum von Kupfer nach dem Monochromator

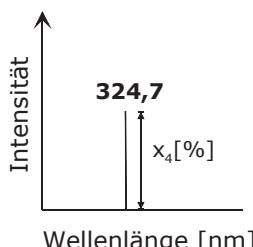


Abb. 9.16 Registriertes Spektrum von Kupfer bei 324,7 nm

9.3.5 Qualitative und quantitative Analyse von Elementen

Das Resultat einer atomabsorptionsspektrometrischen Analyse ist ein Linienspektrum für die einzelnen Elemente bzw. Atome, in dem ein Signal (Extinktion) gegen den Wellenlängenbereich aufgetragen ist (Abbildung 9.17).

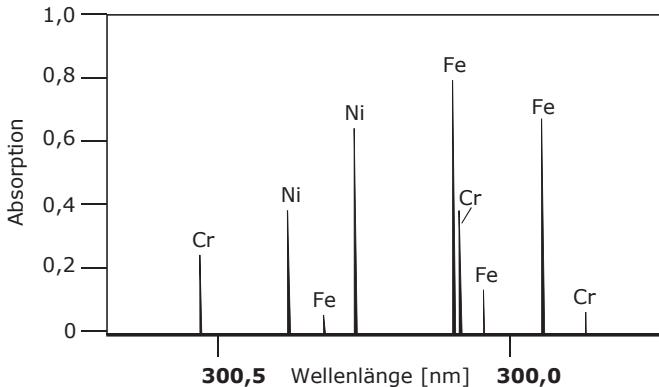


Abb. 9.17 Spektrum einer Stahl-Hohlkathodenlampe (schematisch)

Charakteristisch sind die äußerst schmalen Atomlinien, die in einem Bereich von ca. 0,7 nm registriert werden und die die qualitative Bestimmung eines Elements ermöglichen.

Tabelle 9.3 zeigt die Resonanzlinien für einige ausgewählte Elemente. Die dick unterstrichenen Linien werden bevorzugt auf Grund ihrer höheren Intensität in der AAS-Analytik gewählt. So können die toxischen Elemente Arsen z.B. bei 193,7 nm oder Quecksilber bei 253,7 nm sehr sensitiv nachgewiesen werden.

Bandenspektren wie in der Molekülspektroskopie erstrecken sich dagegen über eine Breite von mehreren Nanometern bis zu ca. 100 nm.

Tabelle 9.3 Resonanzlinien wichtiger Elemente in der AAS (Auswahl)

Element	Atomlinien				
Arsen	189,0	<u>193,7</u>	197,3		
Quecksilber	184,9	<u>253,7</u>			
Kupfer	222,6	244,2	249,2	<u>324,7</u>	327,4
Aluminium	257,5	308,2	<u>309,3</u>	394,4	396,1
Kobalt	240,7	241,1	242,5	252,1	340,6

Die quantitative Analyse beruht auf dem Zusammenhang zwischen dem Absorptionsignal, das nach dem Passieren der Flamme bzw. des Graphitrohrofens gemessen wird, und der Analytkonzentration in der Probe.

Grundlage dafür ist das LAMBERT-BEERSCHE Gesetz (s.a. 10.2.6).

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c \quad (9.1)$$

wobei

E die gemessene Extinktion,

I_0 die Intensität des eingestrahlten Lichtes,

I die Intensität des durchgelassenen Lichtes,

l die Weglänge des Lichtes durch die Flamme oder das Graphitrohr,

c die Konzentration des Analyten

sind.

Die Anzahl der Teilchen, die wirklich atomisiert und angeregt werden, ist der Konzentration des Analyten (Zink) in der Lösung direkt proportional. In der Praxis kalibriert man die Extinktion unmittelbar gegen die Lösungskonzentration.

Tabelle 9.4 Nachweisgrenzen (NWG) in der AAS: Flamme vs. Graphitrohr

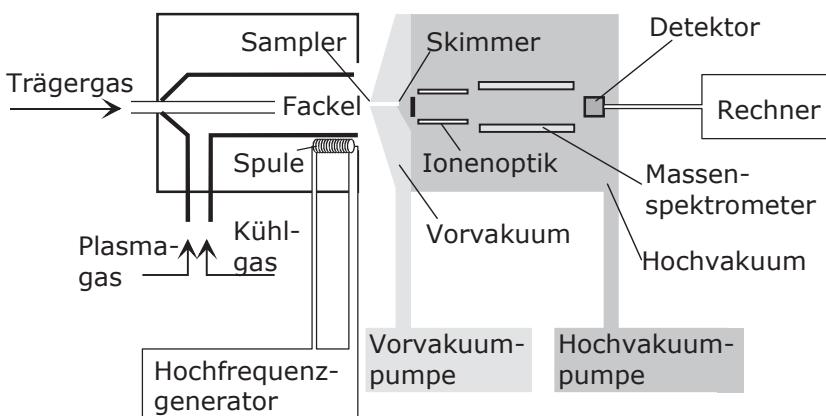
Element	Flamme [$\mu\text{g/l}$]	Graphitrohr [$\mu\text{g/l}$]
Cadmium	0,5	0,003
Blei	10	0,05
Quecksilber	200	2
Kupfer	1	0,02
Aluminium	30	0,01
Selen	100	0,5

9.4 ICP - MS

9.4.1 Prinzipieller Aufbau eines ICP-MS-Gerätes

Die atomspektroskopische Methode ICP-MS (*inductively coupled plasma–mass spectrometry*) gestattet die simultane Bestimmung einer Vielzahl von chemischen Elementen (ca. 70) in kurzer Analysenzeiten und ist bedingt durch das Erreichen sehr niedriger Nachweisgrenzen eine der meist genutzten Methoden innerhalb der Spurenelementanalytik.

Die Abbildung 9.18 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines ICP-MS-Gerätes. Im vorderen Teil befindet sich das ICP für die Atomisierung der Elemente. Hauptbestandteile sind das Plasmagas und der Hochfrequenzgenerator mit Spule, womit die extrem hohen Temperaturen um 10 000 K erreicht werden. Zur Erzeugung des heißen Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertes Argon induziert.

**Abb. 9.18** ICP-MS-Gerät

Aus dem Plasma werden die Ionen durch zwei Blenden hindurch (Sampler und Skimmer) in das Vor- und danach in das Hochvakuum des Massenspektrometers geleitet. In der Ionenoptik erfolgt das Fokussieren der ionisierten Analyte. Danach wird der Ionenstrahl im Massenspektrometer (Quadrupol) in Ionen unterschiedlicher Masse aufgetrennt.

9.4.2 Atomisierung im ICP-MS

Der Atomisierung der Analyte ist in der Abbildung 9.19 dargestellt und wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

Das Trägergas (Argon) gelangt durch das Injektionsrohr in die Fackel (Torch), in der das Plasma erzeugt wird. Sowohl die Fackel als auch das Injektionsrohr müssen sehr hohe Temperaturen aushalten und werden deshalb meist aus Quarzglas, im Falle des Injektionsrohrs, auch aus Al_2O_3 -Keramik hergestellt. Neben dem Trägergas wird in die Fackel das eigentliche Plasmagas (ebenfalls Argon) und zudem ein weiterer, die Fackel kühlender Argon-Strom, geblasen. Beim Starten des ICP wird durch einen Zündfunken ein kleiner Teil des Plasmagases ionisiert, d.h., in positiv geladene Argon-Ionen und Elektronen zerlegt. Dadurch kann aus dem oszillierendem Magnetfeld der Spule ein Strom in das Gas induziert werden, der dieses aufheizt und zur Ionisation weiterer Argon-Atome führt. Wenn ein Gas in diesem Zustand, also in Form von Ionen und freien Elektronen vorliegt, wird es als Plasma bezeichnet. Nach dem Zünden stellt sich ein stabiler Zustand ein, in dem das vorbeiströmende Plasmagas im Bereich der Spule ionisiert und aufgeheizt wird und dort eine stabile Plasmawolke erzeugt. Dabei bewegen sich die Argon-Ionen auf kreisförmigen Bahnen innerhalb des ringförmigen Magnetfeldes der Spule.

Typischerweise hat die an der Induktionsspule zur Erzeugung des oszillierenden Magnetfeldes anliegende Wechselspannung eine Frequenz von etwa 40 MHz und gibt eine Leistung von 900–1200 W ab. Die aus Kupfer bestehende Spule ist hohl und wird innen mit Wasser oder Argon gekühlt.

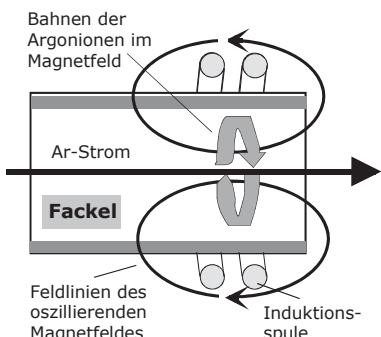


Abb. 9.19 Schematische Darstellung von Plasma und Fackel im ICP-MS

Das Plasma wird durch die induzierte Energie auf 6 000–10 000 K erhitzt. In dieses Plasma wird der Argonstrom des Trägergases im Zentrum der Fackel mit relativ geringer Geschwindigkeit eingeblasen. Durch die hohen Temperaturen im Plasma verdampft die zerstäubte Probe und wird größtenteils ionisiert. Die meisten Elemente liegen im Plasma zu etwa 50–90% in Form von einfach positiv geladenen Ionen vor. Neben den einfach geladenen Ionen entstehen im Plasma aber auch geringe Anteile an zweifach positiv geladenen Ionen und einfache Moleküle, die ebenfalls ionisiert sind. Die Menge der für die MS-Analytik nicht erwünschten Moleküle und mehrfach geladenen Ionen sowie der Teil der erwünschten einfach positiven Ionen ist in hohem Maße abhängig von den Plasmaparametern. Eine Erhöhung des Trägergasflusses bewirkt zwar einen verstärkten Eintrag von Probenmaterial in das Plasma, jedoch sinkt gleichzeitig die Temperatur und die Menge der gebildeten Moleküle nimmt zu.

9.4.3 Interface im ICP-MS

Ein Teil des Plasmas wird durch eine meist aus Nickel gefertigte Blende mit etwa 1 mm Durchmesser, den sogenannten Sampler, in den Bereich des Vorvakums hinein gesaugt. In diesem Bereich herrscht ein Druck von etwa einem Torr (die Atmosphäre und das Plasma haben einen Druck von ca. 760 Torr), der durch die relativ starke Vorvakuum-Pumpe aufrecht erhalten wird. Um möglichst viele Ionen aus der zugeführten Probe durch den Sampler zu bekommen, wird dieser auf das Zentrum des Plasmas, in das der Trägergasstrom eingeleitet wird, justiert. Da das ca. 6 000 K heiße Plasma unmittelbar auf den Sampler aufsetzt, wird dieser durch eine Wasserkühlung in der Halterung temperiert. Diese bildet gleichzeitig den Abschluss des Vorvakums. Etwa 10 mm hinter dem Sampler schließt sich eine zweite Nickelblende an, die man als Skimmer bezeichnet. Eine Hochvakuumpumpe erzeugt hinter dem Skimmer einen Druck von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ Torr. Durch das Druckgefälle am Skimmer wird der Ionenstrahl in den Quadrupol hinein gezogen. Mit der Zeit lagern sich feine Teilchenschichten an beiden Blenden ab, so dass diese öfters gereinigt bzw. geputzt werden müssen.

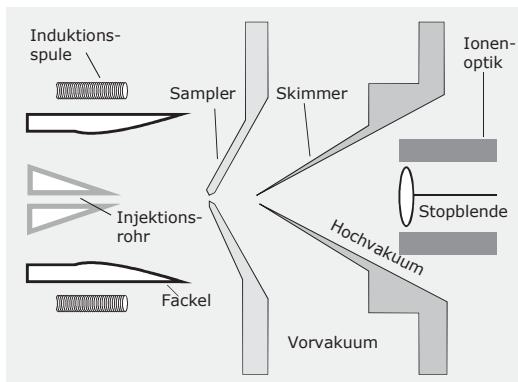


Abb. 9.20 Interface und Ionenoptik im ICP-MS

Bei hohem Probendurchsatz kann sich die Sampler-Bohrung auch verringern, so dass nur wenige Ionen hindurchtreten und eine Abnahme der Sensitivität resultiert. Der Ionenstrahl wird nun innerhalb der Ionenoptik durch mehrere Linsen und Blenden fokussiert und gelangt dann in den Massenanalysator (Quadrupol). Von den ursprünglich im Plasma erzeugten Ionen erreichen nur weniger als 1% das Trennsystem. Eine optimale Einstellung der Geräteparameter ist erforderlich, damit ausreichend viele Ionen aus dem Plasma durch das Interface im Massenspektrometer ankommen.

9.4.4 Quadrupol als Trennsystem im ICP-MS

Das Quadrupol dient zur Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und wird deshalb auch als Trennsystem oder Analysator bezeichnet. Ein Quadrupol besteht aus vier Metallstäben, die als Elektroden dienen. Je-weils die beiden gegenüberliegenden Stabpaare sind an eine um 180 Grad phasen-verschobene Hochfrequenz-Spannung angeschlossen. Außerdem liegt an den Stäben noch eine Gleichspannung an.

Die Ionen werden im Quadrupol-Massenspektrometer durch die anliegenden Spannungen auf eine spiralförmige Bahn gedrängt. In Abhängigkeit vom Verhältnis von Frequenz und Amplitude der Wechselspannung sowie der Gleichspannung können nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis das Trennsystem passieren. Ionen mit einem anderen m/z -Werten gelangen auf Bahnen, deren Durchmesser zunimmt, schlagen infolgedessen auf die Metallstäbe des Quadrupols auf und werden eliminiert.

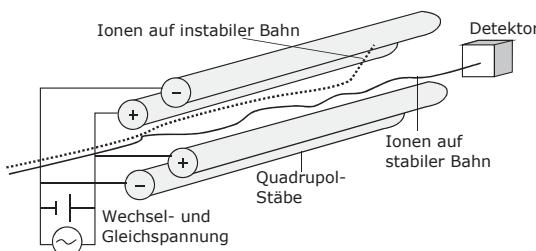


Abb. 9.21 Quadrupol (schematisch)

9.4.5 Detektion

Bei der Detektion der im Quadrupol getrennten Ionen erfolgt eine Umwandlung in ein elektrisches Signal. Das Auftreffen eines Ions am Detektor kann als einzelnes Signal registriert werden oder die ankommenden Ionen werden als Gesamtstrom gemessen. Üblich sind sogenannte Zwei-Stufen-Multiplier mit diskreten Dynoden. Bei diesem Detektionssystem setzen die auftreffenden Ionen aus der ersten Dynode Elektronen frei, die über weitere Dynoden nach dem Elektronen-Multiplier-Prinzip verstärkt werden. Etwa 20 Dynoden sind an dieser mehrstufigen Signalverarbeitung beteiligt. Am Ende des Detektors wird das ankommende Signal mit einer Diskriminatorschaltung in Form von Pulsen gezählt.

9.5 Literatur

- Otto M (2006) Analytische Chemie, VCH-Verlag Weinheim
Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Acad Verlag
Harris DC (1997) Quantitative Analytische Chemie, Friedr Vieweg & Sohn Verlag Braunschweig Wiesbaden
Welz B, Sperling M (1997) Atomabsorptionsspektrometrie, WILEY-VCH
Schwedt G (1995) Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag Stuttgart
Gey M (1975) Diplomarbeit. Bestimmung von Arsen in Galliumphosphid, Universität Leipzig

Mir ist eine gefährliche Freiheit lieber
als eine ruhige Knechtschaft

Rousseau

10 Molekülspektroskopie

10.1 Einführung in die Spektroskopie

Die Spektroskopie beinhaltet die analytischen Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie basieren. Materie bedeutet die Gesamtheit des zu analysierenden Probematerials. Dies können Ionen, Atome, Moleküle oder Atom- und Molekülverbände sein. Unter elektromagnetischer Strahlung versteht man eine mit Lichtgeschwindigkeit sich bewegende Energieart, die u.a. in Form von ultravioletter und sichtbarer Strahlung, Mikro- und Radiowellen oder auch Gamma- und Röntgenstrahlen messbar bzw. sichtbar ist. Man unterscheidet zwischen Methoden (Abbildung 10.1) der Atom- und Molekülspektroskopie.



Abb. 10.1 Bevorzugte spektroskopische Methoden in der (Bio)Analytik

Die Prinzipien und einzelnen Methoden der Atomspektroskopie wurden bereits im Kapitel 9 behandelt. Speziell für die Bioanalytik ergeben sich jedoch nur wenige Einsatzmöglichkeiten. Dazu gehören vor allem Bestimmungen der Elementzusammensetzungen (K, Ca, Na, Mg u.a.) von biologischen Flüssigkeiten (Serum, Urin) im Klinisch-Chemischen Labor. Auch für die Beantwortung von Fragestellungen innerhalb der toxikologischen Analytik ist die Atomspektroskopie sowie neue Kopplungstechniken wie IC-ICP-MS, LC-ICP-MS oder GC-ICP-MS sehr gut geeignet. Beispiele sind die differenzierte Analytik von As^{III}- und As^V-Species oder von Cr^{III}- und Cr^{VI}-Verbindungen mittels IC-ICP-MS, die sich z.T. in ihrer Toxizität erheblich unterscheiden.

Grundlagen der Ionenchromatographie (IC) wurden im Kapitel 5.2.3 behandelt, die Funktionsweisen einer ICP-MS-Kopplung sind in Punkt 9.4 dargestellt.

Die molekülspektroskopischen Methoden sind dagegen fester Bestandteil des Equipments eines modernen bioanalytischen bzw. biochemischen Labors. Sie dienen vor allem der Strukturaufklärung (Strukturanalytische Methoden).

Insbesondere die Massenspektrometrie (Abschnitt 11) in ihren verschiedenen Variationen hat sich in der biochemischen Forschung in den vergangenen Jahren fest etabliert. Dies ist hauptsächlich auf die Entwicklung von sehr schonenden (z.B. Elektrospray oder APCI: *atmospheric pressure chemical ionisation*) und selektiven Ionisierungstechniken für biologische Makromoleküle und die On-line-Kopplung der Massenspektrometrie mit der Flüssigchromatographie (LC-MS) zurückzuführen. Zur exakten Bestimmung der Molekulargewichte von Biomolekülen dienen heutzutage die MALDI-TOF-MS und für die weitere Biopolymer-Charakterisierung durch schonende Fragmentierungen gilt die MALDI-PSD-TOF-MS als sehr leistungsfähige Methode innerhalb der instrumentelle Bioanalytik, weshalb dazu ein gesonderter Abschnitt (11.7.1) erstellt wurde.

Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, Abschnitt 10.5) gehört wie die Massenspektrometrie zu den sehr kostenintensiven, aber auch besonders aussagekräftigen Methoden bei der Strukturaufklärung von organischen bzw. biologischen Molekülen. Die NMR-Technik ist u.a. innerhalb der Glycobiologie für die Aufklärung komplizierter (verzweigter) Oligosaccharid-Strukturen (s. Kapitel 15.12.2.6) prädestiniert.

Die Informationsgehalte, die aus Infrarotspektren (FTIR-Spektren: *fourier transform infrared spectroscopy*) gewonnen werden können, betreffen den Nachweis funktioneller Gruppen und von speziellen chemischen Bindungen. Meist ist die Durchführung von FTIR-Analysen für die Beantwortung von Fragen innerhalb der Bioanalytik im Gegensatz zur organischen Chemie eher untergeordnet.

Die UV/VIS-Spektralphotometer und auch Fluoreszenzspektrometer werden zum großen Teil für die Verfolgung und Auswertung biochemischer Reaktionen (Enzyme-Assays) in Routine und Forschung eingesetzt. Insbesondere als Detektionssysteme für die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) finden spektroskopische Techniken breite Anwendung zur Registrierung und Auswertung von Chromato- und Elektropherogrammen. Mit speziellen Detektoren (Photodioden-Array-Detektion) können von Molekülen, die chromophore Gruppen besitzen, auch signifikante Spektren innerhalb einer HPLC- oder CE-Trennung im On-line-Betrieb aufgenommen werden.

10.2 UV/VIS-Spektroskopie

Das Gebiet der UV-Strahlung liegt zwischen etwa 200 und 400 nm und der daran anschließende sichtbare Spektralbereich erstreckt sich bis ca. 800 nm (siehe Abbildungen 10.6). Das Ergebnis einer UV/VIS-spektroskopischen Messung ist ein Spektrum, bei dem auf der Ordinate die Intensität der elektromagnetischen Strahlung und auf der Abszisse die entsprechenden Wellenlängenbereiche aufgetragen sind. Demgegenüber erfolgt in einem Chromatogramm die Aufzeichnung der Intensität eines Signals (Absorption) gegen die Zeit (s. Abbildung 10.2).

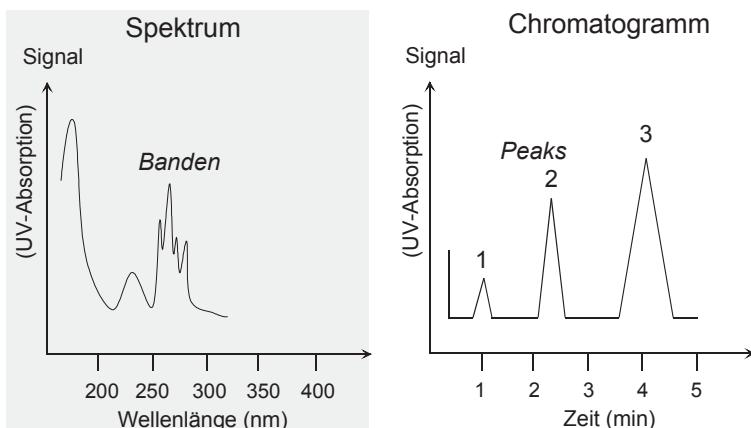


Abb. 10.2 Spektrum versus Chromatogramm

10.2.1 Welle-Teilchen-Dualismus des Lichtes

Zur Erklärung der Eigenschaften elektromagnetischer Strahlung dienen sowohl das Wellen- als auch das Teilchenmodell. Welle-Teilchen-Dualismus ist ein Begriff aus der klassischen Quantenmechanik. Dieser sagt aus, dass Objekte aus der Quantenwelt sich in manchen Fällen nur als Wellen, in anderen als Teilchen beschreiben lassen. Mit der Interpretation der statistischen Wahrscheinlichkeiten im Rahmen der Kopenhagener Deutung (1927: Niels Bohr, Werner Heisenberg) bekam diese Formulierung eine etwas andere Bedeutung. Danach hat jede Strahlung sowohl Wellen- als auch Teilchencharakter, aber je nach dem durchgeföhrten Experiment tritt die eine oder andere Form in Erscheinung.

Mit Hilfe der Wellennatur des Lichtes werden z.B. Frequenz, Wellenlänge, Geschwindigkeit und Amplituden der Strahlung verdeutlicht und beschrieben (Tabelle 10.1). Der Wellencharakter geht u.a. aus Abbildung 10.3 hervor. Da die Frequenz der Lichtquelle und die Lichtgeschwindigkeit konstant bleiben, kann nur die Wellenlänge verändert werden. Deshalb verringert sie sich beim Übergang des Lichtes vom Medium Luft in das Medium Glas (Küvette) um 200 nm.

Tabelle 10.1 Dualcharakter der elektromagnetischen Strahlung

Welle	Teilchen
Wellenlänge λ [nm] $\lambda = c/v$	Photonen: Strom diskreter Teilchen $E = h \cdot \nu$
Lichtgeschwindigkeit c [cm/s]	Photoelektrischer Effekt
Frequenz ν [Hz, 1/s]	Absorption
Amplituden	Emission

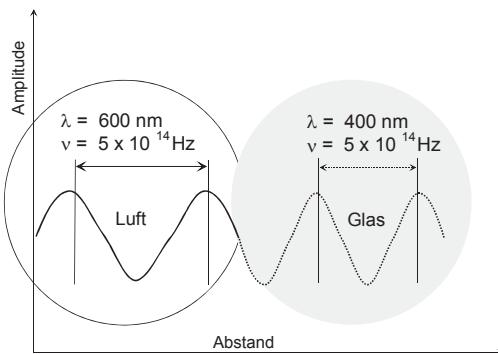


Abb. 10.3 Verringerung der Wellenlänge λ [nm] beim Übergang vom Medium Luft zum Glasmedium

Ursache ist, dass der Übergang von Licht in ein optisch dichteres Medium (z.B. Glas) immer von Wechselwirkungen der elektromagnetischen Strahlung mit den Bindungselektronen begleitet wird. Dadurch verkürzt sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes.

Der Teilchencharakter des Lichtes ist dagegen geeignet, die Phänomene der Absorption und Emission zu erklären. Im einfachsten Fall wird von einem Atom oder Molekül eine diskrete Energiemenge aufgenommen, die ein Elektron vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt (s. Abbildungen 10.4).

Die diskreten Elektronenübergänge (Auswahlregeln), die mit der Aufnahme bzw. Abgabe nur bestimmter „Lichtmengen“ (Quanten) verbunden sind, zeigt Abbildung 10.5. Die Übergänge $\sigma \rightarrow \sigma^*$ sind die energiereichsten. Sie treten im Vakuum-UV-Bereich bei gesättigten Kohlenwasserstoffen (z.B. Methan; $\lambda = 210$ nm) auf. Für Messungen unter 190 nm sind jedoch spezielle Spektrometer mit Vakuumküvetten erforderlich, weshalb diese Übergangsart für die Praxis kaum relevant ist. Beim $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergang werden schon längere Wellenlängen absorbiert. Dies trifft für Verbindungen mit Heteroatomen zu. So zeigen Wasser bei 167 nm, Chloroform ($\lambda = 173$ nm) sowie Methanol bei 184 nm noch Absorptionsen im Vakuumbereich. Oberhalb von 200 nm besitzen Verbindungen wie CH_3NH_2 ($\lambda = 215$ nm) oder $(\text{CH}_3)_3\text{NH}_2$ ($\lambda = 227$ nm) Absorptionsmaxima.

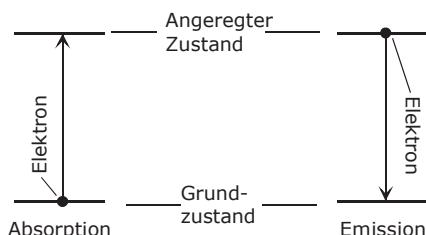


Abb. 10.4 Absorption versus Emission

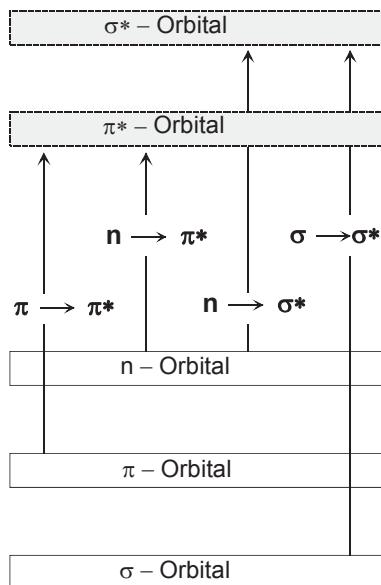


Abb. 10.5 Elektronen-übergänge

Die Elektronenübergänge $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ sind für die UV/VIS-Spektroskopie besonders wichtig. Vor allem π -Elektronen sind im Vergleich zu σ -Elektronen leicht anregbar. Moleküle, die durch diese Übergänge gekennzeichnet sind, zeigen meist signifikante UV/VIS-Spektren (s. Abbildungen 10.11; 10.17; 10.18).

Die Entstehung der Emissionsstrahlung in der Fluoreszenzspektroskopie wird im Abschnitt 10.3 behandelt (s.a. Abbildung 9.1).

10.2.2 Spektralbereiche und Spektrenstrukturen

Die Einteilung der Spektralbereiche elektromagnetischer Strahlung erfolgt an Hand charakteristischer Wellenlängen. Die für spektroskopische Methoden meist genutzten Wellenlängenbereiche sind in Abbildung 10.6 aufgeführt.

Vakuum Ultraviolett (UV)	10 - 200 nm	IR	2,5 - 50 μm
UV - Bereich	200 - 400 nm	Fernes IR	50 - 500 μm
Sichtbarer Bereich (VIS)	400 - 800 nm	Mikrowellen	500 - 1000 μm
Nahes Infrarot (NIR)	800 - 2500 nm	Radiowellen	0,6 - 10 m

Abb. 10.6 Einteilung der Spektralbereiche-I

Kurzwelliger als die Strahlen im UV-Bereich sind Röntgen- und γ -Strahlung, größere Wellenlängen als Mikrowellen besitzen die Radiowellen.

In Abbildung 10.7 wird der Zusammenhang zwischen den einzelnen Spektrenarten (Spektralbereiche) und den entsprechenden Anregungsformen aufgezeigt.

Die schematische Darstellung der resultierenden Banden- und Linienspektren aus der Elektronenanregung im UV- und VIS-Bereich, der Schwingungen im Infrarot-Bereich (IR) und der Rotation im Fernen Infrarot (FIR) geht zusammenfassend aus Abbildung 10.8 hervor.

Nur der sichtbare Bereich (VIS) wird vom menschlichen Auge wahrgenommen. Die einzelnen Farben von Gegenständen werden als sogenannte Komplementärfarben gesehen.

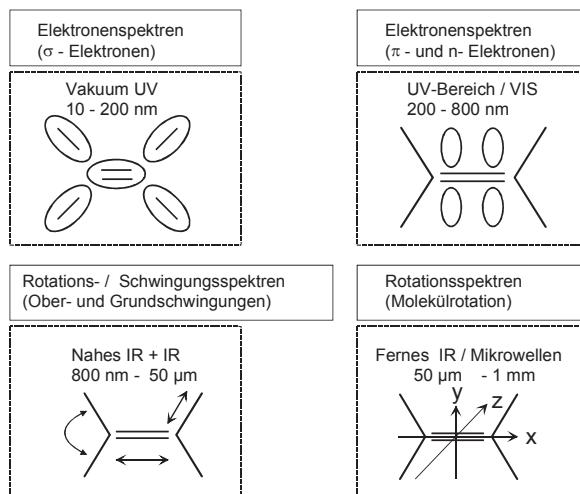


Abb. 10.7 Anregungsformen in der Spektroskopie

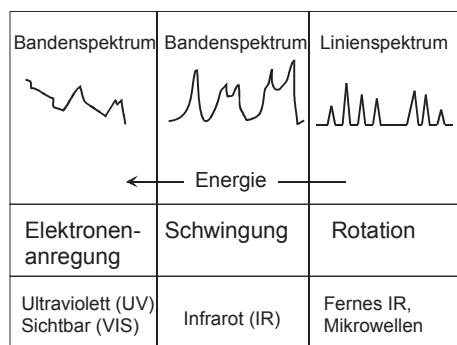


Abb. 10.8 Struktur der Elektronen-, Schwingungs- und Rotationsspektren

10.2.3 Komplementärfarben und Chromophore

Die Gegenstände strahlen nur das Licht (die Farbe) zurück, das nach Absorption bestimmter Wellenlängen an einer undurchlässigen Oberfläche reflektiert oder durch ein transparentes Medium durchgelassen wird. Ein Körper erscheint uns in schwarzer Farbe, wenn das gesamte Licht absorbiert wird. Dagegen ist ein Gegenstand weiß, wenn er das gesamte Licht reflektiert. Die durch das Auge registrierten Komplementärfarben im sichtbaren Wellenlängenbereich sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Komplementär (lat. *complementum*: Ergänzung) ist eine Farbe (blau) immer zu einer anderen Farbe (gelb). Das Entstehen von Komplementärfarben kann jedoch in unterschiedlicher Art und Weise erfolgen, wie die Transmissionsspektren (s. auch Kapitel 10.2.6) in Abbildung 10.9 aufzeigen sollen. Eine rot aussehende Lösung lässt nur rotes Licht (Wellenlänge um 650 nm) hindurch, während alle anderen Wellenlängen eliminiert werden (linker Teil der Abbildung 10.9). Andererseits erscheint eine Lösung auch rot, wenn sie die entsprechende Komplementärfarbe (Blaugrün: λ ca. 500 nm) von Rot absorbiert (rechts).

Tabelle 10.2 Komplementärfarben des „Sichtbaren Bereichs“

Absorberter Wellenlängenbereich [nm]	Farbe	Komplementärfarbe
400-435	violett	gelb-grün
435-480	blau	gelb
480-490	grün-blau	orange
490-500	blau-grün	rot
500-560	grün	purpur
560-580	gelb-grün	violett
580-595	gelb	blau
595-610	orange	grün-blau
610-750	rot	blau-grün

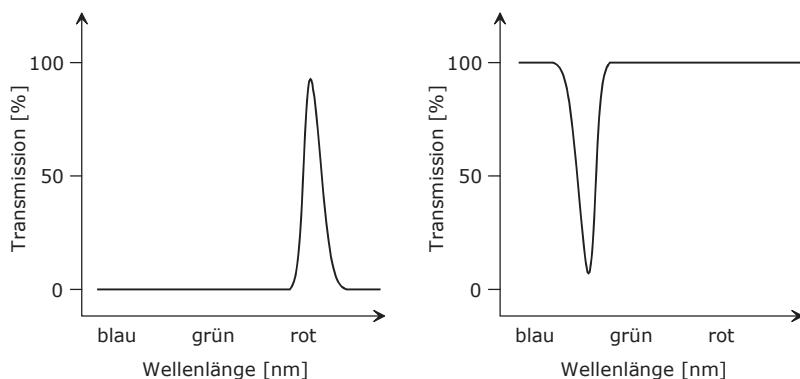


Abb. 10.9 Entstehung von Komplementärfarben

Wie bereits erwähnt, sind die Elektronenübergänge $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ für die UV/VIS-Spektroskopie besonders signifikant. π -Elektronen sind in diesem Spektralbereich besonders leicht anregbar.

Als Chromophor (griech. *Farbträger*) bezeichnet man den Teil eines Farbstoffes, in dem anregbare Elektronen verfügbar sind. Chromophore sind konjugierte Systeme von Mehrfachbindungen und freien Elektronenpaaren an Heteroatomen unter dem elektronischen und sterischen Einfluss angrenzender nichtkonjugierter Molekülteile. Dies zeigt das Beispiel der Strukturformel des Strychninmoleküls (Abbildung 10.10). Der Bereich der dick gezeichneten Bindungen (Doppelbindungen, freies Elektronenpaar am Heteroatom) bildet den chromophoren Molekülteil, der auch für das ausgeprägte Bandenprofil im UV-Spektrum (Abbildung 10.11) verantwortlich ist.

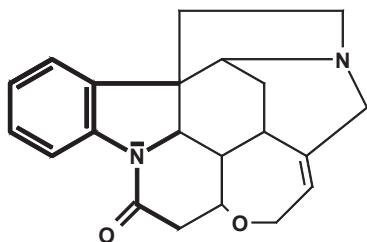


Abb. 10.10 Struktur von Strychnin

Strychnin ist ein äußerst giftiges Alkaloid, das in den Samen der Brechnus (*Strychnos nuxvomica*) vorkommt. Schon in geringen Dosen bewirkt es eine Starre der Muskeln. Es wird auch als Rattengift eingesetzt. Ein Menge von 30–100 mg Strychnin kann für einen Erwachsenen bereits tödlich sein.

Ungeachtet seiner hohen Toxizität wurde Strychnin in der Heilkunde als Analgesikum eingesetzt und zählt in Form der Brechnussamen zu den beliebtesten homöopathischen Arzneimitteln. Strychnin steht auch auf der Dopingliste.

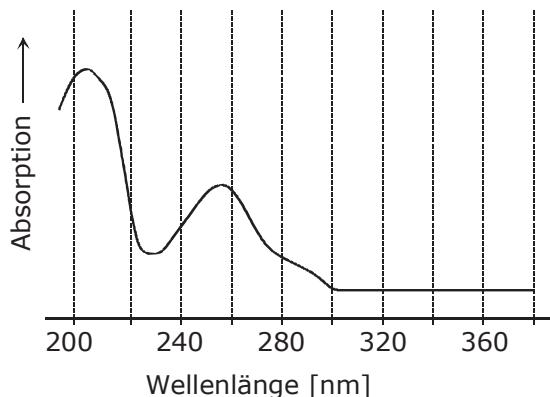


Abb. 10.11 UV-Spektrum von Strychnin (schematisch)

Bei vielen natürlichen Farbstoffen dient ein ausgedehntes System von konjugierten Doppelbindungen als Chromophor. Besonders charakteristisch ist der rote Farbstoff Lycopin in der Tomate (Abbildung 10.12, A). Auch die Chromophore anderer natürlicher Farbstoffe wie Carotine (10.12, B) der Karotte oder das Chlorophyll sind ausgedehnte π -Elektronensysteme konjugierter Doppelbindungen.

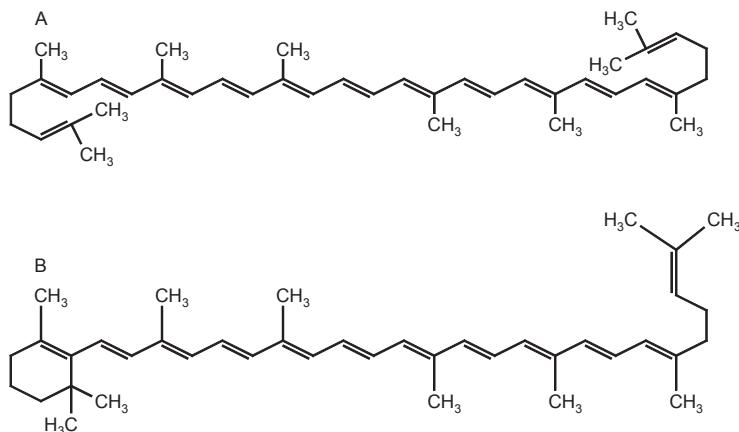


Abb. 10.12 Konjugierte Doppelbindungen im Lycopin (A) und γ -Carotin (B)

Für synthetische Azofarbstoffe ist die Azogruppe als „Chromophor“ signifikant (Abbildung 10.13, A). Die mit R gekennzeichneten Strukturen stehen meist für aromatische Ringe wie das Beispiel Methylorange (10.13, B) zeigt.

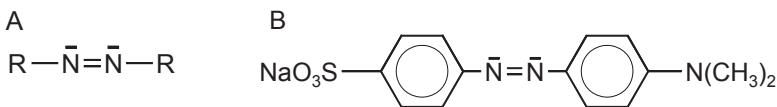


Abb. 10.13 „Chromophore“ in Azofarbstoffen (B: Methylorange)

Chinoide Systeme (Abb. 10.14, A) sind auch durch Chromophore gekennzeichnet. Diese treten u.a. in Triphenylfarbstoffen (Füchsin, Phenolphthalein) auf.

Bei den Nitrofarbstoffen fungiert die Nitrogruppe (10.14, B) als Chromophor. Als Beispiel dient die Struktur der Pikrinsäure in Abbildung 10.14, C.

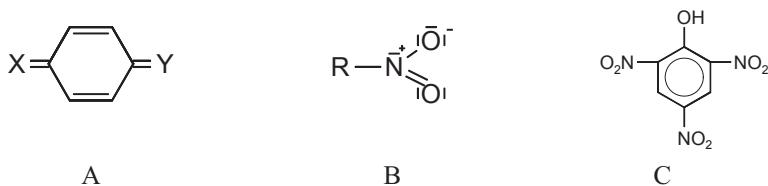


Abb. 10.14 Chinoide Systeme (A) und Nitrofarbstoffe (B, C).

10.2.4 Verschiebungen der Wellenlängen im Spektrum

Mit der Vergrößerung der Anzahl von Doppelbindungen in einem Molekül können ihre Absorptionsmaxima vom UV-Bereich in Richtung sichtbarer Spektralbereich verschoben werden. Dies wird z.B. zwischen Ein-, Zwei- und Dreikernaromataten beobachtet. Außerdem nehmen in dieser Reihenfolge auch die Extinktionskoeffizienten (Kapitel 10.2.5) zu.

Die Verschiebung in den langwelligen Bereich wird als Bathochromie bezeichnet, erfolgt dies in entgegengesetzter Richtung spricht man von Hypsochromie. Hyperchromie bedeutet eine Vergrößerung und Hypochromie entspricht einer Ver-ringerung der Extinktion (Abbildung 10.15).

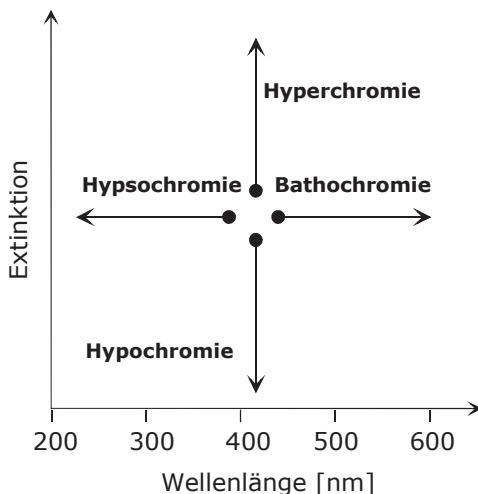


Abb. 10.15 Verschiebungen der Wellenlängen und Intensität

Bathochrome Verschiebungen können durch Kombination chromophorer Gruppen bis in den sichtbaren Spektralbereich hinein erfolgen. Damit ist eine „Vertiefung“ der Farbe verbunden, d.h., der Farbstoff wird „blauer“.

Dagegen bedeutet Hypsochromie die Verschiebung der Lichtabsorption in den kurzwelligen Spektralbereich; der Farbstoff wird „roter“.

Bei $n-\pi^*$ -Übergängen werden mit steigender Lösungsmittelpolarität hypsochrome und bei fallender Lösungsmittelpolarität bathochrome Verschiebungen registriert.

Zusätzliche Bathochromie entsteht, wenn die chromophoren Gruppen mit elektronenabgebenden Gruppen (Auxochrome) oder mit elektronenaufnehmenden Gruppen (Antiauxochrome) verknüpft sind. Auxochrome sind z.B. Gruppierungen mit freien Elektronenpaaren wie $-\text{CH}_3$, $-\text{COH}_3$ oder $-\text{NHCH}_3$, während Antiauxochrome Strukturen ($-\text{COO}^-$ oder $-\text{NO}_2^-$) Elektronenpaare aus dem π -System zu sich verlagern (s.a. Abbildungen in 10.16).

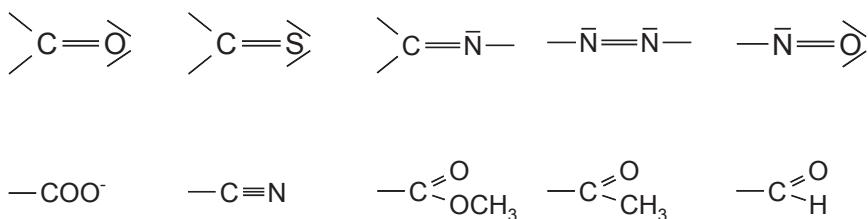


Abb. 10.16 Auxochrome (oben) und antiauxochrome Gruppen (unten)

Signifikante „Verschiebungen“ im UV/VIS-Spektrum von Molekülen können auch durch chemische Reaktionen, die direkt am Chromophor ablaufen, entstehen. Erfolgt z.B. eine Hydrolyse der Thiocarbonylgruppe am Wirkstoffmolekül Thio-pental (s. Abbildung 10.17, „gepunktetes“ Spektrum), so resultiert das Umwandlungsprodukt Phenobarbital mit deutlich verändertem UV-Spektrerverlauf.

Die Beispiele in Abbildung 10.18 zeigen, dass bei Änderungen im nichtchromophoren Teil des Moleküls (vgl. Propafenon/Despropylpropafenon) der Spektrenverlauf erhalten bleibt. Erfolgt hier jedoch auch eine chemische Reaktion direkt am aromatischen Kern des Propafenons, so zeigt das gebildete 5-Hydroxypropafenon (Metabolit-2) charakteristischen Veränderungen im UV-Spektrum.

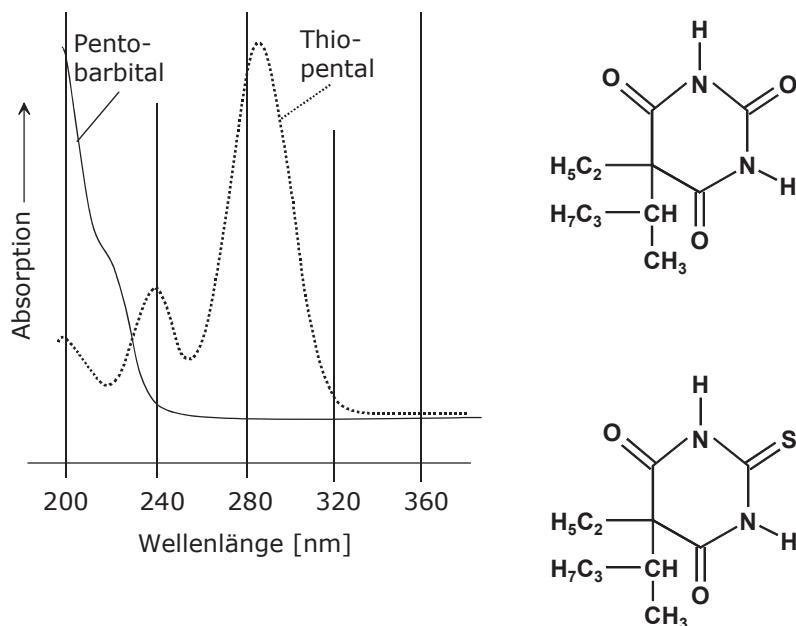
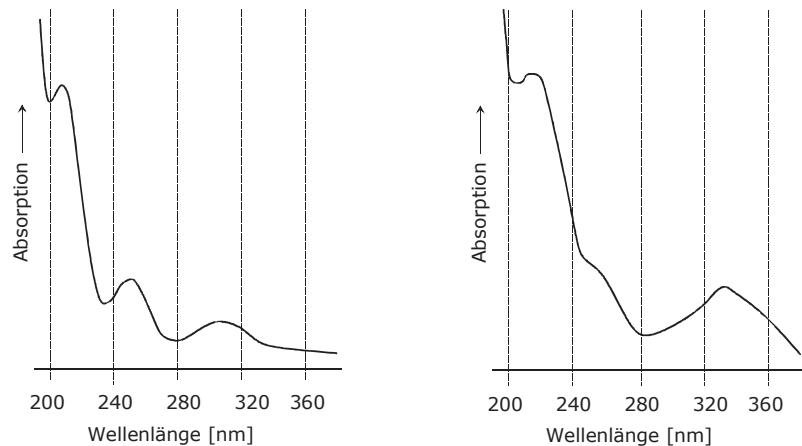
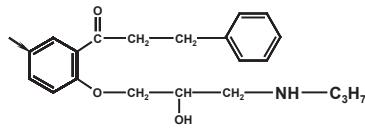


Abb. 10.17 Wellenlängenverschiebung: Thiopental versus Phenobarbital



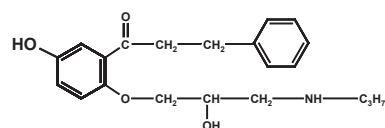
Identische Spektren von Propafenon und Metabolit-1 (s.u.)

Propafenon



Spektrum von Metabolit-2, s.u.

5-Hydroxypropafenon (Metabolit-2)



Despropylpropafenon (Metabolit-1)

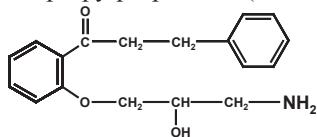


Abb. 10.18 Verschiebungen der Wellenlängen: Propafenon und Metabolite

10.2.5 Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Substanz

Wenn ein Lichtstrahl der Intensität I_0 mit einer Probesubstanzen in Wechselwirkung tritt, wird ein Teil von der Probe absorbiert (I_A), ein anderer wird an der Oberfläche reflektiert (I_R) und ein weiterer Strahlungsanteil wird von Probemolekülen gestreut (I_S). Die danach noch vorhandene Strahlung passiert die Probe mit der Restintensität I . Es resultiert folgende Beziehung:

$$I_0 = I_A + I_R + I_S + I \quad (10.1)$$

I_S wird vom Verhältnis der Teilchendurchmesser zur Wellenlänge der Strahlung bestimmt und ist dann am größten, wenn beide in vergleichbarer Größenordnung vorliegen. I_R ist nur von den makroskopischen Eigenschaften abhängig und erlaubt wie auch I_S keine Angaben über die innere Struktur der Probemoleküle. Demgegenüber ist der absorbierte Strahlungsanteil für einen bestimmten Molekülaufbau charakteristisch, wobei Strahlungsenergie meist in andere Energieformen umgewandelt wird. Das Molekül wird von einem Grundzustand in einen angeregten Energiezustand überführt und kann nach der Quantentheorie nur ganz bestimmte diskrete Energiezustände einnehmen. Für die Beschreibung dieser „gequantelten“ Energiezustände dient die Bohr'schen Beziehung, die aus der nachstehenden Gleichung hervorgeht.

$$E = h \cdot v \quad (10.2)$$

Die Konstante h ist das Planck'sche Wirkungsquantum und v ist die Frequenz der Strahlung. Demzufolge kann nur die Strahlungsenergie absorbiert werden, die der Energiedifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand entspricht.

Elektromagnetische Strahlungen können nur von Molekülen absorbiert werden, die ein permanentes elektrisches Dipolmoment aufweisen. Die Änderung dieser Dipole führt zur Emission elektromagnetischer Strahlung.

Man unterscheidet Änderungen der Dipolmomente durch Rotation, Schwingung und Elektronenanregung.

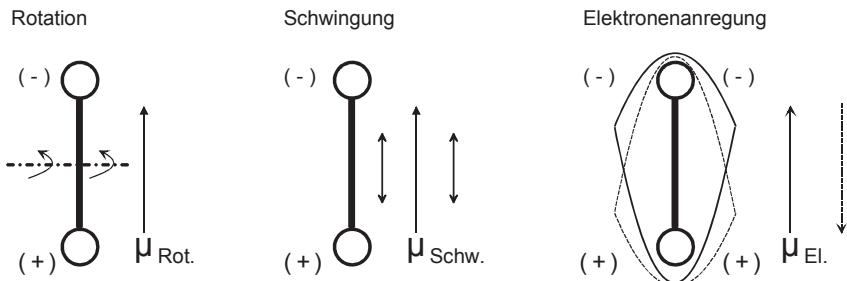
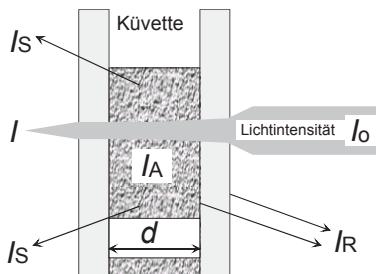


Abb. 10.19 Dipoländerungen durch Rotation, Schwingung, Elektronenanregung

10.2.6 Lambert-Beer'sches Gesetz

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt im Grunde genommen nur für das monochromatische Licht und für sogenannte „ideale Lösungen“.

In der Gleichung 10.1 wurden bereits die Änderungen in den Intensitätsverhältnissen der Strahlung, die auf eine Probesubstanz trifft, erläutert. Eine schematische Darstellung dazu geht aus Abbildung 10.20 hervor.



- | | |
|-------|---|
| I_0 | Lichtstrahl, der auf die Kuvette trifft |
| I | Lichtstrahl, der aus der Kuvette tritt |
| I_A | Absorption |
| I_S | Streuung |
| I_R | Reflexion |

Abb. 10.20 Schwächung des Lichtstrahls beim Passieren der Kuvette

Der auf eine mit Probesubstanz gefüllte Kuvette treffende Lichtstrahl wird in der Regel beim Passieren des Mediums durch Absorption (innerer Effekt) sowie durch Reflexion und Streuung (äußere Effekte) abgeschwächt.

Das Verhältnis aus der durchgelassenen (reduzierten) Strahlung (I) und der Eingangsstrahlung (I_0) bei einer bestimmten Wellenlänge wird als Durchlässigkeit D_λ bzw. Transmission T_λ definiert.

$$\frac{I}{I_0} = D_\lambda = T_\lambda \quad (10.3)$$

Für die Absorption A_λ bei der Wellenlänge λ gilt der folgende Ausdruck.

$$\left[\frac{I_0 - I}{I_0} \right]_\lambda = 1 - \left[\frac{I}{I_0} \right]_\lambda = 1 - D_\lambda = A_\lambda \quad (10.4)$$

Daraus ergibt sich, dass die Summe aus Absorption und Durchlässigkeit 1 ist.

$$A_\lambda + D_\lambda = 1 \quad (10.5)$$

D_λ und A_λ hängen von der Schichtdicke der Kuvette und von der Konzentration des absorbierenden Mediums ab. Es sind jedoch keine Materialkonstanten bzw. substanzspezifischen Konstanten.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz enthält dagegen eine Materialkonstante, die als molarer Extinktionskoeffizient ε_λ (cm^2/mmol) bezeichnet wird. Durch Multiplikation mit der Konzentration c (mol/l) der Probe und der Schichtdicke d (cm) der Kuvette resultiert die Extinktion E_λ , die dimensionslos ist. Die Extinktion ist der Logarithmus aus dem Quotienten der Intensitäten von einfallender und austretender Strahlung.

$$\log \left[\frac{I_0}{I} \right]_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d = E_\lambda \quad (10.6)$$

Zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten werden bei bekannter Konzentration und Schichtdicke die Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen berechnet.

10.2.7 Aufbau eines Spektralphotometers

Die Abbildung 10.21 zeigt den schematischen Aufbau eines Einstrahl-Spektralphotometers. Das von einer Lampe ausgehende polychromatische Licht wird in einem Monochromator spektral in einzelne Wellenlängen zerlegt. Die selektierte Wellenlänge (λ_x) trifft danach mit der Intensität I_0 auf eine Messküvette, die die in einer Flüssigkeit gelöste Probe bestehend Matrix + Analyt(e) enthält. Bei Einstrahlgeräten wird der Lichtstrahl alternierend auf die Vergleichsküvette geleitet, um Untergrundabsorptionen durch Streuung und Reflexion zu eliminieren. Ein Detektor (Empfänger) registriert die geschwächte Wellenlänge der Intensität I . Die Signale werden verstärkt und in Form eines Spektrums (Signal gegen die Wellenlänge) angezeigt. Als Lichtquellen dienen im UV-Bereich Deuteriumlampen und im sichtbaren Bereich werden Halogen- oder Wolframlampen eingesetzt. Die Zerlegung des Lichtes erfolgt in einem Monochromator (Filter, Prisma, Gitter). Während sich Gitter durch eine hohe spektrale Auflösung auszeichnen, ist das Prisma durch seine hohe Lichtintensität gekennzeichnet.

Im sichtbaren Spektralbereich (400–800 nm) werden Glasküvetten eingesetzt. Im UV-Bereich (200–400 nm) müssen auf Grund der Eigenabsorption des Glases hochreine Quarzküvetten verwendet werden.

Als Detektoren dienen sogenannte Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder Fotodioden.

In Abbildung 10.22 ist der Aufbau eines Zweistrahlphotometers dargestellt. Die einzelnen Bauteile sind gegenüber dem Einstrahlphotometer identisch bzw. vergleichbar. Der Unterschied besteht darin, dass der selektierte Lichtstrahl kontinuierlich und zu gleichen Teilen auf Mess- und Referenzküvette trifft.

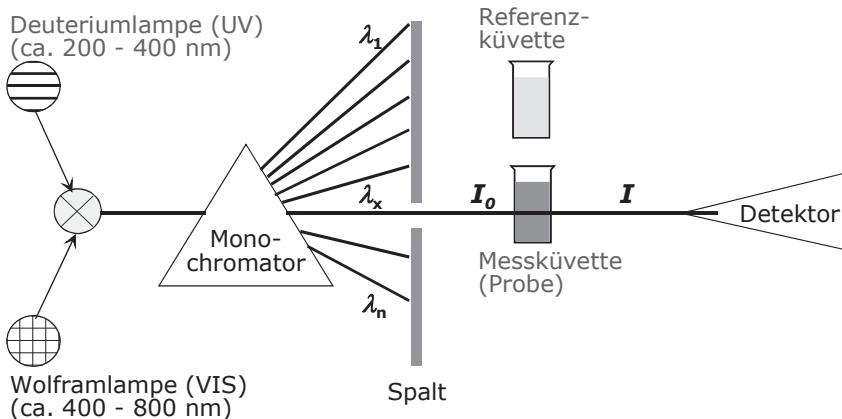


Abb. 10.21 Aufbau eines Einstrahl-Spektralphotometers

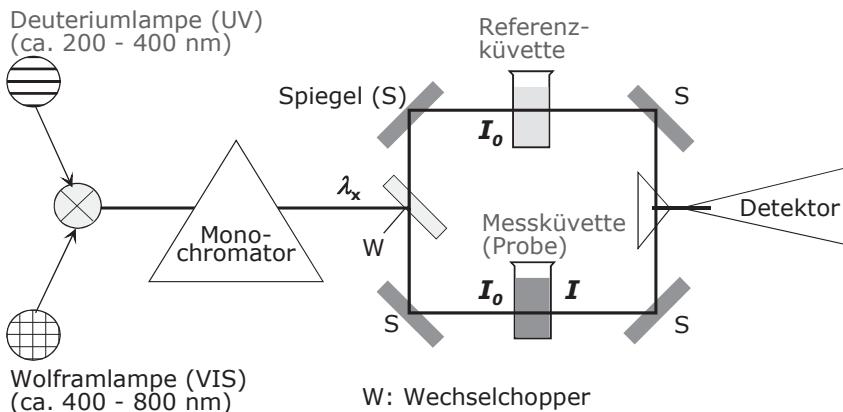


Abb. 10.22 Aufbau eines Zweistrahl-Spektralphotometers

Die apparative Anordnung der Bauelemente in einem Dioden-Array-Detektor unterscheidet sich demgegenüber deutlich. Wie aus Abbildung 10.23 hervorgeht, trifft polychromatisches Licht zuerst auf die Küvette(n), so dass von der Probe der entsprechende Energieteil absorbiert wird. Das um diese Energiebeträge geminderte Wellenlängenspektrum trifft anschließend auf ein halographisches Gitter, das je nach Auflösungsvermögen das Spektrum in sehr viele einzelne Wellenlängen zerlegt (s. Abbildung 10.23, oben). Ein aus Hunderten von Dioden bestehendes „Diodenarray“ dient der Aufnahme aller mit Hilfe des hochauflösenden Gitters zerlegten Wellenlängen. Dabei werden die Unterschiede der von der Lichtquelle ausgehenden Wellenlängen im Vergleich zu den in der Messküvette abgeschwächten Wellenlängen registriert und in Form eines dreidimensionalen Spektrums dargestellt (Abbildung 10.24).

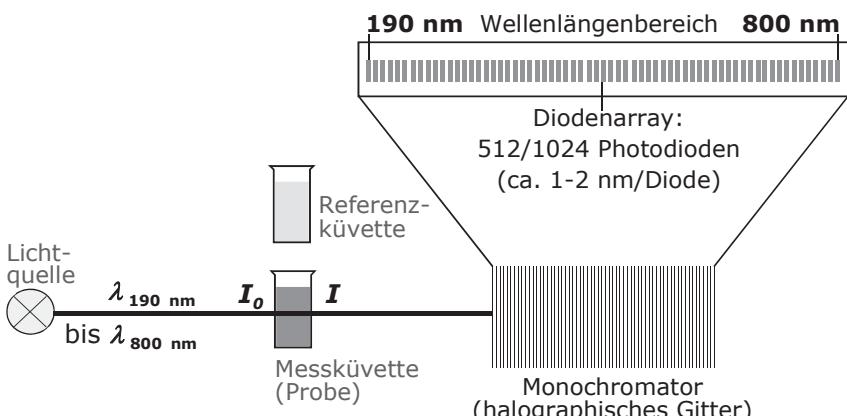


Abb. 10.23 Aufbau eines Dioden-Array-Detektors

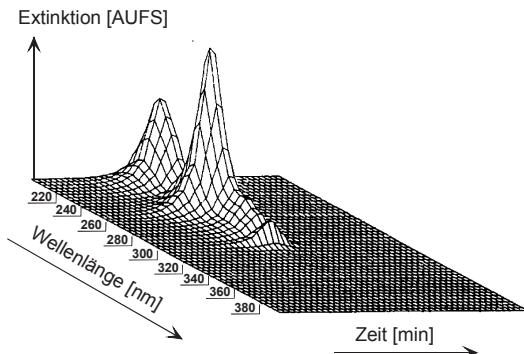


Abb. 10.24 3D-Diagramm von Phenanthren (schematisch).

10.2.8 Applikationen

Die vorhergehenden Abbildungen der Spektren (s. Abb. 10.11, 10.17, 10.18) und ihre Interpretationen gaben bereits Auskunft, inwieweit aus UV/VIS-Spektren Strukturinformationen für organischer Moleküle gewonnen werden können.

Schließlich sollen noch zwei ganz praktische Beispiele die Aussagemöglichkeiten der UV/VIS-Spektroskopie belegen; vor allem im sichtbaren Spektralbereich. Farbgemische, die aus gelben, grünen oder roten Tinten bzw. aus entsprechenden Faserstiften resultieren, können hinsichtlich der einzelnen Farben anhand der Absorptionsmaxima zugeordnet werden (Abbildung 10.25). So erscheint bei 404 nm ein Absorptionsmaximum für die Farbe gelb. Bei den Maxima 520 nm und 665 nm werden der rote bzw. der grüne Farbstoff registriert.

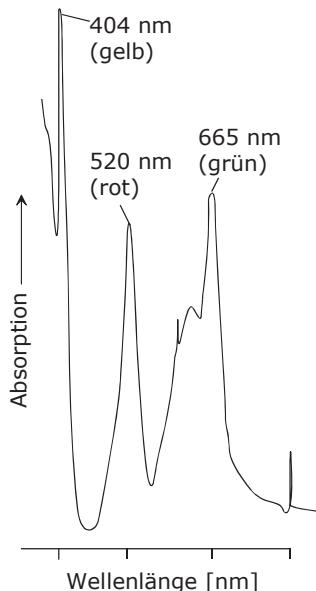


Abb. 10.25 Farben von Faserstiften

Signifikant sind auch die Unterschiede in den Spektrenverläufen, wenn man arterielles (sauerstoffreiches) und venöses (sauerstoffarmes) Blut vergleicht. Im praktischen Versuch kann auch Kapillarblut aus der Fingerkuppe entnommen und mit Wasser verdünnt in eine Küvette überführt werden. In dieser Probe ist Sauerstoff an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin (HbO_2) gebunden und das Spektrum im sichtbaren Bereich zeigt um 550 nm zwei charakteristische Absorptionsmaxima (Abbildung 10.26).

Durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze Natriumthiosulfat direkt in die Messküvette erfolgt die Reduktion des Hämoglobins zu Desoxyhämoglobin. Im nachfolgend aufgenommenen Spektrum verschwinden die beiden Absorptionsmaxima und es resultiert eine relativ breit ausgeprägte Bande in diesem Spektralbereich (siehe „Hb-Kurve“).

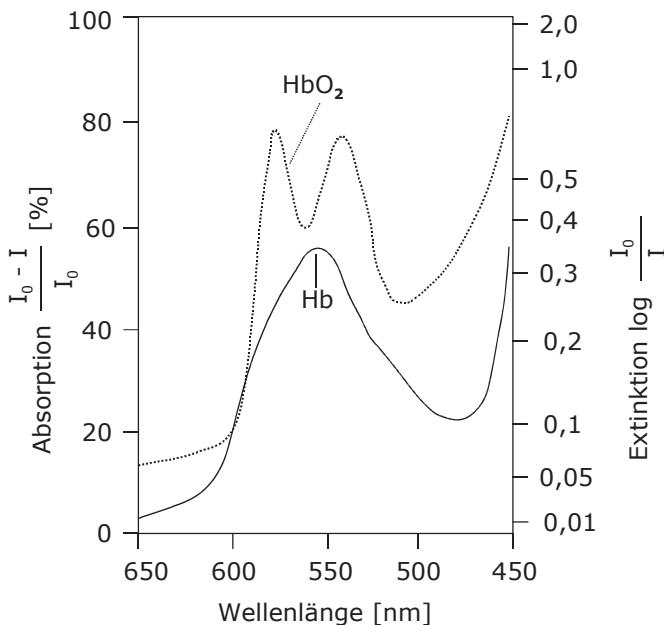


Abb. 10.26 VIS-Spektren von artierellem (HbO_2) und venösem Blut (Hb)

Vor allem die chromophore Gruppen bzw. konjugierte Doppelbindungen ergeben signifikante Spektren, die nach computergestützten Vergleichen mit entsprechenden Datenbanken (Spektrenbibliotheken) auch die Identifizierung der einen oder anderen Molekülstruktur ermöglichen. Durch den Einsatz der Dioden-Array-Detektion (DAD) in der Hochleistungsflüssigchromatographie (s. Kapitel 12 Kopplungstechniken, 12.5.1 LC-DAD und die Abbildungen 12.36 bis 12.38) wird gezeigt, dass polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (hier: verschiedene Anthranthen-Derivate wie z.B. Anthranthen-1,6-Chinon oder Anthranthen-3-Phenol) anhand ihrer UV-VIS-Spektren sehr gut identifiziert werden können.

10.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz beruht darauf, dass Lichtquanten (Photonen) von einem Molekül absorbiert und danach von diesem Molekül in Form einer Emissionsstrahlung wieder abgegeben werden. Im Abbildung 9.1 ist dieser Vorgang anhand der Atomfluoreszenz vereinfacht dargestellt.

Die Lichtquelle sendet über ein optisches System mit Anregungsfilter eine vorgegebene Extinktionswellenlänge (λ_{ex}) direkt auf die Mikrodurchflusssküvette (Abbildung 10.27). Diese elektromagnetische Strahlung wird von den darin enthaltenen Molekülen absorbiert und senkrecht zur Strahlungsebene über einen Emissionsfilter in Form einer Emissionswellenlänge (λ_{em}) auf den Photodioden detektiert.

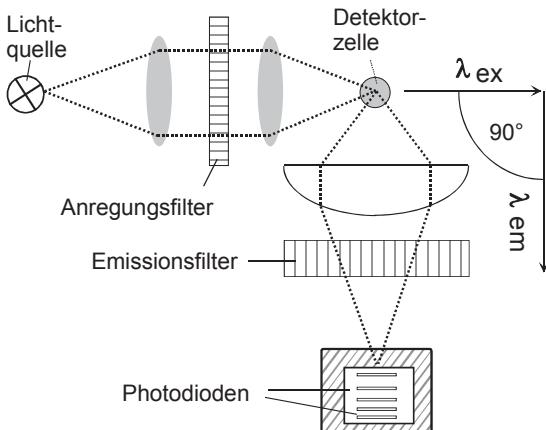


Abb. 10.27 Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers

Das absorbierte Licht, durch das Moleküle in einen angeregten bzw. höheren Energiezustand überführt werden, liegt im Vergleich zur Emission im kürzeren Wellenlängenbereich, wie das Anthracenspektrum in Abbildung 10.28 zeigt.

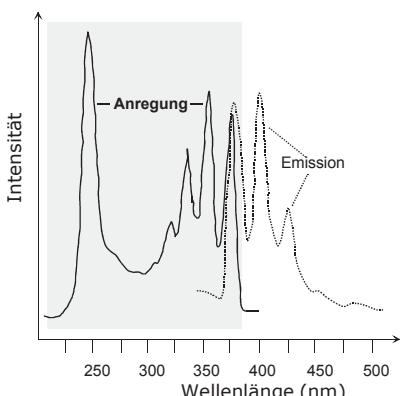
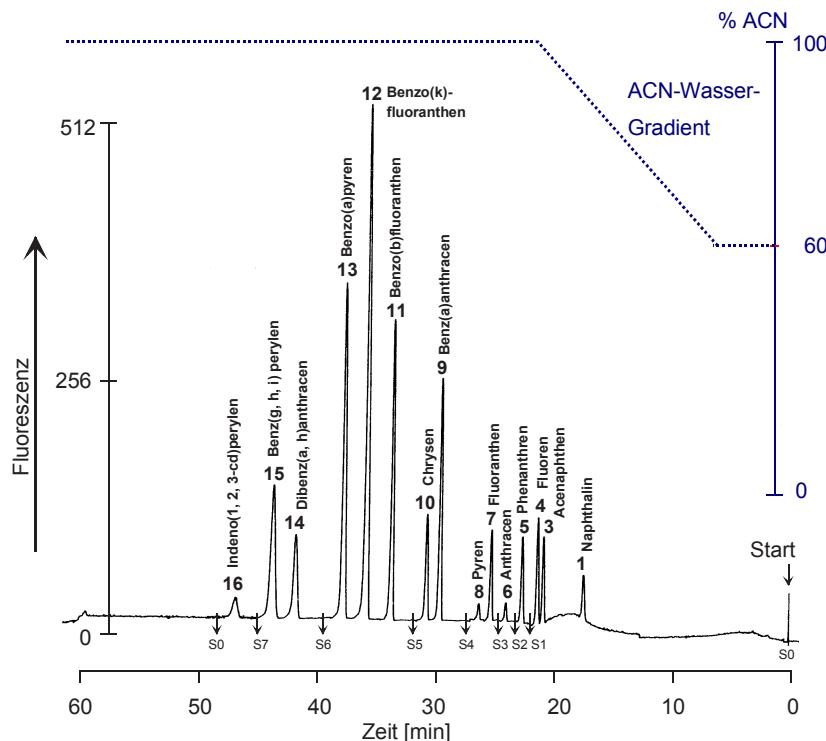


Abb. 10.28 Anregungs- und Emissionsspektrum von Anthracen

In der HPLC dient die Fluoreszenzdetektion zur Registrierung von Elutionskurven. Besonders selektiv und sensitiv werden polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK's) detektiert. Die Trennung der sogenannten EPA-Aromaten (*environmental protection agency*) erfolgt an Reversed-Phase-Säulen und mittels Gradientenelution (Abbildung 10.29). Die Extinktionswellenlänge (λ_{ex}) und Emissionswellenlängen (λ_{em}) können für die entsprechenden Aromaten optimal ausgewählt werden, so dass für jede Komponente eine hohe Nachweisbarkeit resultiert.



$\lambda_{\text{ex}} \text{ [nm]}$	$\lambda_{\text{ex}} \text{ [nm]}$
S0: 275	350
S1: 246	370
S2: 250	406
S3: 270	440
S4: 260	420
S5: 290	430
S6: 290	410
S7: 301	499

Abb. 10.29 Chromatogramm der EPA-Aromaten-Trennung mit Gradientenelution und Fluoreszenzdetektion

10.4 Infrarotspektroskopie

10.4.1 Historisches

Infrarote Strahlung wurde bereits um 1800 von W. Herschel bei Untersuchungen des Sonnenspektrums entdeckt. Der Beginn der Infrarot-Spektroskopie als Analysenmethode geht auf Arbeiten von E. Lehrer (1936) zurück. Er baute auch das erste vollautomatische Zweistrahl-Ultrarot-Spektrometer im Jahre 1939. Das erste kommerzielle IR-Gerät brachte die Firma Perkin-Elmer 1944 auf den Markt und die KBr-Presstechnik als Probenvorbereitung geht auf das Jahr 1952 zurück.

10.4.2 Methodische und theoretische Grundlagen

Das Analysenprinzip in der Infrarotspektroskopie (IR) basiert auf der Wechselwirkung zwischen infraroter Strahlung und Materie (Moleküle). Infrarotstrahlung ist vom menschlichen Auge nicht wahrnehmbar und wird beim Auftreffen auf die Haut als warm empfunden. Sie wird deshalb als Wärmestrahlung bezeichnet. Die IR-Strahlung ist langwelliger (Abbildung 10.30) und demzufolge auch weniger energiereich im Vergleich zum UV-Licht, das zur Anregung von Elektronen dient.

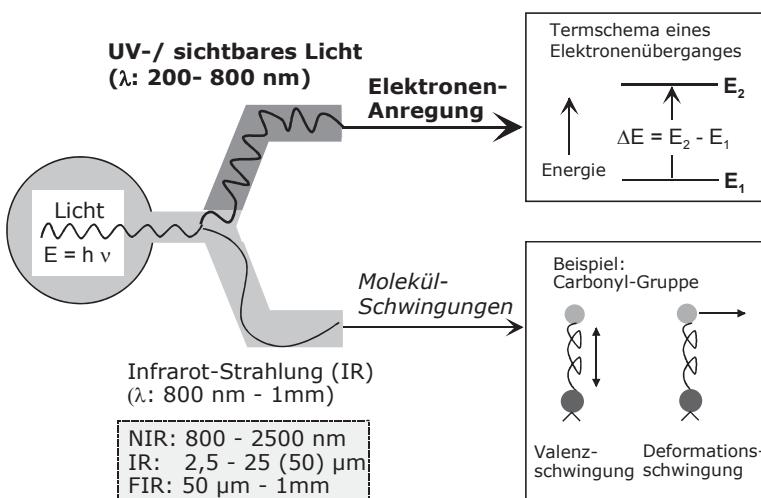


Abb. 10.30 Anregung von Molekülschwingungen (IR) und Elektronen (UV/VIS)

Mit langwelligem IR-Licht können nur Schwingungen und Rotationen von Molekülen angeregt werden. Dies trägt zur Strukturaufklärung bei, da verschiedene funktionelle Gruppen und unterschiedliche Bindungstypen von Molekülen identifizierbar sind (Tabelle 10.3). Die IR-Spektroskopie wird auch zur quantitativen Bestimmung von bekannten Substanzen eingesetzt.

10.4.2.1 Infrarotstrahlung im elektromagnetischen Spektrum

Das Gebiet der Infrarotspektroskopie liegt zwischen dem UV/VIS-Bereich (kurzwelliger) und dem Spektralbereich der Mikrowellen (Abbildung 10.31). Typisch für den „normalen“ Infrarotbereich ist eine elektromagnetische Strahlung zwischen 2 500 und 25 000 nm (Wellenzahlen: $4\,000\text{--}400\,\text{cm}^{-1}$). Man unterscheidet weiterhin zwischen dem nahen Infrarot (NIR: 800–2 500 nm) und fernen Infrarot (FIR: $50\,\mu\text{m}\text{--}1\,000\,\mu\text{m}$).

Spektroskopische Methoden unterscheiden sich nach den Wellenlängen bzw. den Wellenlängenbereichen mit denen die Moleküle angeregt werden. Kurze Wellenlängen sind energiereicher als die Lichtquanten aus dem langwelligeren Spektralbereichen.

In der IR-Spektroskopie hat sich die Angabe in Einheiten der reziproken Wellenlänge, der sogenannten Wellenzahl (s. Gleichung 10.7, Angabe in cm^{-1}), durchgesetzt. Sie gibt an, wie viele Wellen der Infrarotstrahlung auf 1 cm kommen. In den Infrarotspektren werden jedoch meist sowohl die Wellenlänge (in Nanometer [nm]) als auch Wellenzahl aufgeführt.

$$Wellenzahl \ \tilde{\nu} \ (\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\text{Wellenlänge } \lambda \ (\text{nm})} \quad (10.7)$$

Abb. 10.31 Einteilung der Spektralbereiche-II

Wellenzahlen besitzen den Vorteil, dass sie der Frequenz ν der absorbierten Strahlung und damit auch der Energie ΔE direkt proportional sind. Es gilt:

$$\lambda \cdot \nu = c \quad (10.8)$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = c \cdot \tilde{\nu} \quad (10.9)$$

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad (10.10)$$

Demgegenüber ist zu beachten, dass die Wellenlänge λ der Energie ΔE indirekt proportional ist. Je kleiner die Wellenlänge, desto energiereicher ist die Strahlung.

10.4.2.2 Molekülschwingungen und -rotationen

Molekülschwingungen und Molekülrotationen werden durch Absorption von Licht des infraroten Bereiches des elektromagnetischen Spektrums angeregt.

In der Praxis werden zwei methodische Varianten eingesetzt, um diese Molekülschwingungen und -rotationen zu messen. Dies sind die direkte Messung der Absorption im IR-Spektrum und die indirekte Erfassung der Streustrahlung im Ramanspektrum.

Heutzutage dominieren insbesondere leistungsfähige computergesteuerte und schnelle Fourier-Transform-IR-Spektrometer (FTIR) in der analytischen Praxis.

In der IR-Spektroskopie erfolgt vor allem die Aufzeichnung der Schwingungen von Molekülen. Rotationen eines Moleküls entstehen, wenn eine periodische Änderung seines Dipolmomentes erfolgt. Demzufolge können nur Moleküle mit einem permanenten Dipolmoment (z.B. HCl) angeregt werden, was für ein symmetrisches Molekül wie H_2 nicht möglich ist.

Für die Anregung eines Moleküls zur Rotation ist etwa nur ein Tausendstel der Energie erforderlich, die die Molekülschwingungen bewirkt.

Es sind meist die funktionellen Gruppen (CH_3 -, $C=O$, OH -, NH -) der Moleküle, die charakteristische Schwingungen (Tabelle 10.3) zeigen. Diese entsprechen Absorptionsbanden in ganz bestimmten Bereichen des Infrarotspektrums und können zur Identifizierung eines organischen Moleküls herangezogen werden.

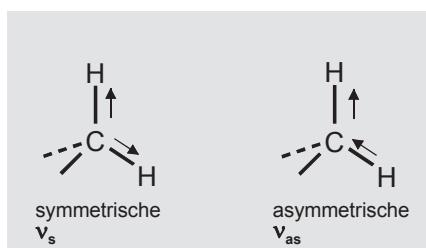
Komplex zusammengesetzte Moleküle verfügen über sehr vielfältige Schwingungsmöglichkeiten. Beispielsweise besitzt ein Molekül mit N Atomen $3 \cdot N$ Freiheitsgrade. Davon entfallen 3 Freiheitsgrade auf Grund der Translationsbewegungen längs der x -, y - und z -Achse und 3 weitere Freiheitsgrade bedingt durch die Rotation um die 3 Hauptträgheitsachsen.

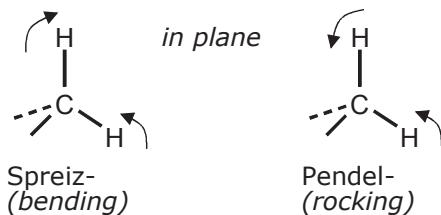
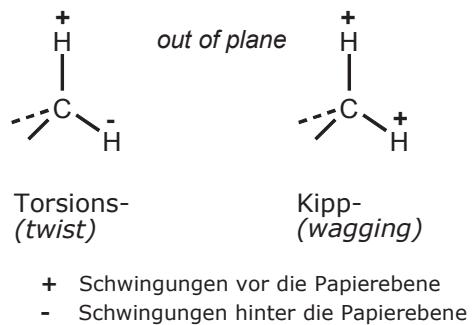
Für nichtlineare Moleküle resultieren demzufolge Freiheitsgrade von $3N-6$. Bei linearen Molekülen entfällt ein Freiheitsgrad, da das Trägheitsmoment der Moleküle 0 ist. Die Schwingungsfreiheitsgrade ergeben sich hier nach $3N-5$.

Tabelle 10.3 IR-Banden funktioneller Gruppen und von chemischen Bindungen

Funktionelle Gruppe	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Intensität
O-H, mit H-Brücken	3 200 - 3 600	unterschiedlich
N-H, Amine, Amide	3 300 - 3 500	mittel
C-H, Alkine, C≡C-H	3 300	stark
C-H, Aromaten	3 010 - 3 100	mittel
C-H, Alkene, C=C-H	3 010 - 3 095 675 - 995	mittel stark
C-H, Alkane	2 850 - 2 970 1 340 - 1 470	stark stark
C≡N, Nitrile	2 210 - 2 280	stark
C≡C, Alkine	2 100 - 2 260	unterschiedlich
C=O, Aldehyde, Ketone, Säuren, Ester	1 690 - 1 760	stark
C=C, Alkene	1 610 - 1 680	unterschiedlich
C=C, Aromaten	1 500 - 1 600	unterschiedlich
NO ₂ , Nitrogruppe	1 500 - 1 570 1 300 - 1 370	stark stark
C-H, Amine, Amide	1 180 - 1 360	stark
C-O, Alkohole, Ether, Säuren, Ester	1 050 - 1 300	stark

Auf dieser Basis berechnete Molekülschwingungen werden als Grund- oder Normalschwingungen bezeichnet. Diese zeigen unterschiedliche Schwingungsformen, die man Valenzschwingungen (Abkürzung ν) nennt, wenn sich die Bindungslängen zwischen den Atomen ändern (Abbildung 10.32). Oder sie werden als Deformationsschwingungen (Abkürzung δ) bezeichnet, wenn die Bindungslängen weitestgehend konstant bleiben, aber die Bindungswinkel verändert werden (Abbildungen 10.33 und 10.34).

**Abb. 10.32** Schematische Darstellung der Valenzschwingungen

**Abb. 10.33** Deformationsschwingungen (*in plane*)**Abb. 10.34** Deformationsschwingungen (*out of plane*)

Hinzu kommen Deformationsschwingungen aus der Ebene, die mit dem Symbol γ bezeichnet werden, und Torsionsschwingungen (τ), die mit einer Änderung des Torsionswinkels verbunden sind.

Erfolgt die Einteilung nach dem Symmetrieverhalten, so unterscheidet man zwischen symmetrischen Schwingungen (Index: s), die unter Erhalt ihrer vollständigen Molekülsymmetrie verlaufen, und antisymmetrischen Schwingungen (Index: as), die durch Symmetrieverluste gekennzeichnet sind.

Die für funktionelle Gruppen charakteristischen lokalisierten Schwingungen liegen oberhalb von $1\,500\text{ cm}^{-1}$. Absorptionsbanden, die durch Gerüstschwingungen (Ober- und Kombinationsschwingungen) eines Moleküls verursacht werden und relativ signifikant für das gesamte Molekül sind, erscheinen im IR-Spektrum unter $1\,500\text{ cm}^{-1}$. Das wird in der IR-Technik als „fingerprint-Bereich“ bezeichnet.

10.4.2.3 Hantelmodell

Als einfache Erklärung für die Vorgänge bei der Entstehung eines Infrarotspektrums dient das „Hantelmodell“ aus der klassischen Mechanik.

Grundlage ist ein zweiatomiges Molekül (z.B. HCl) mit den unterschiedlichen Massen m_1 und m_2 , die durch eine elastische Feder verbunden sind. Diese symbolisiert die chemische Bindung zwischen beiden Atomen.

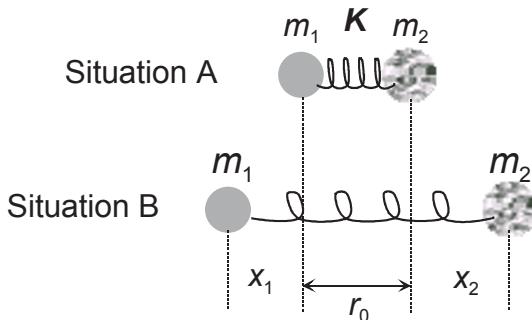


Abb. 10.35 Mechanisches Modell eines schwingenden zweiatomigen Moleküls

Erfolgt eine Auslenkung (Dehnung) beider Massen aus dem Gleichgewichtszustand r_0 um den Betrag $x_1 + x_2$, so resultiert eine rücktreibende Kraft. Nach Freigabe der Spannung schwingen beide Massen zurück und pendeln sich wieder um r_0 ein. Die rücktreibende Kraft K ist nach dem Hooke'schen Gesetz (Gleichung 10.11) in erster Näherung der Auslenkung Δr proportional. Diese Kraft wird mit einem negativen Vorzeichen belegt, da sie der erfolgten Auslenkung entgegengesetzt ist.

$$K = -k \times \Delta r \quad (10.11)$$

Der Proportionalitätsfaktor k stellt im mechanischen Modell die Federkonstante dar. Im organischen Molekül ist k als Kraftkonstante ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Atomen. Für unterschiedliche C-C-Bindungen gilt demzufolge die Beziehung:

$$k_{\text{C=C}} > k_{\text{C=C}} > k_{\text{C-C}} \quad (10.12)$$

10.4.2.4 Harmonischer/ anharmonischer Oszillator, Auswahlregeln

Die Energie der Schwingung kann auch an Hand des Modells des harmonischen Oszillators beschrieben werden (Abbildung 10.36).

Diese Energie ist eine Funktion des Kernabstandes, wie aus folgender Gleichung hervorgeht.

$$V(r) = \frac{1}{2} k \times x^2 = 2\pi^2 \mu \nu^2 \times x^2 \quad (10.13)$$

V	potentielle Energie
k	Kraftkonstante
x	Auslenkung
μ	reduzierte Masse
ν	Schwingungsfrequenz des Oszillators

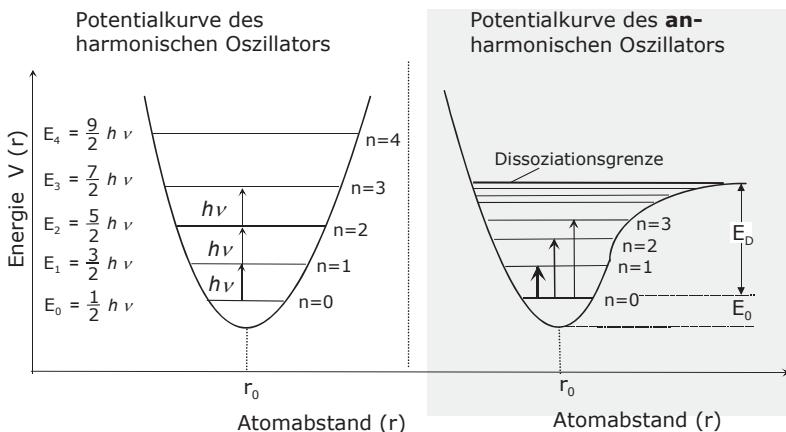


Abb. 10.36 Harmonischer vs. anharmonischer Oszillatator

Für die reduzierte Masse gilt die nachstehende Berechnungsformel.

$$\mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2} \quad (10.14)$$

Aus der folgenden Gleichung 10.15 kann die Schwingungsfrequenz ν für ein zweiatomiges Molekül auf der Grundlage des mechanischen Modells berechnet werden.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (10.15)$$

Bei großen Kraftkonstanten k (starke chemische Bindungen) und kleinen schwingenden Atommassen resultieren entsprechend erhöhte Schwingungsfrequenzen.

Innerhalb der Übertragung der Erkenntnisse vom mechanischen Modell auf ein zweiatomiges Molekül können alle auftretenden Erscheinungen nicht mehr verständlich erklärt werden. Dazu gehört die eintretende Dissoziation der Moleküle, wenn auf diese genügend hohe Energien eingestrahlt werden. Eine bessere Beschreibung dieser Phänomene erfolgt mit Hilfe des anharmonischen Oszillators (Abbildung 10.36). Der Verlauf seiner Potentialkurve ist asymmetrisch und die Abstände zwischen den einzelnen Schwingungsniveaus sind unterschiedlich groß.

Nach den Aussagen der Quantentheorie existieren für Moleküle nur diskrete Energie- und damit auch Schwingungszustände. Der zur Quantenzahl $n=0$ gehörende Schwingungszustand ist der Grundzustand.

Die Entstehung einer Schwingung erfolgt dann, wenn ein Molekül infolge der Absorption eines Lichtquants vom Schwingungszustand mit der Quantenzahl n in einen höheren Zustand (z.B. $n+1$) übergeht. Die Energiedifferenz zwischen beiden Niveaus entspricht der Energie des Lichtquants bzw. der Resonanzbedingung. Die Potentialkurve zeigt auch, dass die Abstände der Schwingungsniveaus mit zunehmender Energie immer geringer werden, bis schließlich die Dissoziationsgrenze erreicht ist.

Der Übergang $n=0$ nach $n=1$ ist die Grundschwingung; von $n=0$ nach $n=2$ tritt die erste Oberschwingung auf, die etwa die doppelte Frequenz aufweist. Die Wahrscheinlichkeit der Übergänge und damit die Intensität dieser Absorptionsbanden nimmt mit zunehmender Größe des Quantensprungs stark ab.

Eine weitere Bedingung für das Auftreten intensiver Absorptionsbanden ist das Vorhandensein eines Dipolmomentes im Molekül. Die auftreffende infrarote Strahlung kann vom Molekül nur dann absorbiert werden, wenn sein Dipolmoment mit dem elektrischen Vektor der Strahlung in Wechselwirkung tritt.

Im Ergebnis dieser Auswahlbedingungen resultiert, dass in Molekülen mit Symmetriezentrum alle Schwingungen, die symmetrisch zu diesem Zentrum gerichtet sind, als IR-inaktiv gelten bzw. als „verboten“ bezeichnet werden. Ursache dieser Inaktivität ist, dass keine Änderung des Dipolmomentes eintritt. Andererseits werden diese symmetrischen Schwingungen als Raman-aktiv bezeichnet, da sich im Molekül die Polarisierbarkeit ändert.

Raman-inaktiv sind Schwingungen, die nicht symmetrisch zum Symmetriezentrum erfolgen. Diese sind aber wieder IR-aktiv, so dass IR- und Ramanspektroskopie einander ergänzen.

Der höhere Informationsgehalt bei der Aufklärung unbekannter organischer (relativ niedermolekularer) Verbindungen geht demzufolge weniger aus dem Raman- als aus dem IR-Spektrum hervor, da die Moleküle überwiegend kein Symmetriezentrum besitzen.

10.4.2.6 Geräteaufbau und Probenpräparation

Ein Infrarot-Spektrometer besteht aus Lichtquelle, Probenküvette, Monochromator (Prisma oder Gitter), Detektor und der Auswerteeinheit (Computer).

Als Lichtquellen werden meist ein Nernst-Stift oder der Globar eingesetzt. Der Nernst-Stift besteht aus Y- und Zr-Oxid und weist eine Betriebstemperatur von 1 900°C auf, während sich der Globar aus Siliziumcarbid zusammensetzt und bei Temperaturen um 1 300°C arbeitet. Diese Lichtquellen kann man auch als „glühende“ Wärmestrahler bezeichnen.

Im nahen Infrarot (NIR) wird eine einfache Wolframlampe verwendet, die für den Wellenlängenbereich von 2 500 bis 780 nm ($4\,000\text{--}12\,800\,\text{cm}^{-1}$) die erforderlich Strahlung bereitstellt.

Für den fernen IR-Bereich (FIR, $200\text{--}10\,\text{cm}^{-1}$ bzw. $50\text{--}1\,000\,\mu\text{m}$) sind Lichtquellen wie z.B. der Quecksilberhochdruckbogen erforderlich.

Es können gasförmige, flüssige und feste Proben analysiert werden. Weniger häufig werden Gase untersucht, für die evakuierbare Küvetten zum Einsatz kommen.

Für die Analyse flüssiger Proben müssen Lösungsmittel wie Chloroform oder Schwefelkohlenstoff (Abbildung 10.37) verwendet werden, die im IR-Bereich lichtdurchlässig sind. Als Material für die Küvettenfenster dient NaCl, das zwischen 4 000 und 600 cm^{-1} durchlässig ist.

Feststoffe werden meist mit Kaliumbromid vermischt, in einer Achatschale verrieben und unter hohem Druck in einer speziellen Apparatur zu Tabletten verpresst (KBr-Presstechnik). Weiterhin kommt Paraffin (z.B. Nujol) zum Einsatz, das man mit der Festprobe zu einer Paste verreibt. Diese wird als dünner und blasenfreier Film zwischen zwei NaCl-Platten gepresst. Die Auswahl der Prismen hängt von der gewünschten Wellenlänge ab. Es kommen u.a. Quarz (160–2 800 nm), NaCl (2 500–15 000 nm) oder KBr (12–15 μm) zum Einsatz.

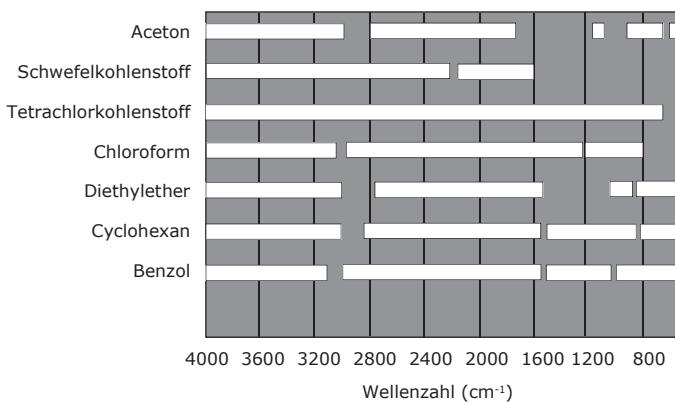


Abb. 10.37 Durchlässigkeit von verschiedenen Lösungsmitteln im IR-Bereich

Gitter sind jedoch auf Grund ihrer höheren Auflösung, großen Spektralbreite und besseren chemischen Inertheit die Monochromatoren der Wahl. Als Detektoren dienen in der IR-Spektroskopie Thermoelemente, die die gemessenen Strahlung in Wärme umwandeln. Bei der Detektion mit einem Bolometer wird Lichtenergie, die auf einen Halbleiter trifft, in elektrische Energie überführt.

Für die Erstellung eines konventionellen IR-Spektrums ist ein relativ zeitaufwendiges mechanisches Scannen des entsprechenden Wellenlängenbereiches erforderlich. In Abbildung 10.38 ist der Aufbau eines konventionellen IR-Spektrometers schematisch dargestellt. Die von einer Lichtquelle ausgehende Anregungsenergie wird in zwei Strahlen zerlegt, von denen der eine die Mess- und der andere Strahl die Vergleichsküvette passiert. Danach fallen beide „Lichtbündel“ auf einen mit einer bestimmten Frequenz rotierenden Spiegel, der mit zwei durchlässigen und zwei reflektierenden 90°-Sektoren ausgestattet ist. Vergleichs- und Messstrahl werden somit zeitlich nacheinander auf den Monochromator, der als LITTRROW- Spiegel angeordnet ist, reflektiert.

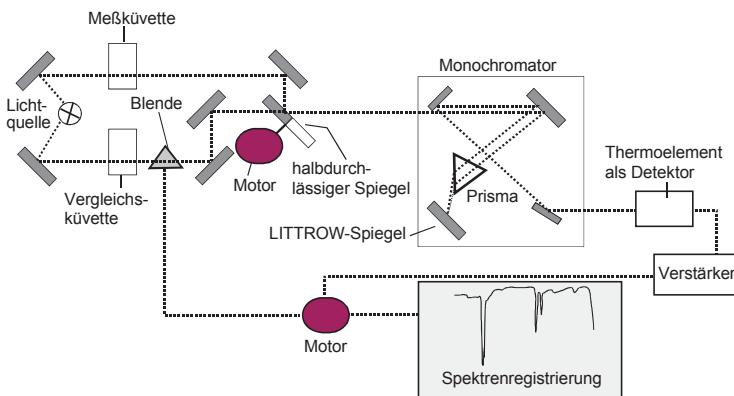


Abb. 10.38 Konventionelles IR-Spektrometer mit Prismen-Monochromator

Die Fourier-Transform-Technik (FTIR) gilt als Weiterentwicklung der IR-Spektroskopie und verdrängt diese klassische Methode auf Grund ihrer Schnelligkeit und Leistungsfähigkeit bei der Spektrenaufnahme. Auch für On-line-Kopplungen mit Trennmethoden (GC-FTIR) ist nur ein schnelles Fouriertransformationspektrometer geeignet (s. Kapitel 12.5.3).

10.4.3 Fouriertransforspektroskopie (FTIR)

Abbildung 10.39 zeigt das Herzstück – das MICHELSON-Interferometer – eines FTIR-Gerätes (s. „M. Otto: Analytische Chemie“). Ein FTIR-Spektrometer liefert die gesamte Information zum Spektrum in Form eines Interferogramms.

„Zunächst wird monochromatisches Licht der Wellenlänge I_0 betrachtet. Der Strahl trifft auf den Strahlungsleiter, wo er zu gleichen Teilen reflektiert und durchgelassen wird. Dadurch erfolgt eine Aufspaltung in zwei kohärente Teilstrahlen gleicher Amplituden. Die Teilstrahlen werden von jeweils einem Spiegel reflektiert und gelangen zum Strahlungsteiler zurück, wo sie rekombinieren. Es kommt zu einer Überlagerung des Wellenzuges mit sich selbst und dabei entsteht im Unendlichen ein Interferenzmuster, das durch eine Linse auf den Detektor fokussiert wird. Solange die optischen Wege der beiden Strahlen gleich lang sind oder ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge I_0 betragen, kommt es zu konstruktiver Interferenz und die auf den Empfänger fallende Strahlung erreicht ein Maximum. Durch Bewegung eines der beiden Spiegel kann zwischen den Strahlen ein Gangunterschied erzeugt werden, der bei einer Verrückung von $1/4$ zu einer vollständigen Auslöschung der Interferenz führt. Da die Verrückung vom Licht zweimal durchlaufen wird, entspricht die Wegdifferenz insgesamt $1/2$. Wird der Spiegel in einem FTIR-Spektrometer kontinuierlich mit der Geschwindigkeit d mm/s bewegt, so erhält man beim Auftragen der am Detektionssystem auffallenden Energie gegen die Wegdifferenz ein kosinusförmiges Signal der Frequenz“.

Bei Verwendung von polychromatischem Licht, ergibt sich wiederum ein Maximum, wenn die Wegdifferenz der beiden Strahlen Null ist.

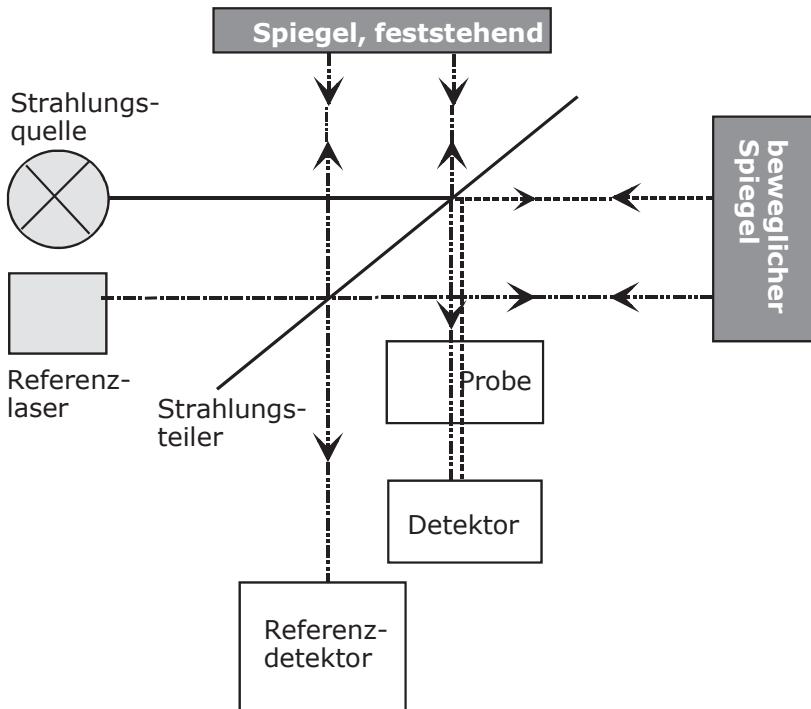


Abb. 10.39 MICHELSON-Interferometer

Da die Bedingung für die Verstärkung oder Auslöschung für die einzelnen Frequenzen jedoch unterschiedlichen Verrückungen des Spiegels entsprechen, nimmt die auf den Detektor fallende Energie mit ansteigendem Gangunterschied ab. In Form von Minima und Maxima, deren Amplitude tendenziell abnimmt, ergibt sich das Interferogramm.

Das Grundprinzip besteht demzufolge in der simultanen Erfassung des gesamten Frequenzbereiches des IR-Spektrums im Detektionssystem. Das gelingt, wenn man die zu allen Zeitpunkten gleich intensive, polyfrequente IR-Strahlung der Lichtquelle mit Hilfe eines Interferometers in ein Interferogramm umwandelt, das keine Funktion der Frequenz, sondern der Zeit ist (d.h., aus der Frequenzdomäne in die Zeitdomäne).

Nach Passieren der so „aufgearbeiteten“ Strahlung durch die Probe wird das Interferogramm durch eine mathematische Operation, die sogenannte Fourier-Transformation, in ein Spektrum (also in eine Frequenzdomäne) rückübersetzt (Abbildung 10.40).

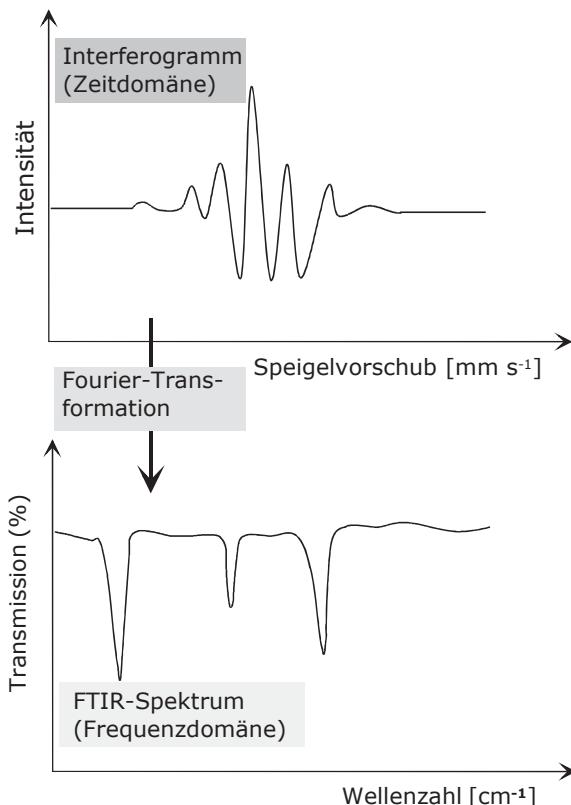


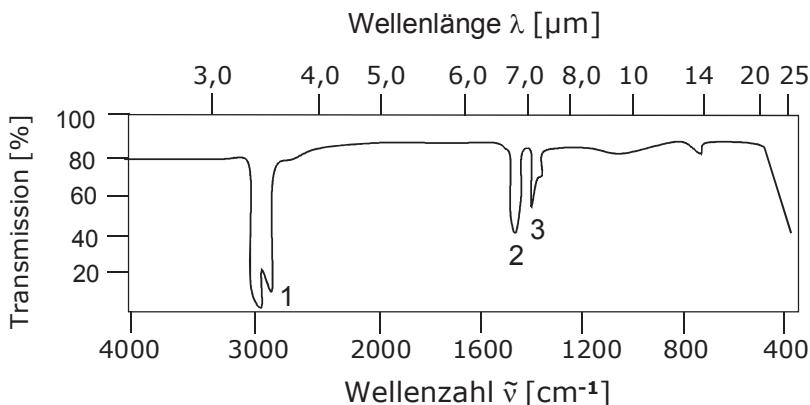
Abb. 10.40 Vom Interferogramm zum FTIR-Spektrum (schematisch)

10.4.4 Ausgewählte Infrarotspektren

10.4.4.1 IR-Spektrum von Paraffin

Die Abbildung 10.41 zeigt die schematische Darstellung eines Infrarotspektrums des Paraffins. Zur Probenpräparation diente die Nujoltechnik. Das Spektrum gibt Auskunft darüber, wie die Messung erfolgte. Als Ordinatenmaßstab wird die Transmission bzw. Durchlässigkeit in Prozent (% D) angegeben. Das entspricht dem prozentualen Strahlungsanteil, der von der Probe bei der jeweiligen Wellenlänge durchgelassen wird. Als Bezugswert dient stets der Vergleichsstrahl. Seltener wird als Ordinatenmaßstab die prozentuale Absorption (% A) angegeben.

Die Abszisse ist sowohl in μm (Wellenlänge) als auch in cm^{-1} (Wellenzahl) kalibriert.



- 1: (C-H)-Valenzschwingungen von CH₃- und CH₂-Gruppen
- 2: (C-H)-Deformationsschwingungen von CH₃- und CH₂-Gruppen: $\delta_{as}(\text{CH}_3)$; $\delta_s(\text{CH}_2)$
- 3: symmetrische (C-H)-Valenzschwingungen von CH₃- Gruppen: $\delta_s(\text{CH}_3)$

Abb. 10.41 IR-Spektrum eines Paraffins (Nujol als Film gemessen)

10.4.4.2 IR-Spektrum von Aceton

Die Abbildung 10.42 zeigt am Beispiel von Aceton charakteristische Bereiche, in denen bestimmte funktionelle Gruppen absorbieren.

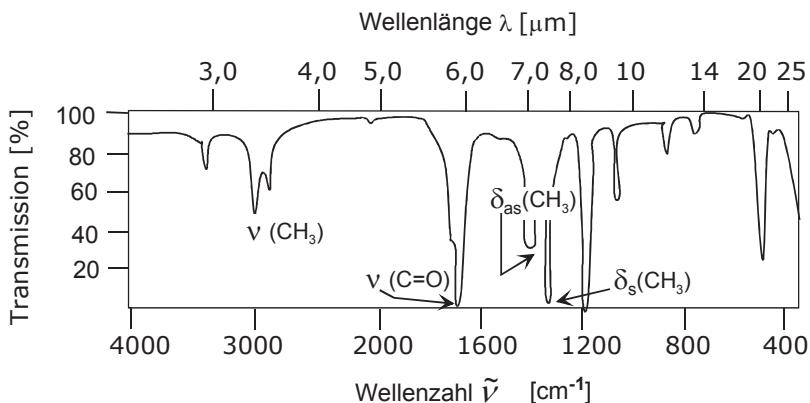


Abb. 10.42 IR-Spektrums von Aceton (schematisch)

Die Valenzschwingungen von Einfachbindungen mit Wasserstoff (s. z.B. C-H, N-H, O-H) absorbieren bei den höchsten Frequenzen, was eine Folge der kleinen Masse des Wasserstoffatoms ist. Mit größer werdender Atommasse wird die Absorptionsbande nach kleineren Wellenzahlen verschoben. Ansonsten gilt die Regel, je größer die Bindungsstärke zwischen zwei Atomen ist, um so höher liegt die Schwingungsfrequenz. Bei den Deformations- und Beugeschwingungen werden nur Bindungswinkel verändert, jedoch nicht die Bindungsabstände. Diese Schwingungen treten bei tieferen Wellenzahlen auf, meist im „fingerprint-Bereich“ bei Wellenzahlen unter $1\,500\text{ cm}^{-1}$.

10.4.4.3 IR-Spektren von Ascorbinsäure

Die Abbildungen 10.43 und 10.44 zeigen FTIR-Spektren von Ascorbinsäure, die mit der Abgeschwächten Totalreflexion (ATR-Technik, *ATR: attenuated total reflection*) aufgenommen wurden.

Diese Art von Reflexionsspektroskopie wird meist für die Analyse von Proben eingesetzt, die für IR-Strahlung nicht oder nur ungenügend durchlässig sind. Die eigentlichen Anwendungsgebiete betreffen Lacke, Fasern oder Polymere.

Die Aufgabe der Probe erfolgt bei der ATR-Technik direkt auf einem Kristall (Prisma), der z.B. aus Germanium besteht. Damit entfällt die Probenpräparation wie sie sonst in der IR-Technik (z.B. KBr-Pressling, Nujol-Technik) durchgeführt wird.

Unter Totalreflexion versteht man die vollständige Reflexion an einer Grenzfläche. Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung der ATR-Technik ist, dass der Brechungsindex des Prismas größer als der der Probe ist. Das Prinzip der ATR-Technik beruht nun darauf, dass Licht durch ein Medium mit einem relativ hohen Brechungsindex (ATR-Kristall) geleitet wird. Erfolgt der Lichteinfall auf den Kristall unter einem größeren Winkel als dem kritischen Einfallswinkel auf die Grenzfläche zu einem Medium mit kleinerem Brechungsindex (die Probe), so wird die Strahlung in das optisch dichtere Medium zurückreflektiert. Ein kleiner Teil der Strahlung dringt geringfügig in das optisch dünnere Medium der Probe ein.

Die ATR-Spektren von Ascorbinsäure (Abbildung 10.43 und 10.44), die in Absorption bzw. in Transmission gemessen wurden, zeigen identische Banden. Die Zuordnungen der einzelnen Wellenzahlen zu den entsprechenden Schwingungen sind in der Tabelle 10.4 zusammengefasst.

Die Ascorbinsäure enthält mehrere Strukturelemente, die einerseits ihr chemisches Verhalten prägen und andererseits mittels IR-Spektroskopie erfasst werden können. Dies sind eine Lactonstruktur, eine primäre und sekundäre Alkoholgruppe sowie zwei enolische Hydroxylgruppen.

Die charakteristischen OH-Valenzschwingungen treten im Bereich um $3\,200$ bis $3\,500\text{ cm}^{-1}$ (vgl. Tabelle 10.4) auf. Typische CH-Valenzschwingungen werden unter $3\,000\text{ cm}^{-1}$ registriert und charakteristisch für die Ascorbinsäure sind auch die Valenzschwingungen für die C=O-Gruppierung ($1\,754\text{ cm}^{-1}$) sowie für die C=C-Bindung bei $1\,673\text{ cm}^{-1}$.

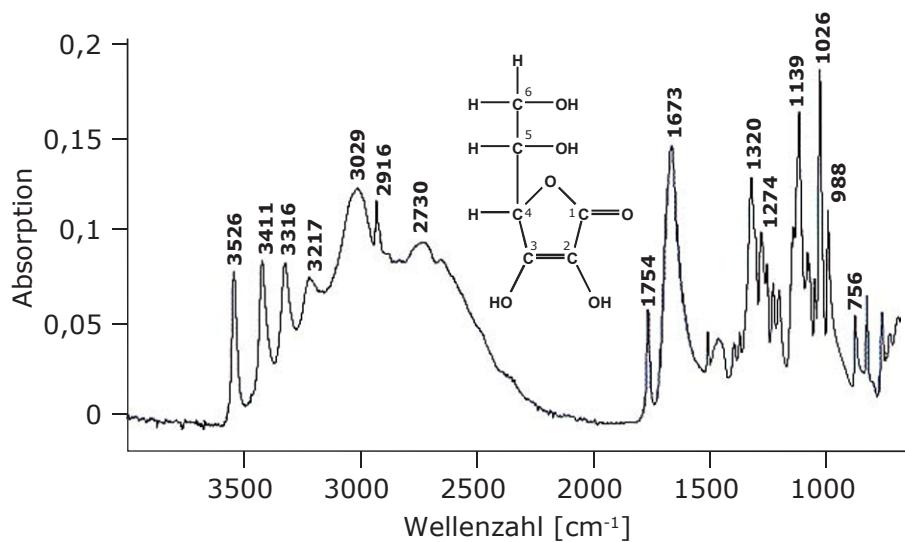


Abb. 10.43 FTIR-Spektrum in Absorption von Ascorbinsäure

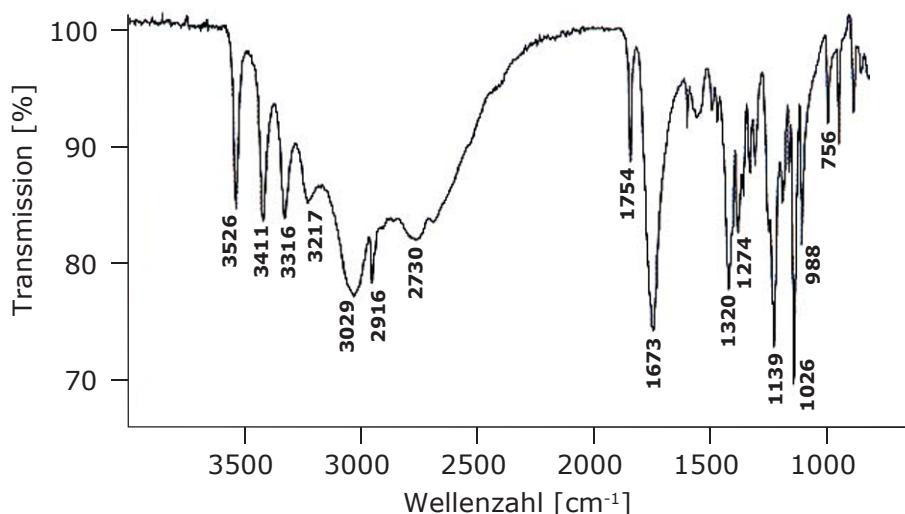


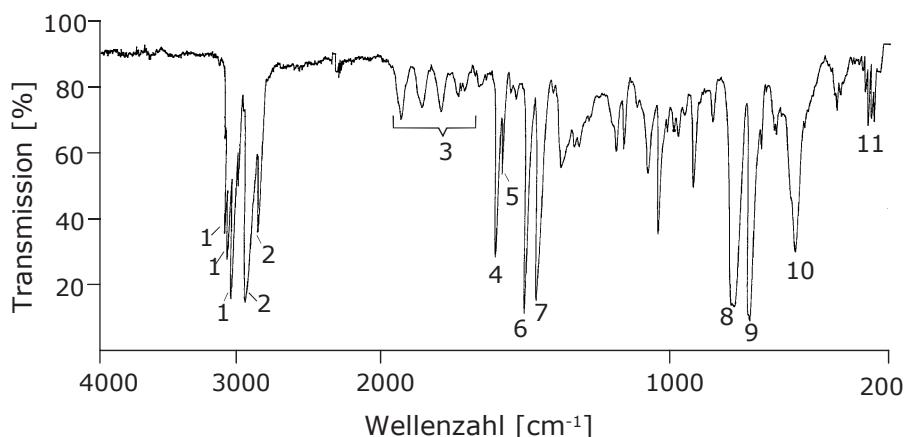
Abb. 10.44 FTIR-Spektrum in Transmission von Ascorbinsäure

Tabelle 10.4 Chrakteristische IR-Banden für Ascorbinsäure

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Schwingung
3 526, 3 411, 3 316, 3 217	OH-Valenzschwingung an C (5)/C (6)
3 029	OH-Valenzschwingung an C (2)/C (3)
2 916	CH-Valenzschwingung
2 730	OH-Valenzschwingung an C (2)/C (3)
1 754	C=O-Valenzschwingung
1 673	C=C-Valenzschwingung
1 320	OH-Deformationsschwingung
1 274	antisymmetrische C-O-C-Valenzschwingung
1 139	symmetrische C-O-C-Valenzschwingung
1 026, 988	Ringdeformationsschwingung
756	Rocking-CH ₂ -Deformationsschwingung

10.4.4.4 IR-Spektren von Folien

Noch einfacher bezüglich „Probenpräparation“ und Durchführung ist das Vermessen von Kunststoff-Folien und ähnlichen Materialien, wofür ein konventionelles IR-Spektrometer eingesetzt wurde. Die Folien sind als Fenster zwischen zwei Kartonstreifen eingepasst (Polystyrol-Folie, Abbildung 10.45) oder wurden auf einem Plastikstreifen mit entsprechendem Fensterloch aufgeklebt (Celluloseacetat-Folie, Abbildung 10.46).

**Abb. 10.45** IR-Spektrum von einer Polystyrol-Folie

Für die Polystyrol-Folie sind eine ganze Reihe von Schwingungen den einzelnen Wellenzahlen zuzuordnen. Andererseits können auch funktionelle Gruppen wie die Hydroxylgruppe, die eine breite Bande im Bereich 3 200 bis 3 500 cm⁻¹ zeigt (vgl. Abbildung 10.46) hier ausgeschlossen werden. Signifikant sind olefinische sowie aromatische C-H-Valenzschwingungen (Streckschwingungen), die größere Wellenzahlen (1) als 3 000 cm⁻¹ aufweisen. Die aliphatischen CH-Valenzschwingungen (2) liegen signifikant unterhalb dieser Wellenzahl. Weiterhin können der „aromatische Finger“ (3), aromatische C=C-Doppelbindungen (4,5) lokalisiert werden. Im fingerprint-Bereich unterhalb ab ca. 1 500 cm⁻¹ sind einerseits für funktionelle Gruppen wenig spezifische Schwingungen sehr gut ausgeprägt (6,7). Andererseits können aber verschiedene Signale für Aromaten (8–11) lokalisiert werden.

Signifikant ist der Vergleich des IR-Spektrums der Polystyrol-Folie mit dem der Celluloseacetat-Folie (Abbildung 10.46). Diese Folien werden auch in der klassischen Elektrophorese zur Trennung von Serumproteinen (Serumeiweiß-Acetatfolien-Elektrophorese, Kapitel 8.3.3) eingesetzt. Für ihre Anwendung in der IR-Spektroskopie müssen sie in Klarsichtfolien „transformiert“ werden. Die Transparenz wird erreicht, nachdem die Celluloseacetat-Folie mit Methanol imprägniert, mit einer Klärlösung behandelt und nach dem Aufbringen der Folie (Aufwalzen) auf eine Glasplatte bei 80°C getrocknet wurde. Die transparente Folie wird anschließend mit reinem Wasser von der Glasplatte abgelöst, erneut getrocknet und zur Vermessung im IR-Spektrometer auf einer Matrize in den Strahlengang positioniert.

Im IR-Spektrum wird eine charakteristische und relativ breite OH-Bande im Bereich von ca. 3 500 cm⁻¹ registriert, die den hydrophilen Charakter der Celluloseacetat-Folie belegt. Aromatische Schwingungen sind demzufolge bei Wellenzahlen > 3000 cm⁻¹ nicht vorhanden. Dagegen werden die aliphatischen Valenzschwingungen (2) im Infrarotspektrum gut angezeigt.

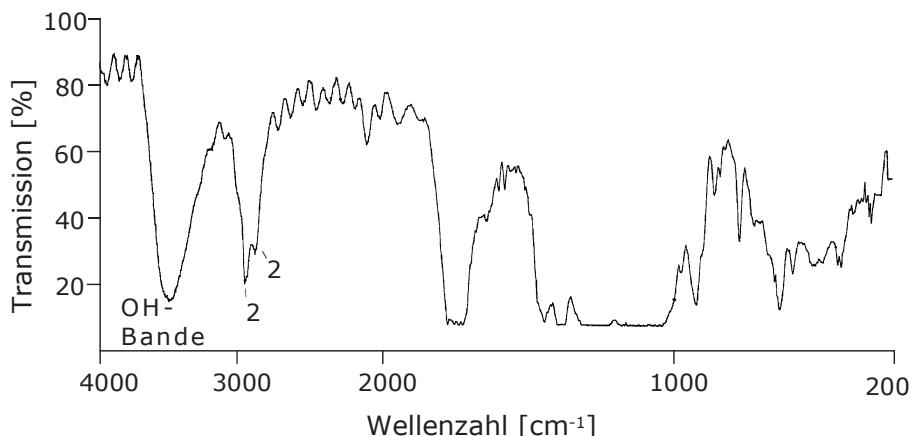


Abb. 10.46 IR-Spektrum einer Celluloseacetat-Folie

10.5 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie, kurz als NMR-Technik (*nuclear magnetic resonance*) bezeichnet, basiert auf der Anregung von Atomkernen durch Radiowellen (s. Tabelle 10.5).

Im Vergleich zu Elektronen sind Kerne (Protonen) wesentlich schwerer, weshalb für ihre Überführung in einen höheren (angeregten) Energiezustand zusätzlich ein homogenes Magnetfeld angelegt werden muss.

Bloch und Purcell gehörten Mitte der 1940-er Jahre zu den Wegbereitern dieser strukturanalytischen Methode und erhielten 1952 dafür den Nobelpreis für Physik.

Die NMR-Technik ist eine der wichtigsten und aussagekräftigsten instrumentalanalytischen Methoden in der organischen Chemie und gewinnt seit einigen Jahren für die Strukturaufklärung kompliziert zusammengesetzter Biomoleküle wie Proteine, Glycoproteine und Oligosaccharide zunehmend an Bedeutung (s. Abschnitt 15.12).

Am häufigsten erfolgt die Anregung von Protonen (^1H -NMR-Spektroskopie) und von Kohlenstoffkerne (^{13}C -NMR-Spektroskopie). Weniger verbreitet sind die Kernanregungen von ^{15}N , ^{19}F oder ^{31}P (siehe auch Abschnitt 15.13.2).

10.5.1 Magnetfeld, Kernanregung und Kernspin

Unter einem Magnet versteht man einen Körper von dem ein magnetisches Feld ausgeht. Im Vergleich zu elektrischen Ladungen, die negativ oder positiv sein können, treten magnetische Pole stets paarweise auf (s. Abbildung 10.47). Neben einem positiven Pol (Nordpol) existiert immer ein negativer Pol (Südpol).

Man unterscheidet zwischen Körpern, die dia-, ferro- oder paramagnetisch sind. Bei einem diamagnetischen Stoff, der sich in einem homogenen Magnetfeld befindet, erfolgt eine Verdünnung der Feldlinien (Abbildung 10.48 A). Deshalb wird er aus dem Magnetfeld herausgedrängt. Paramagnetische Stoffe bewirken dagegen eine Verstärkung der Feldlinien und werden ins Magnetfeld hineingezogen (Abbildung 10.48 B).

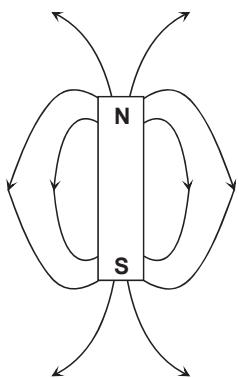


Abb. 10.47 Stabmagnet

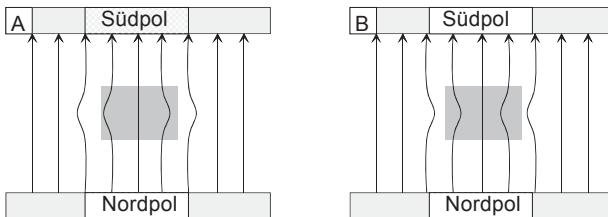


Abb. 10.48 Körper im Magnetfeld, A: Diamagnetisch, B: Paramagnetisch

Paramagnetismus und Ferromagnetismus haben Atome oder Moleküle, die auf Grund unvollständig besetzter Elektronenschalen ein eigenes magnetisches Moment μ aufweisen.

Die meisten Kerne der Atome (Protonen) besitzen einen sogenannten Kern- bzw. Eigendrehimpuls P , den man als Rotation eines Atomkerns um eine Kernachse betrachten kann. Dieser Drehimpuls ist gequantelt, d.h., er nimmt nur ganz bestimmte, diskrete Energiemengen (Quanten) auf.

$$P = \frac{\hbar}{2\pi} \cdot \sqrt{I(I+1)} \quad (10.16)$$

Dabei ist I die Spinquantenzahl, die allgemein als Kernspin bezeichnet wird, und \hbar ist das Plank'sche Wirkungsquantum.

Voraussetzung für die Absorption von elektromagnetischer Strahlung ist, dass die Atomkerne ein magnetisches Moment besitzen. Dieses wird durch den Kernspin induziert. Das Verhalten der Atomkerne entspricht dem von winzig kleinen Magneten. Daher präzidieren die Kerne, wenn sie einem homogenen Magnetfeld H_0 ausgesetzt werden.

Die potentielle Energie E für die magnetischen Zustände von Atomkernen hängt von den folgenden Parametern ab,

$$E = -\frac{\gamma \cdot m \cdot h}{2 \cdot \pi} H_0 \quad (10.17)$$

wobei γ das gyromagnetische Verhältnis (Proportionalitätsfaktor, s.a. Gleichung 10.18) und m die magnetische Quantenzahl bzw. die Orientierungsquantenzahl sind. Es resultieren m -Werte zwischen $m=I$ und $I-1$ bis $-I$. Daraus folgt, dass die Kerne gegenüber dem Magnetfeld nur ganz bestimmte Einstellmöglichkeiten haben, was als Richtungsquantelung bezeichnet wird. Für 1H - oder ^{13}C -Kerne beträgt $I=1/2$. Daraus ergeben sich zwei m -Werte von $+1/2$ und $-1/2$ (Abbildung 10.49).

Für ^{14}N -Kerne resultieren dagegen drei m -Werte ($+1, 0, -1$). Insgesamt können die Kernspins Werte zwischen 0 und 6 annehmen. Einige wichtige Kernisotope der NMR-Technik enthält die Tabelle 10.5.

Tabelle 10.5 Wichtige Kerne in der NMR-Spektroskopie

Kern-isotop	Spin	Natürliche Häufigkeit [%]	Gyromagnetisches Verhältnis $\gamma [10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	NMR-Frequenz [MHz] $H_0 = 2,3488 \text{ T}$
¹ H	1/2	99,98	26,7519	100,000
² H	1	0,016	4,1066	15,351
¹² C	0	98,6	—	—
¹³ C	1/2	1,108	6,7283	25,144
¹⁴ N	1	99,63	1,9338	7,224
¹⁵ N	1/2	0,37	-2,712	10,133
¹⁶ O	0	99,96	—	—
¹⁷ O	5/2	0,037	-3,6279	13,557
³¹ P	1/2	100	10,841	40,481

Die Spins für die Isotope ¹²C und ¹⁶O betragen Null, weshalb sie mit dieser Technik nicht nachweisbar sind.

Das magnetische Moment μ (Magnetfeld) ist über den Proportionalitätsfaktor γ linear mit dem Kernspin P verknüpft.

$$\mu = \gamma \cdot P \quad (10.18)$$

Je größer die γ -Werte der Kerne sind, um so empfindlicher können diese Kerne nachgewiesen werden.

Wie aus Tabelle 10.5 bereits hervorgeht, bilden die Kernspins 1/2 in der NMR-Technik die am häufigsten verwendete Messgrundlage. In Abbildung 10.49 ist diese Aufspaltung der Energieniveaus (*Zeemann-Aufspaltung*) nach Anlegen eines Magnetfeldes schematisch dargestellt.

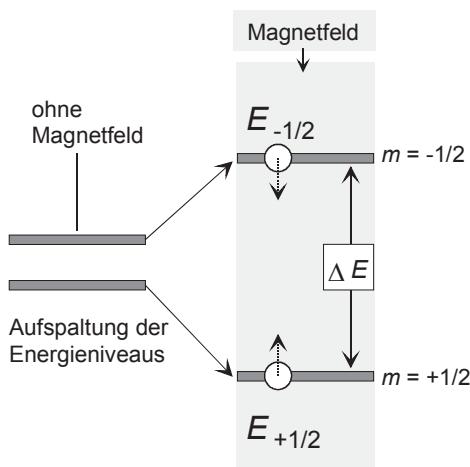


Abb. 10.49 Aufspaltung der Energieniveaus des Kerns nach Anlegen eines Magnetfeldes

Für die magnetischen Quantenzahlen $m=+1/2$ und $m=-1/2$ resultieren die folgenden Energiezustände $E_{+1/2}$ und $E_{-1/2}$.

$$E_{+1/2} = -\frac{\gamma \cdot h}{2 \cdot \pi} \cdot H_0 \quad (10.19)$$

$$E_{-1/2} = \frac{\gamma \cdot h}{2 \cdot \pi} \cdot H_0 \quad (10.20)$$

Die Differenz der Energieniveaus ΔE ergibt sich aus der folgenden Gleichung.

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot h}{2 \cdot \pi} \cdot H_0 \quad (10.21)$$

Die Energiedifferenz ΔE ist direkt proportional der Absorptions- oder Emissionsfrequenz der Strahlung und ergibt sich aus der folgenden Beziehung.

$$\Delta E = h \cdot \nu_0 \quad (10.22)$$

ν_0 ist die Radiofrequenz, die mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ und dem äußeren Magnetfeld (Magnetflussdichte) H_0 in folgender Beziehung steht:

$$\nu_0 = \frac{\gamma \cdot H_0}{2 \cdot \pi} \quad (10.23)$$

In der NMR-Technik werden Magnetflussdichten zwischen 1,41 und 14,09 Tesla angewendet. Die entsprechenden Resonanzfrequenzen für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Technik sind diesen Werten gegenübergestellt (Tabelle 10.6.).

Tabelle 10.6 Magnetflussdichten und Resonanzfrequenzen

Magnetflussdichte H_0 [Tesla]	$^1\text{H-NMR}$ Resonanzfrequenz [MHz]	$^{13}\text{C-NMR}$ Resonanzfrequenz [MHz]
1,41	60	15,1
1,88	80	20,1
2,11	90	22,6
2,35	100	25,1
4,70	200	50,3
5,87	250	62,9
7,05	300	75,1
9,40	400	100,6
11,74	500	125,7
14,09	600	150,9

10.5.2 Resonanzbedingung

Die Kerne bewegen sich auf einer Kreisbahn (s. Abbildung 10.50). Unter dem Einfluss des Magnetfeldes H_0 erfolgt eine Auslenkung des Kerns auf dieser Kreisbahn um den Winkel θ .

Die Auslenkung (*Präzession*) wird als *Lamor-Frequenz* bezeichnet. Die Energie für diesen energetischen Übergang steht im direkten Zusammenhang mit dem Winkel θ , der aus dieser Kreisbewegung nur in einem bestimmten Maß ausgelenkt werden kann.

$$E = -\mu_z \cdot H_0 = -\mu \cdot H_0 \cdot \cos \theta \quad (10.24)$$

Die Übergänge zwischen den Energieniveaus basieren auf folgender Auswahlregel:

$$\Delta m = \pm 1 \quad (10.25)$$

Damit wird deutlich, dass die Aufspaltung der Energieniveaus durch die Ausrichtung des magnetischen Moments des Kerns in Richtung des äußeren Magnetfeldes oder entgegengesetzt zu diesem erfolgen kann.

Für die magnetischen Zustände eines Kerns mit dem Spin 1/2 ergeben sich bei Anlegen eines Magnetfeldes mehrere Besetzungsmöglichkeiten für den Grundzustand im Vergleich zum angeregten Zustand, wie aus Abbildung 10.51 schematisch hervorgeht.

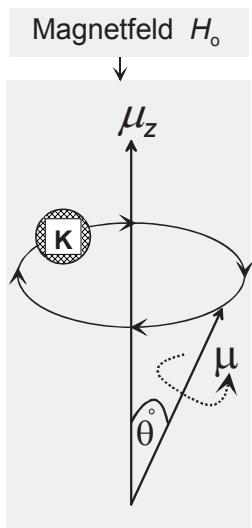


Abb. 10.50 Rotationsbewegung eines magnetischen Kerns (K) unter dem Einfluss eines angelegten Magnetfeldes

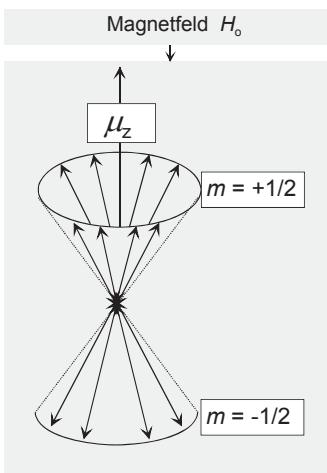


Abb. 10.51 Darstellung eines Doppelkegels für Kerne mit einem Spin = 1/2

10.5.3 Relaxation

Zur Erklärung der Relaxation wird nochmals herausgestellt, dass Atomkerne unter dem Einfluss eines starken äußeren Magnetfeldes unterschiedliche Orientierungen annehmen, was eine Aufspaltung der Energieniveaus zur Folge hat (vgl. Abbildung 10.49). Entsprechen sich die Energiedifferenz zwischen beiden Niveaus und die Energie der eingestrahlten Radiowelle, so kommt es zur Resonanz zwischen dem schwingenden Feld dieser elektromagnetischen Strahlung und dem rotierenden Atomkern. Das magnetische Moment, induziert durch den Kernspin, geht dabei unter Absorption der Radiowellenfrequenz in einen energiereicheren Zustand über.

Der entgegengesetzt ablaufende Prozess wird als Relaxation bezeichnet. Dabei kehrt das Spinsystem vom angeregten Zustand nach dem Abschalten des Magnetfeldes in den Grundzustand (Gleichgewichtszustand) zurück. Die Zeit dafür kann unter einer Sekunde, im Minutenbereich oder auch darüber liegen.

Man unterscheidet zwischen zwei im Mechanismus unterschiedlichen Relaxationsprozessen. Die Spin-Gitter-Relaxation oder longitudinale Relaxation wird durch die Relaxationszeit T_1 charakterisiert. Nach Abschalten des Magnetfeldes erfolgt die Abgabe von überschüssiger Energie an die Umgebung durch thermische Prozesse (Temperaturerhöhung).

Die Charakterisierung der Spin-Spin-Relaxation oder transversalen Relaxation erfolgt durch die Zeitkonstante T_2 . Die Relaxation basiert auf dem Energieaustausch zwischen einzelnen Spins und führt zu keiner Energieerhöhung im Spinsystem.

10.5.4 Impulsverfahren

Die Aufnahme von NMR-Spektren von einer Probesubstanz durch eine kontinuierliche Veränderung des Magnetfeldes würde zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses und damit zu geringeren Empfindlichkeiten führen.

Effizienter ist die Anregung von Atomkernen durch sehr schnelle hintereinander geschaltete Impulse aus dem Bereich der Radiowellen.

Bei diesem Impulsverfahren sendet ein Hochfrequenz-Generator ein kontinuierliches Frequenzband aus, von dem ein Teil zur Anregung der Atomkerne genutzt wird. Die Impulslänge τ beträgt nur wenige μs .

Die Auswahl der richtigen Generatorfrequenz ν hängt von der eingesetzten NMR-Technik und vom Magnetfeld H_0 ab. Für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Technik sind diese Werte in der Tabelle 10.5 aufgelistet. Bei $H_0=2,35$ Tesla z.B. sind für den Protonenübergang eine Frequenz von 100 MHz und für die Anregung von ^{13}C -Kernen 25,1 MHz erforderlich.

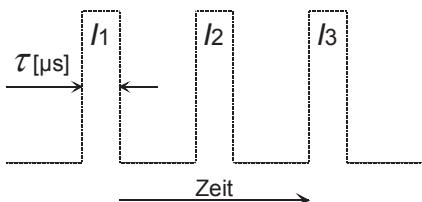


Abb. 10.52 Impulsfolge (I_1 , I_2 , I_3 ...) eines Hochfrequenz-Generators in der NMR

10.5.5 Chemische Verschiebung

Bisher wurden die Vorgänge um die Atomkerne nur im „nackten“ Zustand betrachtet. Die Kerne werden jedoch von der sie umgebenden Elektronenhülle und von anderen Atomkernen abgeschirmt. Dadurch entstehen weitere magnetische Felder, die dem Magnetfeld des Kernes entgegenwirken und die zur Verschiebung der Resonanzfrequenz des Kernes führen. Das ursprünglich angelegte Magnetfeld H_0 wird dadurch um den Betrag σH_0 verändert und es resultiert die effektive Magnetfeldstärke H_{eff} :

$$H_{\text{eff}} = H_0 - \sigma \cdot H_0 = (1 - \sigma) \cdot H_0 \quad (10.26)$$

σ wird als Abschirmkonstante bezeichnet. Sie ist um so größer, stärker die Abschirmung des Kernes ist. Zum Beispiel schirmen Elektronen in Kernnähe stärker ab als kernferne Elektronen.

Zur Angabe der Absorption der Atomkerne wird in der NMR eine relative Größe verwendet, die als chemische Verschiebung δ bezeichnet wird und sich aus der Differenz der Resonanzsignale der Probe und eines inneren Standards ergibt.

$$\delta = 10^6 \cdot \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Standard}}}{\nu_{\text{Standard}}} \quad (10.27)$$

In der ^1H - und ^{13}C -NMR-Technik wird als Referenzsubstanz Tetramethylsilan (TMS) verwendet, da alle 12 Wasserstoffatome um das Siliziumatom mit identischer Umgebung angeordnet sind und sie eine starke Abschirmung des Kernes bewirken. Definitionsgemäß wird die chemische Verschiebung von TMS gleich Null gesetzt.

$$\delta(\text{TMS}) = 0 \quad (10.28)$$

Die chemische Verschiebung ist eine dimensionslose Größe, deren Angabe in ppm (Faktor 10^6) erfolgt. Die Skala wird in der ^1H -NMR-Spektroskopie im Bereich zwischen 0 und 10 ppm aufgetragen, in der ^{13}C -NMR-Technik liegt dieser Bereich zwischen 0 und 220 bzw. 400 ppm.

Die chemische Verschiebung ist unabhängig von dem angelegten Magnetfeld und der eingestellten Messfrequenz.

Für die repräsentativen Substanzen Bromoform, Ethyl- und Methylbromid ist das 90 MHz- ^1H -NMR-Spektrum in Abbildung 10.53 schematisch dargestellt. Es erfolgt keine Aufspaltung der Signale, da die Moleküle keine benachbarten Protonen enthalten.

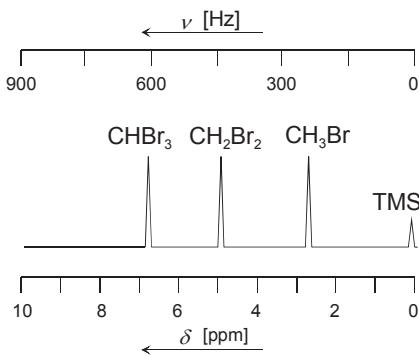


Abb. 10.53 ^1H -NMR-Spektrum von Bromoform, Ethyl- und Methylbromid (schematisch)

10.5.6 Spin-Spin-Kopplung

Wenn in einem Molekül Protonen benachbart angeordnet sind, treten über die Bindungen der Protonen zwischen den Kernspins Wechselwirkungen ein, die als Spin-Spin-Kopplung bezeichnet werden. Sie ist der chemischen Verschiebung überlagert.

Spin-Spin-Kopplungen und damit Aufspaltungen werden bei benachbarten Methyl- und Methylengruppen registriert, wie dies am Beispiel eines Ethylhalogenids (Ethylbromid) anschaulich dargestellt ist (s. Abbildung 10.54).

Das Intensitätsverhältnisse für die CH_3 -Gruppe, die dreifach aufspaltet, beträgt 1:2:1. Für die vierfache Aufspaltung der CH_2 -Gruppe resultiert ein Verhältnis von 1:3:3:1.

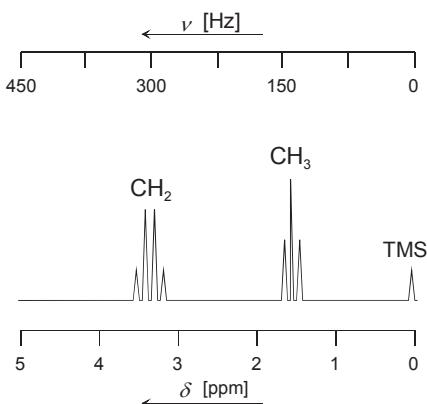


Abb. 10.54 ^1H -NMR-Spektrum von Ethylbromid (schematisch)

Im ersten Fall koppeln die äquivalenten Protonen der Methylgruppe mit zwei Protonen der Methylengruppe, woraus vier Kopplungsmöglichkeiten resultieren (Abbildung 10.55). Die parallel gerichteten Spins ($-1/2$), die in Richtung des Magnetfeldes zeigen, verstärken das angelegte Feld, während die parallelen Spins in entgegengesetzter Richtung das Magnetfeld abschwächen. Die antiparallel orientierten Spins führen zu keiner weiteren Signalaufspaltung. Beide Intensitäten erscheinen verdoppelt im NMR-Spektrum.

Bei der folgenden Aufspaltung koppeln die Protonen der CH_2 -Gruppe mit den drei Protonen der CH_3 -Gruppe. Daraus ergeben sich insgesamt acht Möglichkeiten der Spin-Spin-Kopplung. Die beiden Gruppen in der Mitte der Abbildung 10.56 enthalten gemischte Spins, die die Werte $-1/2$ oder $+1/2$ besitzen. Es resultieren zwei Signale, die im Vergleich zu den beiden parallel orientierten Spins ($-3/2$ und $+3/2$) eine dreifach höhere Signalintensität ergeben.

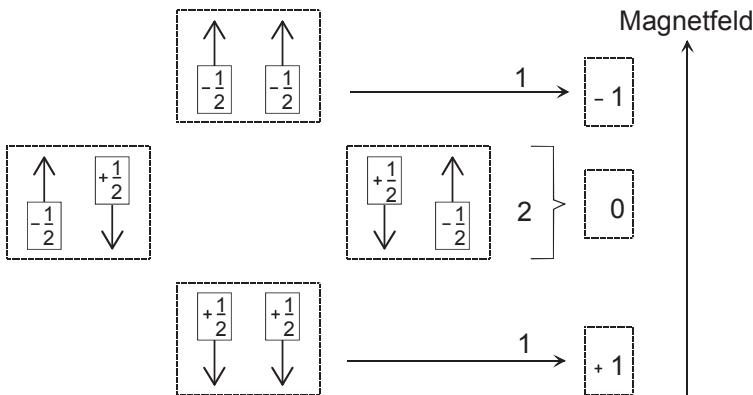


Abb. 10.55 Protonen-Kopplungen zwischen Methyl- und Methylengruppe

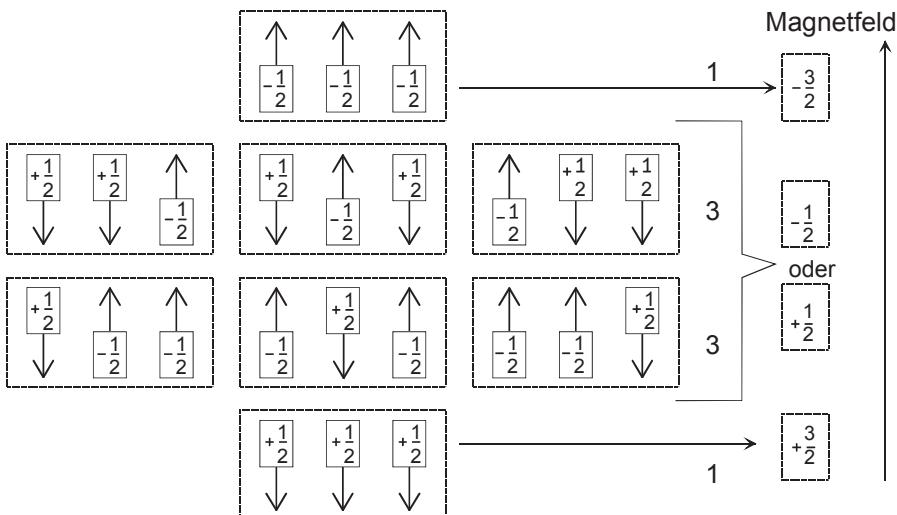


Abb. 10.56 Kopplungsmöglichkeiten der Protonen zwischen Methylen- und Methylgruppe

10.5.7 Aufbau eines NMR-Spektrometers

NMR-Spektrometer gehören zu den teuren Analysengeräten. Sie bestehen aus einem homogenen und stabilen Magnetsystem, einem Sender zur Erzeugung der Radiowellen und einem Empfänger, der die Resonanzsignale registriert. Auf einem Schreiber bzw. Computer oder Oszilloskop wird das NMR-Spektrum, in dem die Intensität der Signale gegen die chemische Verschiebung aufgetragen ist, sichtbar gemacht.

Die Magneten besitzen Feldstärken zwischen 1,4 und 14 Tesla, die in der ^1H -NMR-Spektroskopie Resonanzfrequenzen zwischen 60 und 600 MHz und in der ^{13}C -NMR-Technik zwischen 15 und 150 MHz entsprechen (vgl. Tabelle 10.5).

Sender- und Empfängerspulen arbeiten im Hochfrequenzbereich der Radiowellen und sind senkrecht zueinander und senkrecht zur Magnetfeldrichtung angeordnet.

Nach erfolgter Kernspinanregung durch die Sendefrequenz wird im Empfänger ein Magnetfeld induziert, das einen proportionalen Stromfluss erzeugt. Diese Signale werden verstärkt und aufgezeichnet. Man unterscheidet zwischen dem Feld-Sweep-Verfahren, bei dem das magnetische Feld H_0 verändert und die Sendefrequenz ν konstant gehalten wird, und der Frequenz-Sweep-Technik, die bei konstantem Magnetfeld und variabler Frequenz arbeitet. Beide Verfahren werden in der NMR-Spektroskopie als Continuous-Wave-(CW)-Technik bezeichnet.

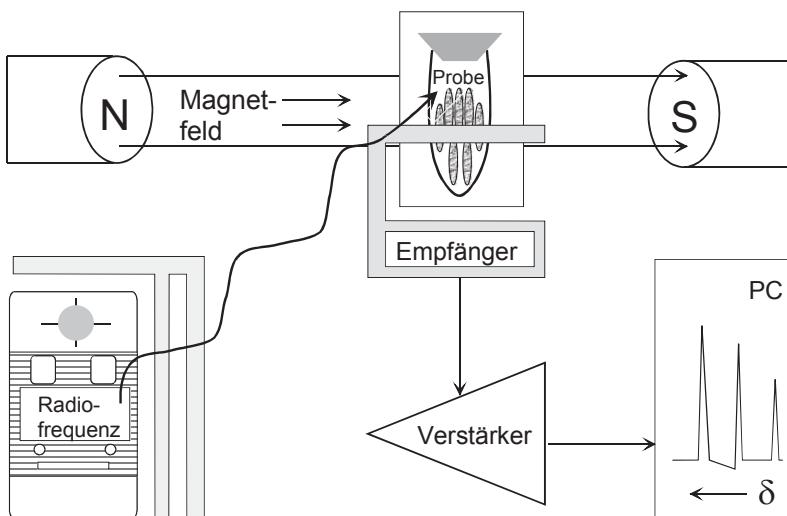


Abb. 10.57 Prinzipieller Aufbau eines NMR-Gerätes

Demgegenüber gewinnen Puls-Fourier-Transform-Spektrometer, die auf der Impulstechnik basieren, zunehmend an Bedeutung.

Die zu analysierende Probesubstanz befindet sich in einem Röhrchen, das innerhalb des magnetischen Feldes positioniert ist. In der ^1H -NMR-Technik werden die Substanzen z.B. in Tetrachlorkohlenstoff, Schwefelkohlenstoff oder in deuteriertem Chloroform gelöst. In der ^{13}C -NMR wird hauptsächlich deuteriertes Chloroform als Lösungsmittel eingesetzt.

10.5.8 Strukturaufklärung

Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie tragen sehr wesentlich zur Strukturaufklärung chemischer und biochemischer Moleküle bei. Aus einem NMR-Spektrum können als wichtige Informationen die chemische Verschiebung, die Spin-Spin-Kopplungsmuster und die Peakflächen (Intensitäten) entnommen werden.

An Hand der chemischen Verschiebung von Protonenkernen können einzelne funktionelle Gruppen zugeordnet und die Struktur des Gesamt moleküls vorausgesagt bzw. abgeleitet werden. Die zu erwartenden Bereiche für die chemische Verschiebung der ^1H -Kerne sind in der Abbildung 10.58 dargestellt.

Ein breites Anwendungsgebiet speziell der ^1H -NMR-Spektroskopie innerhalb der Bioanalytik ist die Identifizierung von komplizierten Kohlenhydratstrukturen. Sie ist beispielsweise dafür prädestiniert, α - und β -anomere Verknüpfungen innerhalb von Glykanketten, die aus Glycoproteinen enzymatisch oder durch Hydrazinolyse freigesetzt wurden, an Hand der unterschiedlichen Protonensignale zu differenzieren (vgl. Abbildung 15.111 in 15.12.2.6). Dabei resultiert für das Proton des α -Anomers die größere chemische Verschiebung im NMR-Spektrum.

Die gesamte Strukturaufklärung von Oligosacchariden ist jedoch sehr diffizil und sollte in der Spezialliteratur detaillierter nachgelesen werden.

Auf die ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie innerhalb der Analyse von Lipiden und Phospholipiden wurde bereits verwiesen (Abschnitt 15.13.2.). Die entsprechenden Erwartungsbereiche für die chemischen Verschiebungen in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie sind in Abbildung 15.116 wiedergegeben.

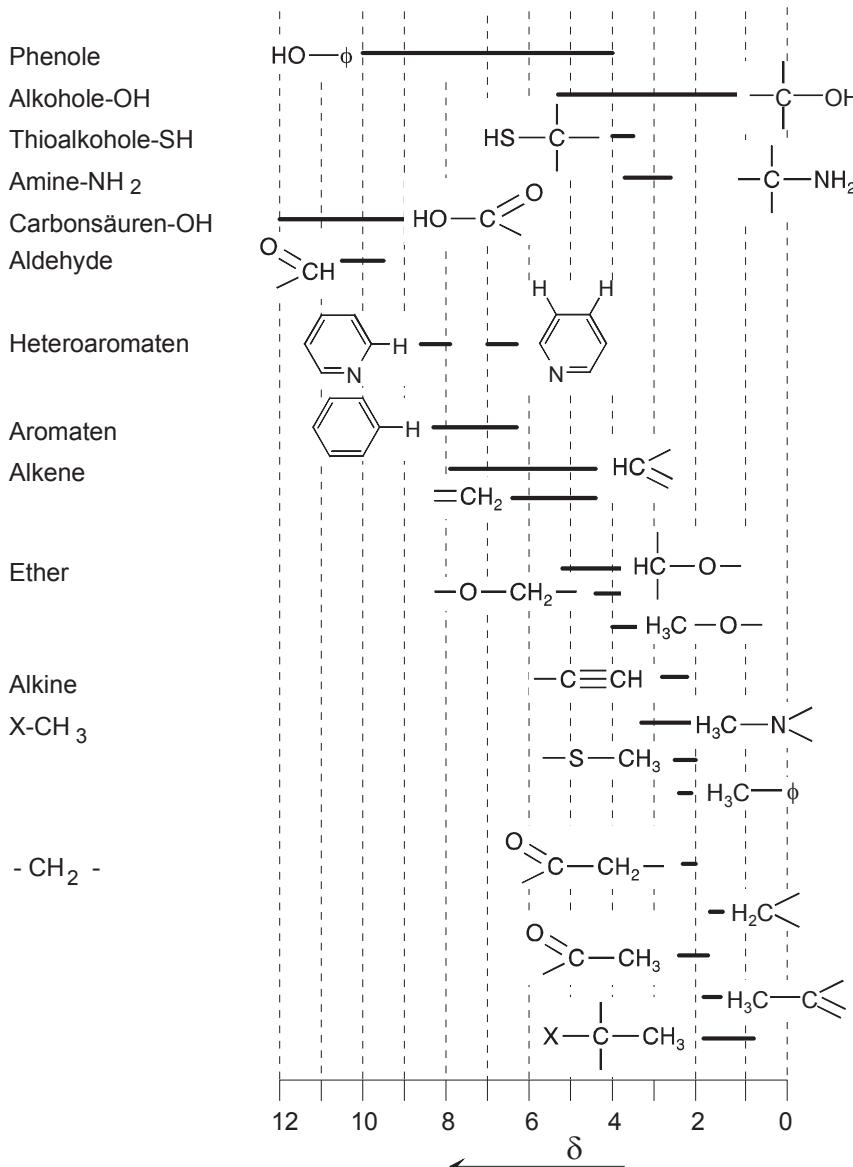


Abb. 10.58 Chemische Verschiebungen für ^1H -Kerne funktioneller Gruppen

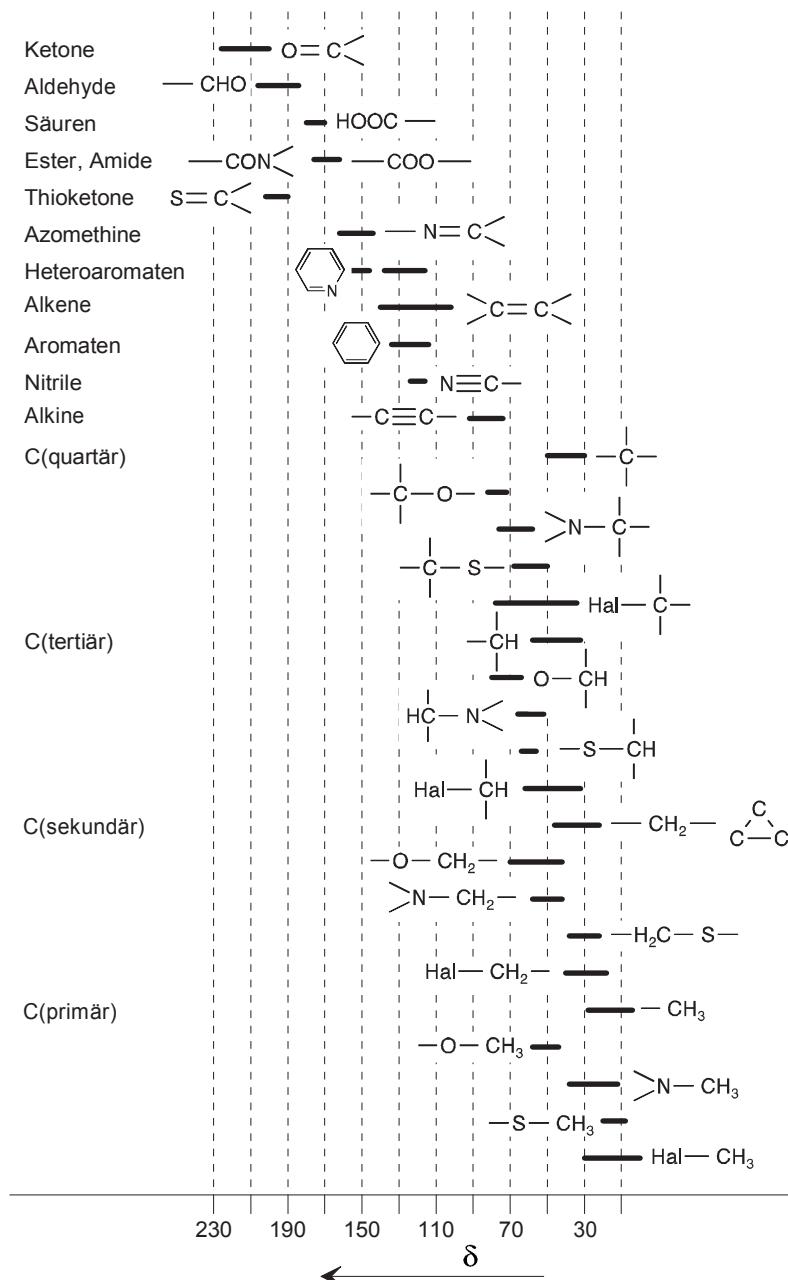


Abb. 10.59 Chemische Verschiebungen für ^{13}C -Kerne funktioneller Gruppen

Für Lysozym resultiert beispielsweise ein Molekulargewicht von 7153,7 (Abbildung 11.33).

10.6 Literatur

- Borsdorf R, Scholz M (1968) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Akademie-Verlag Berlin
- Breitmaier E (1992) Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen, Teubner Verlag Stuttgart
- Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Acad Verlag
- Friebolin H (1988) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH-Verlag Weinheim
- Galla H-J (1988) Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Gey MH (1998) Instrumentelle Bioanalytik, Friedr Vieweg & Sohn Verlag Braunschweig Wiesbaden
- Günther H (1992) NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Günzler H, Gremlich H-U (2003) IR-Spektroskopie, WILEY-VCH
- Harris DC (1997) Quantitative Analytische Chemie, Friedr Vieweg & Sohn Verlag Braunschweig Wiesbaden
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (1995) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Huber W (1982) Analytiker Taschenbuch, Band 2, Springer-Verlag Heidelberg
- Lehmann J (1996) Kohlenhydrate: Chemie und Biologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Munck L (1990) Fluorescence analysis in food, John Wiley & Sons New York
- Otto M (1995) Analytische Chemie, VCH-Verlag Weinheim
- Perkampus H-H (1986) UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen, Springer-Verlag Heidelberg
- Schwedt G (1995) Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Sommer L (1989) Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet: the principles, Elsevier Amsterdam
- Steger WE (1992) Strukturanalytik, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig
- Zander M (1981) Fluorimetrie, Springer-Verlag Heidelberg
- Zschunke A (1971) Kernmagnetische Resonanzspektroskopie in der organischen Chemie, Akademie-Verlag Berlin

Wer Erfolg haben will, darf keine
Angst haben, Fehler zu machen.

Frank Tyger

11 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) dient zusammen mit der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) vor allem der Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Ein Nachteil der MS-Methoden ist, dass das Probematerial während der Analyse verbraucht bzw. zerstört wird. In Kombination mit der Chromatographie (GC-MS, LC-MS) ist die Massenspektrometrie prädestiniert für die Quantifizierung aufgetrennter Analyte aus komplex zusammengesetzten Matrices. Dabei können Nachweisgrenzen im Nano- (ng) bzw. Femtogramm (fg) erzielt werden. Während die GC-MS-Kopplung für niedermolekulare Stoffe angewandt wird, liegen die Vorteile und Stärken der LC-MS in der Analyse von hochmolekularen Substanzen (Peptide, Proteine). Weitere Kopplungsmöglichkeiten wie SFC-MS oder CE-MS sind ebenfalls in der Instrumentellen Analytik organischer Moleküle etabliert. (s.a. Kapitel 12.4). Innerhalb der Analytik von Metallen stellt die Kopplung der Massenspektrometrie mit einem induktiv gekoppelten Plasma (ICP-MS) eine robuste und empfindliche Multielementmethode dar (Kapitel 9.4).

In der Massenspektrometrie werden die Probemoleküle mit Hilfe einer Ionenquelle in positiv und negativ geladene gasförmige Ionen überführt. Diese werden in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und mit einem Detektor registriert. Zur Vermeidung von Kollisionen zwischen den ionisierten Teilchen wird mit Hilfe von Pumpen ein Hochvakuum im Massenspektrometer erzeugt.

Auf Grund der Ionentrennung in einem elektromagnetischen oder elektrischen Feld wird die Massenspektrometrie den Trennmethoden zugeordnet. Unter Zugrundelegen der Tatsache, dass durch die Wechselwirkung von Strahlung und Probe zuvor die Ionisierung der Moleküle erfolgte, ist die Massenspektrometrie auch als Spektroskopische Methode („Massenspektroskopie“) einzuordnen.

11.1 Aufbau eines Massenspektrometers

Das folgende Blockschema beinhaltet die Hauptbestandteile eines Massenspektrometers. Dazu gehören Probeeinlass, die Ionenquelle, das Trennsystem bzw. der Analysator, der die Analyte nach dem m/z -Verhältnis auftrennt, und der Detektor („Auffänger“) sowie eine Steuer- und Auswerteeinheit. Das Vakuumssystem setzt sich aus einem Vorvakuum (Druck ca. 10^{-1} mbar), das mit Drehschieberpumpen erzeugt wird, und einem Hochvakuum (Turbopumpen, 10^{-4} mbar) zusammen.

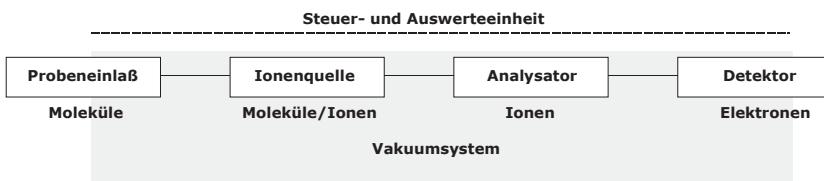


Abb. 11.1 Blockschema eines Massenspektrometers

Die Abbildung 11.2 zeigt das Massenspektrometer in detaillierter Form. Wichtig ist, dass die in der Ionenquelle erzeugten geladenen Analyte in Richtung Trennsystem beschleunigt („Beschleunigungsplatten“) werden. Sowohl die vielfältigen Möglichkeiten der Ionisierung als auch Ionentrennung (z.B. Magnetfeld) werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Dies betrifft auch die Einlasssysteme.

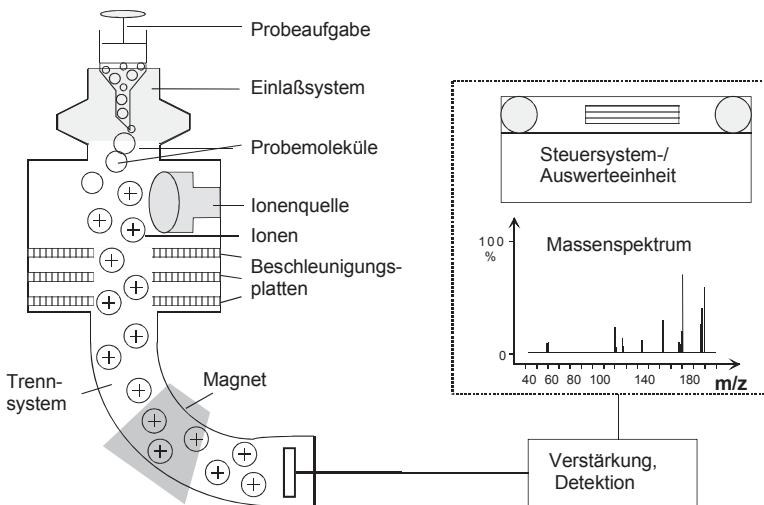


Abb. 11.2 Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers-I

11.1.1 Einlasssystem

Die meisten Proben können ohne aufwendige Vorbereitungsschritte in das unter Vakuum stehende Einlasssystem appliziert werden. In Abhängigkeit von ihrer Verdampfbarkeit wird der direkte oder indirekte Probeneinlass ausgeführt.

Beim direkten Einlass erfolgt die Injektion einer weniger gut verdampfbaren Substanz auf einen Probetteller oder mit Hilfe einer Probestange über eine Schleuse in das Vakuumsystem, wo sie z.B. durch Erhitzen verflüchtigt wird. Im Falle der DIP-Technik (*DIP: direct insertion probe*) wird ein Tiegel aus Glas oder Aluminium in einer programmiert aufheizbaren Schubstange (bis 400°C, Heizrate: 200°C/min) über eine Vakuumschleuse eingeführt. Als Proben dienen Flüssigkeiten und auch Feststoffe.

Noch höhere Temperaturen sind für die DEP-Technik (*DEP: direct evaporation probe*) anzuwenden. Dabei wird ein Draht aus Platin oder Rhenium verwendet, der in einer programmiert aufheizbaren Schubstange (1600°C, Heizrate: bis 120°C/min) eingeschleust wird. Vorteilhaft ist hier, dass die Verdampfung der Analyte schneller als ihre Zersetzung erfolgt. Andererseits kommt es bei diesen Temperaturen zur Diskriminierung von leicht flüchtigen Substanzen.

Leicht flüchtige Komponenten werden beim indirekten Einlass zuvor in einem Vorratsbehälter verdampft und gelangen als Gas in die Ionenquelle des Massenspektrometers. Nach beiden Varianten entstehen vorerst neutrale Moleküle.

Das Anlegen von Vakuum im Massenspektrometer bewirkt, dass die Sauerstoff- und Stickstoffionen aus der Luft die Probeionensignale nicht überlagern und dass Streueffekte an diesen Gasionen im Trennsystem vermieden werden.

Prädestiniert sind vor allem „gekoppelte“ Probeneinlässe ins Massenspektrometer (s. Kapitel 12.4), die für die Kapillargaschromatographie (CGC-MS), die Flüssigchromatographie (LC-MS), die Kapillarelektrophorese (CE-MS) und auch für die Superkritische Fluidchromatographie (SFC-MS, *SFC: supercritical fluid chromatography*) realisiert sind. Dies sind Kombinationen der Massenspektrometrie (MS) mit vorgesetzten Trennmethoden oder die Chromatographie/die Kapillarelektrophorese als „Einlasssysteme“ für die MS. Im Falle der Kopplungstechnik FIA-MS (*FIA: flow injection analysis*) erfolgt die Probenzufuhr ohne vorherige Trennung der Analyte.

11.1.2 Ionenquelle

Mit Hilfe einer Ionenquelle (Abbildung 11.5), die sich unmittelbar an das Einlasssystem anschließt, erfolgt die Ionisierung der Gasmoleküle in positiv oder negativ geladene Ionen, die danach weiter beschleunigt werden. Bei der harten Ionisation werden energiereiche Elektronen eingesetzt, die zur Fragmentierung der Moleküle in einzelne Bruchstücke führen. Für weiche Ionisierungsmethoden werden thermische oder elektrische Anregungen sowie energiearme Ionen oder Moleküle verwendet. Durch diese schonende Ionisierungsvarianten wird die Fragmentionsbildung vermieden. An Hand der Molekülpesks bzw. sogenannter „Quasimolekülen“ können sehr exakte Molekulargewichtsbestimmungen insbesondere von Biomolekülen erfolgen.

Einige für die Massenspektrometrie typische Ionisationsverfahren enthält Tabelle 11.1.

Tabelle 11.1 MS-Ionisationsarten (Auswahl)

MS-Ionisationsart	Ionisationsquelle	Reaktionsablauf
Elektronenstossionisation	Elektronen	$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$
Chemische Ionisation	Reagenzgasionen	$M + CH_3^+ \rightarrow MH^+ + CH_4$
Fast Atom Bombardement	Atome	$M + X \rightarrow (M + X)^+$
Sekundärionenanregung	Ionen	$M + Ar^+ \rightarrow M^+ + Ar$
Photoionisation	UV-Strahlung	$M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$

11.1.3 Trennsystem

Im Trennsystem (Massenanalysator) werden die ionisierten Moleküle nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Dafür gibt es mehrere Methoden, die sich teilweise erheblich in der Auflösung unterscheiden.

Die Auflösung R wird in der Massenspektrometrie ganz allgemein als Verhältnis der Massenzahl m_1 eines Ions „1“ zur Massendifferenz Δm eines bezüglich seiner Masse benachbarten Ions „2“ definiert (Abbildung 11.3). Anders ausgedrückt bezeichnet die Massenauflösung den minimalen Massenunterschied Δm , den zwei Ionen haben müssen, damit sie noch aufgelöst werden können. Diese Auflösung eines Massenspektrometers wird in der Einheit „Th“ (Thomson) angegeben; öfters erscheint jedoch nur das Auflösungsvermögen R . Dieses ist als Verhältnis einer Masse zum Massenunterschied der nächsten noch getrennt erscheinenden Masse ($R = m/\Delta m$) definiert. So könnte man bei einem Auflösungsvermögen von 4 000 die Peaks bei 4 000 Th und 4 001 Th noch unterscheiden. Dies betrifft auch die Peaks bei 2 000 Th und 2 000,5 Th, da nach folgender Rechnung $2\,000/(2\,000,5 - 2\,000)$ sich eine Auflösung von 4 000 ergibt. Oft werden jedoch beide Begriffe (Auflösung vs. Auflösungsvermögen) im Sprachgebrauch der analytischen Praxis nicht klar voneinander getrennt und unterschieden.

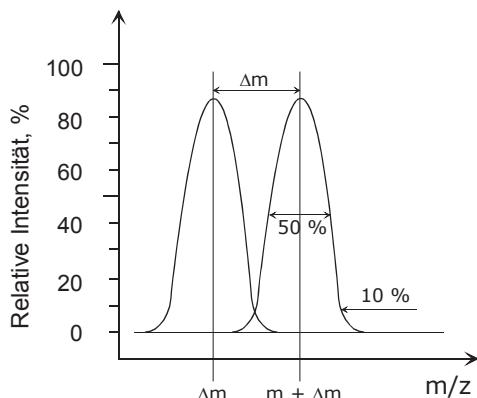


Abb. 11.3 Die Auflösung in der Massenspektrometrie (schematisch)

Es gibt zwei verschiedene Definitionen der Auflösung. Bei der 10%-Methode definiert man Δm als die Massenabweichung bei der die Intensität eines Peaks auf 10% des Maximums absinkt. Bei der Halbwertsbreitenmethode (*FWHM: full width at half maximum height*) definiert man Δm als die totale Peakbreite bei der halben Peakhöhe (Abbildung 11.3).

Prinzipien zur Massentrennung von Ionen sind u.a. die Ablenkung im Magnetfeld, die Flugzeit-, die Ion-Trap- und die Cyclotron-Resonanz-Methode.

11.1.4 Detektor („Auffänger“)

Der Detektor registriert im Massenspektrum die nach Masse-zu-Ladung getrennten Ionen. Als Detektoren dienen meist der Photomultiplier, der SEV (Sekundärelektronenvervielfacher) oder der Faraday-Auffänger. Der SEV wird in Kombination mit einer *Konversionsdynode* verwendet, bei der die Ionen aufgrund einer angelegten hohen Beschleunigungsspannung (bis zu 25 kV) auf eine Metalloberfläche prallen und der SEV dann die freiwerdenden Elektronen detektiert.

Außerdem werden auch Daly-Detektoren, Mikrokanalplatten und Channeltrons verwendet. In der Anfangszeit der MS wurden auch Fotoplatten benutzt.

Bei der Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-MS (*FT-ICR: fourier transformation – ion cyclotron resonance*) und der Orbitrap Massenspektrometrie erfolgt die Messung von Strömen („image-currents“), die durch die sich bewegenden Ionenpakete in den Detektorplatten zustande kommen. Hier werden die Ionen nicht vom Detektor absorbiert und können deshalb mehrfach gemessen werden. Das trägt entscheidend zu einer hohen Messgenauigkeit dieser Instrumente bei.

11.1.5 Massenspektrum

Das Ergebnis einer massenspektrometrischen Analyse ist das in der Regel in Strichform aufgezeichnete Massenspektrum, in dem ein Signal (relative Intensität in %) gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetragen ist (Abbildung 11.4).

Neben dem Molekülpeak M werden charakteristische Bruchstücke nach einer Fragmentierung (Fragmentionenpeaks) eines Moleküls an Hand der erhaltenen Massenzahlen zugeordnet. Bei weichen Ionisierungen resultieren sogenannte Quasimolekülionen. Zu beachten sind auch Signalverteilung und -intensitäten in der Isotopenanalytik.

Innerhalb der Massenspektrometrie kommen für das Erreichen unterschiedlicher analytischer Ziele bzw. für die Lösung spezieller Fragestellungen (z.B. Massenverteilung, niedrige Nachweisgrenzen) verschiedene Aufnahmetechniken zum Einsatz. Beim SCAN-Modus werden in kurzen Abständen (0.5 bis 1 sec) Spektren aufgenommen. Der Massenbereich wird dabei so eingestellt, dass alle Molekül- bzw. Fragmentionen registriert werden (typisch z.B. für die GC-MS-Kopplung sind Massenbereiche zwischen 40 und 400 Dalton). Aus derartigen „Vollspektren“ lässt sich auch durch Summieren der einzelnen Fragmentintensitäten der Totalionenstrom (*TIC: total ion current*) ermitteln, der dem Signal eines Flammenionisationsdetektors (s. Abschnitt 6.3.5.1) entspricht. Dadurch resultiert aus der GC-MS-Analyse ein normales Chromatogramm.

Bei der Aufnahmen dieser Vollspektren erhält man qualitative Informationen über die Probe anhand der registrierten Ionen. Die Empfindlichkeit im SCAN-Modus ist jedoch vergleichsweise gering (NWG: ca. 1 ng).

Um die Empfindlichkeit für den Nachweis der einzelnen Analyte zu erhöhen, werden Molekülpeaks oder spezifische Fragmente selektiv ausgewählt und das MS wird im sogenannten SIM-Modus (*SIM: single/selected ion monitoring*) betrieben.

Zur weiteren Gewährleistung einer ausreichenden Selektivität erfolgt hier die Messung mehrerer charakteristischer Ionen/Fragmente. Bei Quadrupol- und Ion-Trap-Geräten ist das Springen zwischen den einzelnen Massen ohne weiteres leicht möglich. Bei Sektorfeldgeräten bringt jedoch eine sprunghafte Veränderung des Magnetfeldes erhebliche Probleme mit sich. So verhindert die Selbstinduktion des Magneten ein schnelles und genaues Springen. Hier muss man auf die Änderung der Beschleunigungsspannung ausweichen. Im SIM-Modus erfolgt ein deutlicher Empfindlichkeitsgewinn um den Faktor 100 bis 1 000. Damit werden Nachweisgrenzen um 1–10 pg und in Ausnahmefällen auch im fg-Bereich erzielt.

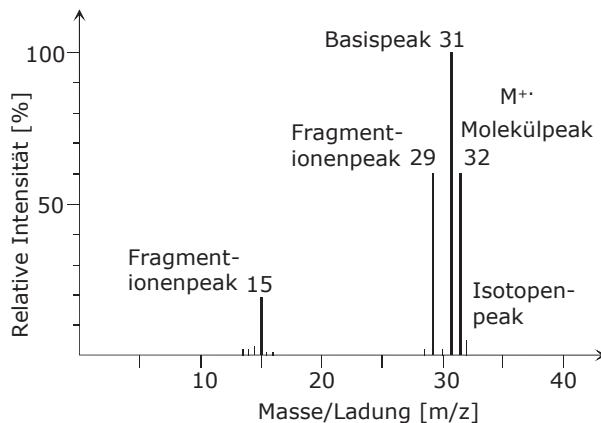


Abb. 11.4 Massenspektrum von Methanol (schematisch)

Bei der Analyse eines strukturell wenig kompliziert aufgebauten Methanolmoleküls liegt der Molekülpeak bei der Massenzahl 32 (Abbildung 11.4). Dies entspricht der Molekülmasse bzw. der Summenformel der Verbindung.

Fragmentionenpeaks werden bei 15 (Methylgruppe bzw. Abspaltung der OH-Gruppe) und bei 29 (Wasserstoffabspaltung) registriert.

Vergleiche zwischen einer harten und weichen Ionisation am Beispiel von Mannose zeigen die Spektren in den Abbildungen 11.14 und 11.15.

Weitere „spezielle Massenspektren“ einschließlich ihrer Interpretation und Diskussion sind in den Abschnitten 15.5.3 (Abbildung 15.43: Thiolspecies), 15.9.2.2 (Abbildung 15.84: Fettsäuren) und vor allem im Abschnitt 15.12 (Glycan-Strukturen) aufgeführt.

11.2 Harte Ionisationsarten

Die Struktur des Massenspektrums wird entscheidend von der angewandten Ionisationsart geprägt. Massenspektrometer beinhalten mehrere Varianten der Ionisation. Man unterscheidet zwischen sogenannten Gasphasenquellen (Elektronenstoßionisation, chemische Ionisation, Feldionisation) und Desorptionsquellen wie Felddesorption, Fast Atom Bombardement und der MALDI-Methode sowie zwischen weicher und harter Ionisation.

Harte Ionisationsmethoden sind durch zahlreiche Fragmentionen gekennzeichnet und zeigen im Molekülionenbereich im Gegensatz zu weichen Ionisationsformen nur geringe Ionenausbeuten (Tabelle 11.2).

Die Elektronenstoßionisation (EI: *electron impact*) ist das klassische Ionisierungsverfahren in der Massenspektrometrie. Es gehört zu den sogenannten „harten“ Ionisierungstechniken, da die Moleküle in einzelne Bruchstücke fragmentiert werden. Dies erfolgt durch Elektronenbeschuss der Moleküle, kann aber auch bereits bei der Verdampfung der Moleküle eintreten.

Die Probemoleküle werden nach ihrer Verdampfung in eine Ionenquelle (Abbildung 11.5) überführt. Mit Hilfe von Elektronen, die von einer Glühkathode (Heizdraht) aus emittieren und die durch eine angelegte Spannung von ca. 70 eV beschleunigt werden, erfolgt die Ionisation.

Dabei treten die Elektronen mit der Elektronenhülle der Probemoleküle in Wechselwirkung, wodurch Elektronen aus dem Molekülverband herausgeschlagen werden und positiv geladene Molekülionen entstehen.

Die angewandte Energie von 70 eV ist so hoch, dass diese Molekülionen in Schwingungen versetzt werden, was zur Fragmentierung der Moleküle führt. Weitere Ionenbildungsprozesse, die bei der EI-Technik auftreten können, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

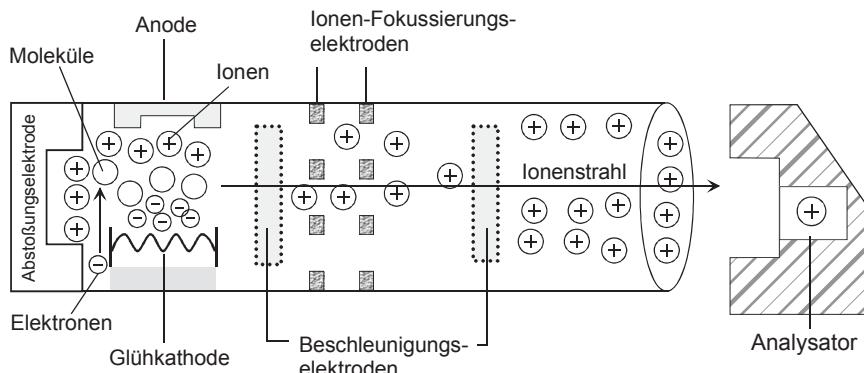


Abb. 11.5 Prinzipielle Funktionsweise einer Ionenquelle in der EI-Technik

Tabelle 11.2 Reaktionen der Ionenbildung in der EI-Technik

Bezeichnung	Ionenbildungsreaktionen
Elektroneneinfang	$\text{XYZ} + \text{e}^- \rightarrow \text{XYZ}^-$
Ionisation	$\text{XYZ} + \text{e}^- \rightarrow \text{XYZ}^+ + 2\text{e}^-$
Umlagerung	$\text{XYZ} + \text{e}^- \rightarrow \text{XY}^+ + \text{C}^\circ + 2\text{e}^-$
Anregung	$\text{XYZ} + \text{e}^- \rightarrow \text{XYZ}^* + \text{e}^-$

11.3 Weiche Ionisationen

Weiche Ionisationen bewirken keine oder nur geringe Molekülionenfragmentierungen. Auch hochmolekulare Biomoleküle wie Proteine oder Glycoproteine bleiben in ihrer Struktur erhalten. An Hand des Molekülpeaks und sogenannter „Quasimolekülionen“ einer Substanz erfolgt die Zuordnung des Molekulargewichtes. Die in Tabelle 11.3 aufgeführten Reaktionen ergeben Quasimolekülionen.

Spezielle Fragmentierungs-Möglichkeiten mittels MALDI-PSD-TOF-MS sind Gegenstand von Abschnitt 11.7.1 und vor allem von Abschnitt 15.12.2.5 (s. Abbildungen 15.107 bis 15.109).

Tabelle 11.3 Bildungsprozesse von Quasimolekülionen

Bezeichnung	Reaktionsablauf
Protonierung	$M + H^+ \rightarrow [M + H]^+$
Deprotonierung	$M \rightarrow [M - H]^+ + H^+$
Kationisierung	$M + K^+ \rightarrow [M + K]^+ \quad (K, Na)$
Hybridabstraktion	$M \rightarrow [M - H]^+ + H^-$

11.3.1 Thermospray Ionisation

Bei dieser Variante (TSI: *thermospray ionisation*) wird die mobile Phase mit Probemolekülen aus einer HPLC-Säule in eine sich daran anschließende Kapillare geleitet, die auf ca. 180°C aufgeheizt ist und sich in einer unter Vakuum stehenden Ionenquelle befindet. Diese Bedingungen bewirken, dass die aus der Kapillare austretende Flüssigkeit aerosolartig in die Ionenquelle gesprührt und eine Lösungsmittelreduzierung im Vakuum erfolgt. Der mobilen Phase wird vor oder nach der HPLC-Säule bevorzugt Ammoniumacetat als flüchtiger Elektrolyt zugesetzt, so dass Quasimolekülionen nach folgenden Reaktionen entstehen:



11.3.2 Chemische Ionisation

Bei der Chemischen Ionisation (CI: *chemical ionisation*) wird in der Ionenquelle (Abbildung 11.5) zu den thermisch verdampften Probemolekülen ein Überschuss an Reaktantgas hinzugefügt, das durch Elektronenbeschuss ionisiert wird. Dadurch resultiert ein erhöhter Druck in der Ionenquelle. Um diesen aufrecht zu erhalten, muss die Elektroneneintrittsöffnung und die Ionenaustrittsöffnung verkleinert und die Pumpenleistung des Vakuumsystems erhöht werden.

Die infolge des Elektronenbeschusses gebildeten Primärionen des Reaktantgases reagieren durch eine Serie von Stößen mit weiteren Reaktantgasmolekülen zu den eigentlich ionisierend wirkenden stabilen Ionen (CI-Plasmaionen). Als Reaktionsgase dienen z.B. Ammoniak oder Methan. Als Ionenmolekülreaktionen treten u.a. Protonierung oder Hybridabstraktion auf. Das Prinzip und der Aufbau der chemischen Ionisationsmethode sind in der Abb 11.6 dargestellt.

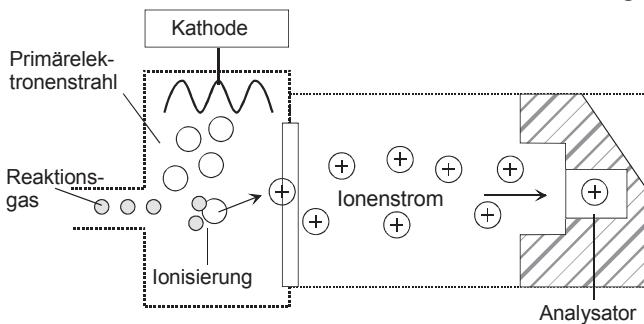


Abb. 11.6 Prinzip der chemischen Ionisation

11.3.3 Fast Atom Bombardement

Bei der FAB-Technik (Bombardierung – „*Sputtering*“ – mit energiereichen Atomen) wird die zu analysierende Probe in einer schwer flüchtigen Flüssigkeit (Glycerin) gelöst und auf einem Metallteller (Target) in die Ionenquelle eingeschleust.

Dort erfolgt die Bombardierung dieser Lösung mit energiereichen Ionen wie Argon oder Xenon. Dabei entstehen Glycerincluster ($[\text{Glycerin}_x \text{ (}x=1,2,\dots\text{)} + \text{H}]^+$) und die Quasimolekülionen ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Die schonende FAB-Technik ist insbesondere zur Bestimmung der Molekülionen von Peptiden und Proteinen sowie von charakteristischen Fragmentpeaks innerhalb der Strukturaufklärung von Glycanen (Abschnitt 15.12/15.12.2.2) gut geeignet.

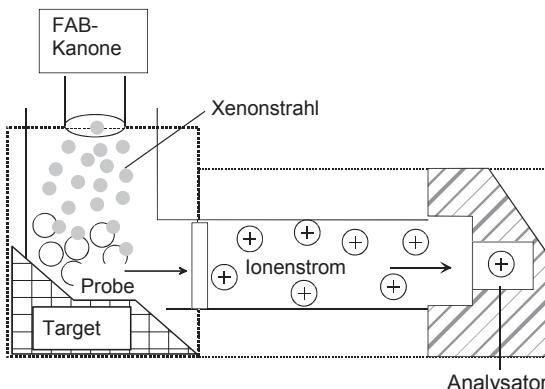


Abb. 11.7 Prinzip der FAB-Technik

11.3.4 Feldionisation

Bei der Feldionisation (FI), die eine weitere „weiche“ Ionisationsmethode (s. Abbildung 11.8) darstellt, wird ein sogenannter Emitter eingesetzt und aktiviert.

Bei der Aktivierung werden feine borstenartige Kohlenstoffnadeln ausgebildet. Dies erfolgt durch einen pyrolytischen Vorgang, der in einer Benzonitrilatmosphäre mit einem Partialdruck von ca. 80 Pa und unter hoher Spannung an einem bis zur Weißglut aufgeheizten Wolframfaden stattfindet. Die Probe wird auf einer Schubstange in die Ionenquelle eingebracht und verdampft. Die Ionisation der Probemoleküle erfolgt unmittelbar vor den Kohlenstoffnadeln durch Tunneln von Elektroden („quantenmechanischer Tunneleffekt“).

Im Massenspektrum werden meist Molekülionen $[M^+]$ und nur zum geringen Teil Quasimolekülionen registriert.

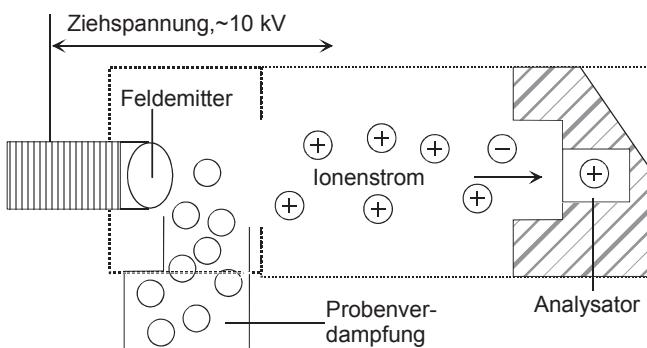


Abb. 11.8 Prinzip der Feldionisation

11.3.5 Felddesorption

Die Ionisation von Molekülen mittels Felddesorption (FD) beruht auf dem Prinzip einer Desorptionsquelle und ist mit der Feldionisation vergleichbar. Im Unterschied zu dieser erfolgt die Probeaufgabe durch direktes Eintauchen des Emitters in die Substanzlösung. Danach wird der präparierte Emitter auf einer Schubstange in die Ionenquelle eingeschleust. Die Desorption der Probeionen erfolgt durch Aufheizen im elektrischen Feld zwischen Emitter und einer Gegenelektrode. Die Massenspektren, in denen neben Molekül- auch Quasimolekülionen registriert werden, sind gegenüber der Feldionisation komplexer zusammengesetzt.

11.3.6 Electrospray

Die früher verwendete Bezeichnung Ionenspray und der Begriff „Electrospray“ (ESI: *electrospray ionisation*) stehen für weiche Ionisationsarten, die vom Prinzip her identisch sind. Die Probemoleküle einer Flüssigkeit werden durch eine Kapillare gefördert, die an ihrem Ausgang von einem elektrischen Feld umgeben ist.

Beim Austritt aus der Kapillare führt dies zum Versprühen und zur elektrischen Aufladung (Ionisierung) der Probemoleküle. Die Ausbeute und damit die Nachweisbarkeit der Ionen ist um so größer, je mehr ionisierte Tröpfchen dabei entstehen. Bei der Ionen-Spraytechnik wird zusätzlich ein Stickstoffstrom zugeführt, der eine Vergrößerung der Tröpfchenanzahl bewirkt.

Elektrospray wird hauptsächlich als Ionsierungstechnik bzw. als Interface in der LC-MS-Kopplung (s. Abschnitt 12.4.2.3) eingesetzt.

11.3.7 Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck

Die Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (*APCI: atmospheric pressure chemical ionisation*) ist in ihrer Funktionsweise dem Electrospray ähnlich. Beim APCI wird die Lösung des Analyten **vor** der Ionisation verdampft. Die Ionisierung der Lösemittelmoleküle erfolgt hier an einer spitzen Elektrode unter Atmosphärendruck. Die APCI-Methode ist auch für Analyten recht gut geeignet, die weniger polar sind. Die Kombination mit der Flüssigchromatographie „LC–Atmosphärendruck–MS“ wird im Kapitel 12.4.2.2 näher beschrieben.

11.3.8 Atmosphärendruck Photoionisation

Eine andere Art der Ionisation unter Atmosphärendruck wird durch Photonen erzielt (*APPI: atmospheric pressure photoionisation*). Die mobile Phase (Eluent) wird zuerst verdampft und anschließend durch Photonen ionisiert. Diese werden dabei von einer Entladungslampe senkrecht zum Molekülstrahl ausgesandt. Die APPI-Methode wird meist in Verbindung mit der Flüssigchromatographie eingesetzt. Ihre Anwendungen sind bisher relativ gering, weshalb auch diese Ionisierung unter den Kopplungstechniken (Kapitel 12.) nicht weiter besprochen wird.

11.3.9 Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation

Diese Methode (*MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionisation*) vervollständigt die Ionisierungsmethoden in der Massenspektrometrie. Hier erfolgt das Abdampfen und anschließende Ionisieren des Analyten von einem Feststoff mit gepulstem Laserlicht (zum Beispiel Stickstofflaser bei 337 nm). Bei MALDI wird der Analyt mit einem großen Überschuss an Matrix gemischt und darin kristallisiert. Diese Matrix hat die Eigenschaft bei der verwendeten Laserwellenlänge Energie zu absorbieren. Beim Beschuss durch den Laser kommt es zum Herauslösen des intakten Analyten, an dem z.B. ein Proton aus der Matrix gebunden ist. Dadurch werden sogenannte Quasimolekülionen erzeugt.

Auf Grund ihrer herausragenden Bedeutung vor allem für die Bioanalytik von Peptiden und Proteinen wird die MALDI-Methode bzw. MALDI-TOF-MS im gesonderten Kapitel 11.7 ausführlicher dargestellt.

11.4 Spektrometertypen

Von besondere Bedeutung für das Massenspektrometer ist sein Trennsystem (Analysator), dass wie die Trennsäule in den Hochleistungstrenntechniken als „Herzstück“ der Apparatur betrachtet wird.

11.4.1 Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer

Diese Art von Massenspektometern ist weit verbreitet. Grundlage der Probeionentrennung nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis ist ihre Ablenkung in einem magnetischen Feld, wie dies in Abbildung 11.2 bereits gezeigt wurde. Aus der Darstellung ist ersichtlich, dass nach erfolgter Ionisierung die Moleküle mit Hilfe von Beschleunigungsplatten auf hohe Geschwindigkeiten gebracht werden. Das erfolgt durch Umwandlung der in einem elektrischen Feld von einigen Kilovolt erzeugten potentiellen Energie in kinetische Energie. Die beschleunigten Ionen gelangen in das Magnetfeld, in dem sie durch die Lorenzkraft auf eine Kreisbahn gelenkt werden. Dabei ist die Bewegung, die durch die Zentrifugalkraft F_Z (11.1) entsteht, der Lorenzkraft F_L (11.2) in einem bestimmten Mass entgegen gerichtet.

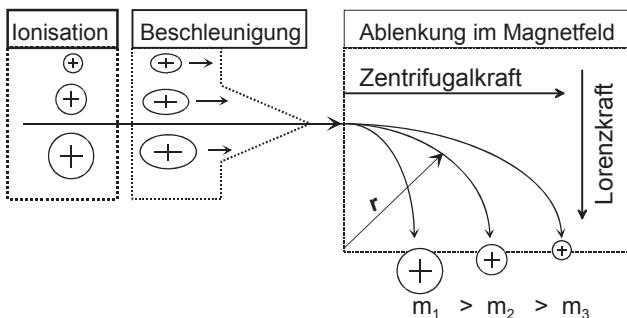


Abb. 11.9 Prinzip der Ionentrennung im Magnetfeld

$$F_Z = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (11.1)$$

F_Z ist proportional der Masse m des Ions und dem Quadrat seiner Geschwindigkeit v und indirekt dem Radius r der Flugbahn.

$$F_L = e \cdot v \cdot H \quad (11.2)$$

F_L ist direkt proportional der Elementarladung e ($e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ C) und der Geschwindigkeit des Ions sowie der angelegten Magnetfeldstärke H .

Beide Kräfte gelangen in einen Gleichgewichtszustand, dessen mathematischer Zusammenhang aus folgender Gleichung hervorgeht:

$$\frac{m \cdot v^2}{r} = e \cdot v \cdot H \quad (11.3)$$

Schwere Ionen werden bei konstanten Magnetfeldbedingungen auf kleinere und Ionen geringerer Massen auf größere Kreisbahnen abgelenkt. Ionen mit identischem Masse-zu-Ladungsverhältnis befinden sich auf identischen Flugbahnen und werden am gleichen Punkt des Detektors registriert.

Durch die magnetische Sektorfeldtechnik werden die Flugbahnen von Ionen mit unterschiedlicher Masse im Magnetfeld so „gesteuert“, dass sie auch am gleichen Detektionspunkt ankommen. Das gelingt mit Hilfe der Variation der Magnetfeldstärke H und der Beschleunigungsspannung U . Ihre Abhängigkeit von der Masse m und Geschwindigkeit v der Ionen geht aus Gleichung 11.4 hervor.

$$e \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (11.4)$$

Durch Auflösen dieser Gleichung nach v und Einsetzen in Gleichung 11.1 wird die folgende Beziehung erhalten.

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 \cdot r^2}{2 \cdot U} \quad (11.5)$$

Durch Scannen von U oder H erfolgt die Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis im magnetischen Sektorfeld. Die Größeneinstellung von Ein- und Austrittsspalt ist variabel. Je kleiner die Öffnungen sind, um so größer ist die Auflösung der Ionentrennung.

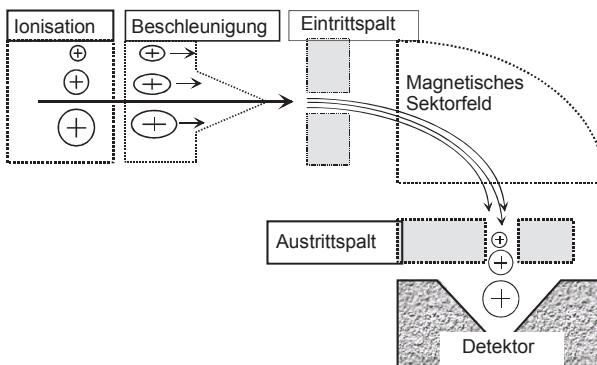


Abb. 11.10 Prinzip der Ionentrennung im magnetischen Sektorfeld

11.4.2 Flugzeitmassenspektrometer

Bei der MS-Technik „TOF“ (*time of flight*) werden die Flugzeiten von verschiedenen schweren Ionen für ihre Trennung ausgenutzt. Die Flugrohr-Länge beträgt bis 2 Meter, die Flugzeit der Ionen liegt im Bereich von wenigen Mikrosekunden. Leichte Ionen fliegen schneller als schwere und erreichen zuerst den Massendetektor. Der Massenbereich ist relativ unbegrenzt, weshalb man diese MS-Geräte auch bevorzugt zur Molekulargewichtsbestimmung von Biomolekülen einsetzt.

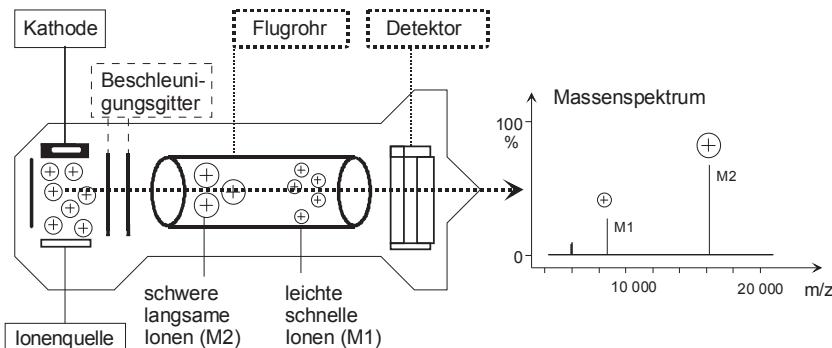


Abb. 11.11 Prinzip des Flugzeitmassenspektrometers

11.4.3 Quadrupolmassenspektrometer

Aufbau und Funktion von Quadrupolen werden noch genauer innerhalb der Kopp lung ICP-MS im Kapitel 9.4.4 dargestellt. In der entsprechenden Abbildung 9.21 wird speziell auf diese Anordnung eingegangen.

Bei diesem Gerätetyp sind vier gegenüberliegende Magnetstäbe angeordnet. Zwei sind mit positivem und zwei mit negativem Spannungspotential belegt. Es wird auch eine Hochfrequenzwechselspannung im Winkel von 180° zu den Magnetpaaren angelegt. In der Mitte der Magneten „fließt“ der Ionenstrom, der durch Änderung von Spannung und Frequenz gesteuert wird. Beide werden bei dieser Technik so gewählt, dass Ionen mit gleicher Masse auf einer entsprechenden Bahn zum Detektor gelangen. Quadrupolmassenspektrometer sind leicht handhabbar und zeichnen sich durch hohe Empfindlichkeit und Robustheit aus.

11.4.4 Ionenfallen-Massenspektrometer

Die Ionen aus der Quelle gelangen in eine Ionenfalle (*ion trap*), werden dort in einem Quadrupolfeld „gefangen“ gehalten und werden später zum Detektor über führt (Abbildung 11.12).

Je nach Art der einwirkenden Felder können einerseits nur Ionen einer bestimmten Masse „gefangen“ gehalten werden. Andererseits kann man aber auch alle Ionen in der Falle vorrätig halten und durch geeignete Veränderung der Felder die Ionen mit einer bestimmten Masse dazu bringen, die Ionenfalle zu verlassen. Bei dieser Arbeitsweise ist es möglich, gezielt den Vorrat der Ionen massenaufgetrennt zu scannen. Die Ionenfalle besteht aus drei Elektroden, einer torusförmigen Elektrode und zwei hyperbolischen Deckkappen. Die Deckkappen haben jeweils ein Loch für den Eintritt und den Austritt der Ionen. Die Ionenfalle ist mit Helium (ca. 10^{-4} mbar) gefüllt.

Dadurch wird die Massenauflösung eines „ion trap“ drastisch verbessert. Der Grund ist, dass sich die Ionen – bedingt durch bremsende Stoßprozesse – mit Helium in einem engeren Raum im Zentrum der Ionenfalle aufhalten.

Vorteile der Ionenfalle liegen in der Möglichkeit „Mehrfach-Stoßexperimente“ durchzuführen und im besseren Signal-Rauschverhältnis der Messung. So können mit einem „ion trap“ bis zu 12 Stoßexperimente hintereinander durchgeführt werden (MS^{12}). Außerdem sind Ion-Trap-Geräte sehr kompakt und sehr empfindlich. Der Massenbereich erstreckt sich bis etwa $m/z = 70\,000$.

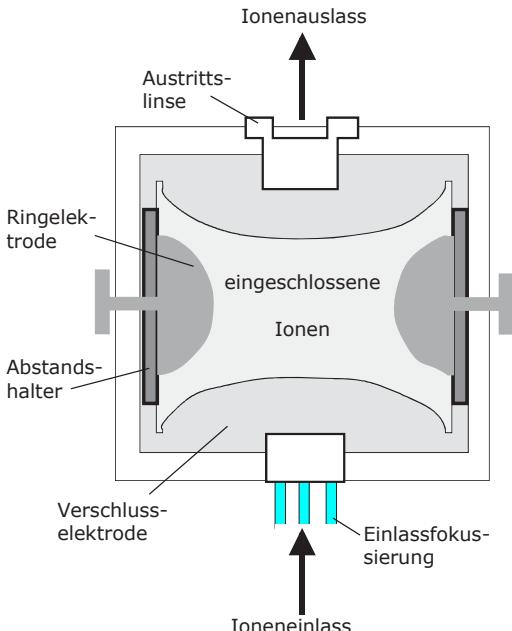


Abb. 11.12 Prinzip der Ionenfalle

11.4.5 Tandemmassenspektrometer

In diesem MS-Gerätetyp sind zwei Massenspektrometer hintereinander gekoppelt. Im ersten erfolgt die Aufnahme des Spektrums der Probesubstanz nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Daraus wird ein bestimmtes Ionenbündel ausgewählt und in eine Stoßkammer (Reaktionszone) überführt, in der es durch ein Inertgas energetisch angeregt wird. Von den resultierenden Fragmentionen wird ein zweites Massenspektrum erzeugt, in dem ein ausgewähltes Ion mit höherer Empfindlichkeit registriert wird.

Weitere methodische Details zur Tandemmassenspektrometrie sind im Kapitel 12.3.5 MS-MS (Kopplungstechniken: Trennmethode/Trennmethode) enthalten.

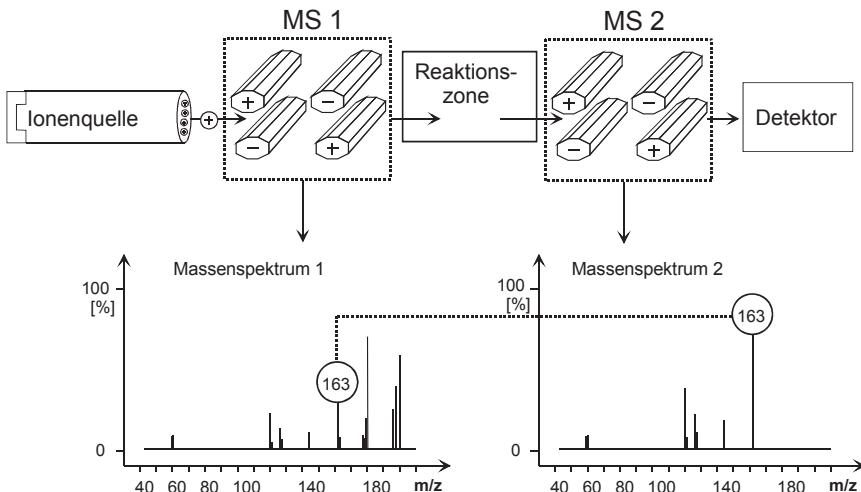


Abb. 11.13 Prinzip der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

11.5 Spektrenvergleich: harte vs. weiche Ionisation

Am Beispiel von Mannose, die zu den Monosaccharid-Species von Glycoproteinen (s. Abschnitt 2.3) gehört, werden beide Ionisationsarten gegenübergestellt. Als harte Ionisation wurde die Elektronenstoßionisation (EI) ausgewählt.

Der Molekülpeak für Mannose liegt bei 180. Das Spektrum in Abbildung 11.14 zeigt, dass deutliche Peaks nur in Massenbereichen unter 80 registriert werden. Dies verdeutlicht die intensive Fragmentierung des Moleküls in untypische Bruchstücke. Typische Fragmentionen werden mit einem Reflektor-TOF-MS-Gerät (Abschnitte 11.7.1 und 15.12.2.5) erhalten.

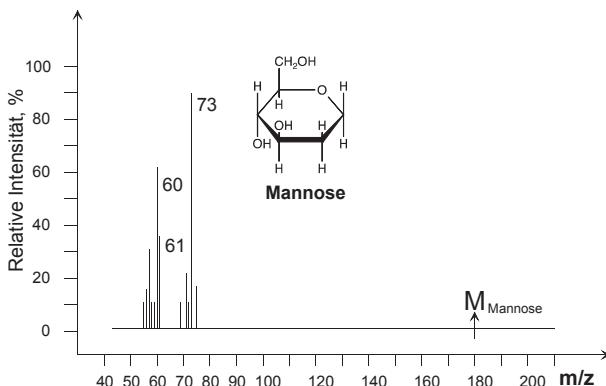


Abb. 11.14 Elektronenstoßionisation (schematisch)

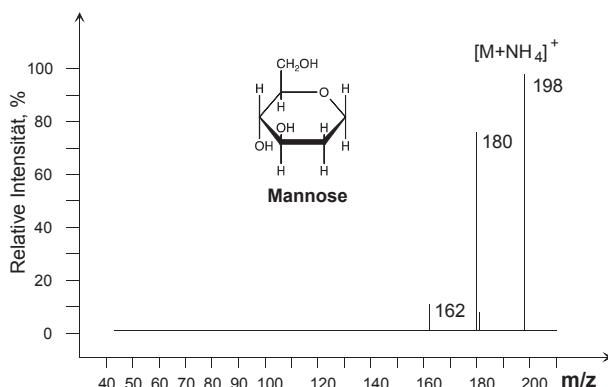


Abb. 11.15 Chemische Ionisation mit Ammoniak (schematisch)

Bei einer weichen Ionisationstechnik kommen fast keine Fragmentierungen vor. Am Beispiel der chemischen Ionisation von Mannose (Abbildung 11.15) werden im Massenspektrometer zwei Hauptpeaks registriert.

Bei einer Massenzahl von 180 erscheint der Molekülpeak und bei 198 tritt ein intensiver Quasimolekülionenpeak auf, der durch die Anlagerung von NH₄⁺-Ionen an die Mannose entsteht. Die weichen Ionisationstechniken werden insbesondere für hochmolekulare (Bio)moleküle angewandt.

11.6 Fragmentierungen in der Massenspektrometrie

Fragmentierungen (Spaltungen von Molekülen in kleinere Bruchstücke) sind oft mit Umlagerungen wie z.B. Wasserstoffverschiebungen verbunden. Sie laufen meist nach (schnellen) homolytischen Bindungsspaltungen ab. Die Umlagerungsprozesse sind energetisch günstige und auch langsame Reaktionen, da das Molekül eine bestimmte Geometrie einnehmen muss. Sie können über sehr große Entfernung („long range rearrangement“) stattfinden.

Einige in der Massenspektrometrie weitverbreitete Molekülspaltungs- und Umlagerungsreaktionen werden anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

a) Benzylspaltung

Unter dieser Bezeichnung versteht man die homolytische Spaltung einer Bindung. Dabei erfolgt die Ausbildung eines Kations (Tropylium-Kation, Abbildung 11.16), das durch ein aromatisches System stabilisiert wird. Die Benzylspaltung wird auch dann angewandt, wenn der Aromat kein Phenylring ist.

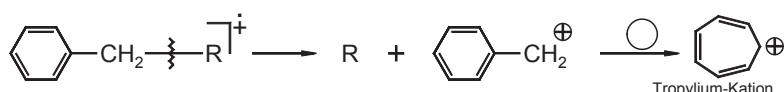


Abb. 11.16 Fragmentierung I: Benzylspaltung

b) Allyl-Spaltung

Sie ist verwandt mit der Benzylspaltung und stellt eine homolytische Fragmentierung einer Allylbindung (Abbildung 11.17) dar. Triebkraft dieser Spaltung ist auch hier die Bildung eines stabilisierten Kations.

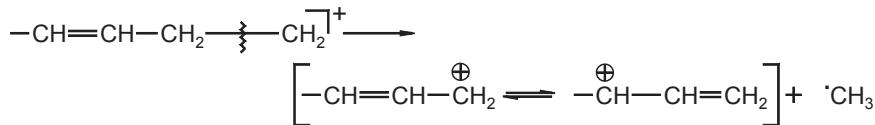


Abb. 11.17 Fragmentierung II: Allyl-Spaltung

c) Alkyl-Spaltung

Innerhalb der Alkyl-Spaltung nimmt die Stabilität von Carbokationen in der Reihenfolge $\text{CH}_3^+ < \text{RCH}_2^+ < \text{R}_2\text{CH}^+ < \text{R}_3\text{C}^+$ zu. Spaltungen an Verzweigungspunkten der Kohlenstoffkette sind demzufolge favorisiert (Abbildung 11.18). Die positive Ladung verbleibt bevorzugt am höchstsubstituierten Kohlenstoffatom.

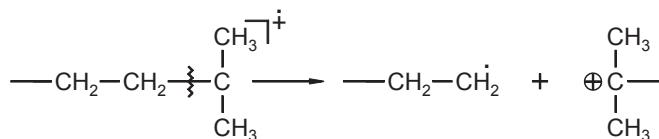


Abb. 11.18 Fragmentierung III: Alkyl-Spaltung

d) α -Spaltung

Positive Ladungen können durch benachbarte Heteroatome stabilisiert werden. In diesen Fällen wird die Bindung in α -Stellung zum Heteroatom bevorzugt gespalten. Dabei erfolgt meist die Eliminierung der schwereren Substituenten. Die α -Spaltungen (Abbildung 11.19) treten oft in Carbonyl-Verbindungen und Ethern sowie in Nachbarschaft zu Thiol-, Amino- oder Hydroxylgruppen auf.

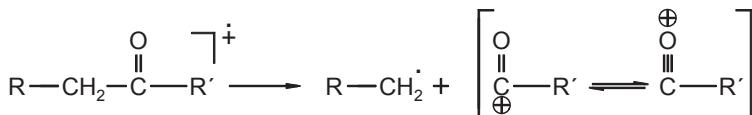


Abb. 11.19 Fragmentierung IV: α -Spaltung

e) Decarbonylierung

Der Fragmentierungsprozess der Decarbonylierung (Abbildung 11.20) ist meist eine Folgereaktion nach der α -Spaltung.



Abb. 11.20 Fragmentierung V: Decarbonylierung

f) Onium-Reaktionen

Diese Fragmentierungsprozesse sind Folgereaktionen der bei der α -Spaltung gebildeten Oxonium- oder auch Ammonium-Kationen. Bei einer Onium-Spaltung wird ein Wasserstoffatom aus einem an das Heteroatom gebundenen Rest unter Abspalten dieses Restes auf das Heteroatom übertragen.

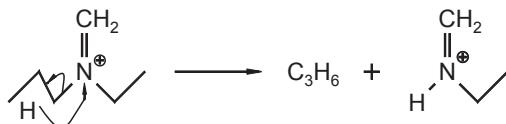


Abb. 11.21 Fragmentierung VI: Onium-Spaltung

g) Retro-Diels-Alder-Reaktion

Diese Spaltung tritt auf, wenn Sechsringe eine Doppelbindung im Molekül besitzen. Die Fragmentierung kann als eine Art Umkehrung der Diels-Alder-Reaktion aufgefasst werden, jedoch entsteht hier eine Radikal-Kation (Abbildung 11.22).

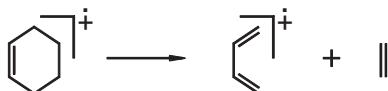


Abb. 11.22 Fragmentierung VII: Retro-Diels-Alder-Reaktion

h) McLafferty-Umlagerung

Bei dieser Umlagerungsreaktion wird ein Wasserstoffatom über einen „Sechsring-Übergangszustand“ auf eine Doppelbindung übertragen (Abbildung 11.23). Zeitgleich erfolgt die Abspaltung eines Ethenmoleküls.

Am Beispiel des organischen Moleküls Propyldiethylamin sollen verschiedene Fragmentierungsreaktionen und das resultierende Massenspektrum dargestellt werden. Abbildung 11.83 zeigt die Struktur des Moleküls (Molekulmasse: 115).

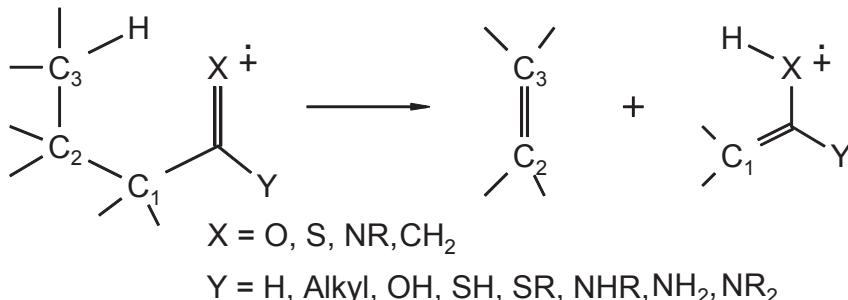


Abb. 11.23 Fragmentierung VIII: McLafferty-Umlagerung

Durch die zuerst ablaufenden α -Spaltungen werden Methyl- und Ethylgruppe vom Ausgangsmolekül eliminiert. Es entstehen Fragmentionenpeaks bei den Massenzahlen 86 und 100.

Es folgen weitere Fragmentierungsprozesse wie Onium-Reaktion und McLafferty-Umlagerung. Durch diese Reaktionen wird das Spektrum der Fragmentionenpeaks erweitert. Hinzu kommen Signale für das fragmentierte Propyldiethylamin bei 72 und 58.

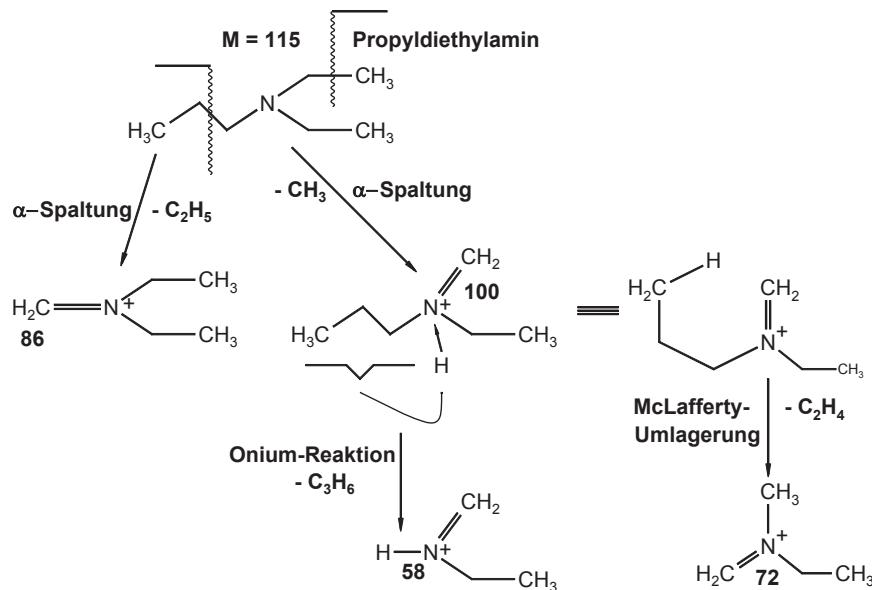


Abb. 11.24 Fragmentierung von Propyldiethylamin

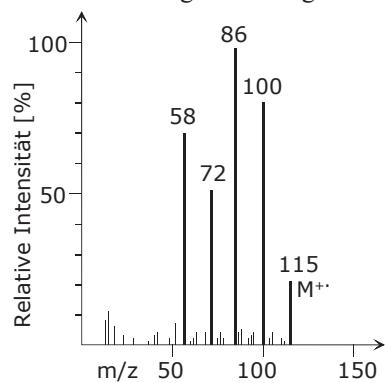


Abb. 11.25 MS von Propyldiethylamin

Nach Eliminierungen der Methyl- bzw. Ethylgruppe werden im Massenspektrum (Abb. 11.25) Fragmentionen bei Molekülmassen von 100 und 86 registriert. Durch die Onium-Reaktion und die McLafferty-Umlagerung entstehen weitere Signale bei 72 und 58. Weitere Fragmentierungen enthalten die Abb. 11.26/11.27.

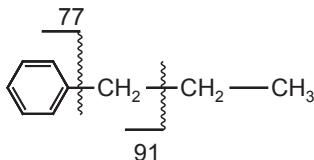
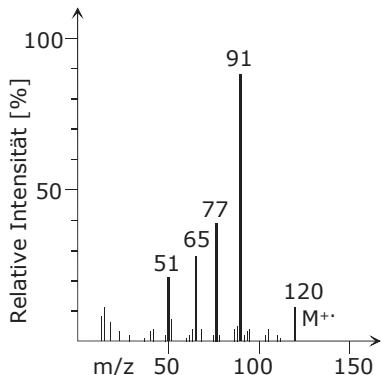


Abb. 11.26 n-Propylbenzol:
Fragmentierung und MS-Spektrum
(schematisch)

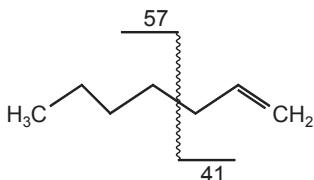
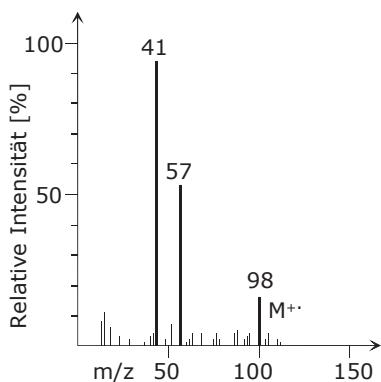


Abb. 11.27 n-Hepten: Fragmen-
tierung und MS-Spektrum (sche-
matisch)

11.7 Laser Desorptions/Ionisations - MS

Grundlage dieser sehr bewährten bioanalytischen MS-Technik mit der exakten Bezeichnung „*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation–Time of Flight–Mass Spectrometry*“ (MALDI-TOF-MS) ist die schonende Desorption und Ionisierung mittels gepulster Laserstrahlung („LDI“) von intakten Biomolekülen wie Proteinen, Glycoproteinen, Nucleotiden, Oligosacchariden und Lipiden unter Verwendung einer organischen Matrix („matrix-assisted“) in Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer („TOF“).

Der Einsatz der Massenspektrometrie zur Bestimmung von Biosubstanzen mit hohen Molekulargewichten ($> 1\,000$ Dalton) scheiterte lange Zeit daran, dass bei der Überführung von polaren, nicht flüchtigen Biomolekülen in die Gasphase erhebliche Fragmentierungen auftraten.

Dieses Defizit der Massenspektrometrie wurde durch die Entwicklung schmäler bzw. „weicher“ oder „sanfter“ Ionisierungstechniken (s. Abschnitt 11.3) behoben. Damit können hochmolekulare Gas-ioniene durch Beschuss mit energiereichen Ionen bzw. Atomen (FAB), in geladenen „Flüssigkeits-Droplets“ (Thermo-, Electrospray) oder in einem starken elektrischen Feld (Felddesorption) erzeugt werden.

Durch die Fortschritte auf dem Gebiet der Plasmadesorption (PD) und das Experimentieren mit Laserlicht wurde eine weitere „weiche“ Ionisationsart (LDI-Technik: „*Laser-Desorption/Ionisation*“) zur Erzeugung von hochmolekularen intakten Gasionen entdeckt. Zu Beginn dieser Entwicklung waren Moleküle mit kleineren Molekulargewichten von wenigen Tausend Dalton ionisierbar.

Der entscheidende Durchbruch bei der schonenden Ionisierung sehr großer Biomoleküle mit Molekulargewichten bis 100 000 und mehr gelang Karas und Hillekamp im Jahre 1988. Sie hatten beim Arbeiten mit Laserlicht beobachtet, dass eine niedrig absorbierende Substanz im Gemisch mit einer hoch absorbierenden Komponente bereits bei Energiedichten des Laserpulses ionisiert wird, die für ihre Ionisierung im reinen Zustand nicht ausreichend sein würde.

Ausgehend von dieser relativ unspektakulären, aber für die Bioanalytik großer Moleküle revolutionierenden Entdeckung, wurde letztendlich die Grundlage für die einfach und sehr schnell zu handhabende MALDI-MS gelegt, bei der Biomoleküle mit einem 1 000- bis ca. 10 000-fachen Überschuss einer organischen Substanz (z.B. Siapinsäure) gemischt und durch einen gepulsten Laserstrahl desorbiert und ionisiert werden.

Diese intakten gasförmigen Biomoleküle können mit Hilfe eines Flugzeitmassenspektrometers in fast unbegrenzt hohem Molekulargewichtsbereichen (bis ca. 500 000) mit hoher Empfindlichkeit (pmol- bis fmol-Bereich) und Genauigkeit (0,1–0,01%) analysiert werden.

Die Trennung im Massenspektrometer erfolgt nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der Molekülionen.

11.7.1 Aufbau von MALDI-TOF-MS-Geräten

Ursprünglich wurden Nd-YAD-Laser mit einer Anregungswellenlängen von 266 nm und einer Pulsdauer von ca. 10 ns zur Desorption und Ionisation der Moleküle eingesetzt. Charakteristische Parameter für die Beschleunigungsenergie waren 3 keV und für die Bestrahlungsstärke $1 \cdot 10^7$ – $5 \cdot 10^7$ W/cm². Der Laserfokus lag zwischen 10 und 50 µm.

Als weitere Anregungswellenlänge diente auch 355 nm. Es wurden auch CO₂-Laser getestet, die z.B. bei 10,6 µm im infraroten Bereich arbeiten.

Weitverbreitet sind jedoch kostengünstige Stickstoff-Laser mit einer UV-Strahlung von 337 nm und einer Frequenzdauer zwischen 2 und 100 ns.

Der Laserimpuls trifft nach dem Passieren von optischen und elektronischen Bauteilen auf ein Target, worauf sich die in eine Matrix eingebetteten Probemoleküle befinden (Abbildung 11.28, vgl. auch 12.7.2).

Die Moleküle absorbieren die Energie, werden desorbiert, ionisiert und als gasförmige Ionen in das Flugzeitmassenspektrometer überführt. Dieses kann im linearen TOF- oder Reflektor-TOF-Modus betrieben werden (Abb. 11.29 und 11.30).

Bei der linearen Anordnung fliegen die Ionen nach erfolgter Beschleunigung auf einer geraden Flugbahn von der Ionenquelle innerhalb des Flugrohrs (TOF) zum Detektor (A1 in Abbildung 11.29). Dabei werden sie nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Kleine und schnelle Ionen erreichen den Detektor zeitiger als die großen schweren Ionen.

Zu Beginn der MALDI-Technik wurden zunächst nur die intakten Molekülioßen detektiert. Von besonderem Interesse waren thermisch labile Biopolymere wie Proteine, deren Molekulargewicht im positiven (protoniertes Molekül) oder negativen Modus (deprotoniertes Molekül) bestimmt werden konnte. Nach dem Ionisierungsprozess (Bildung von Quasimolekülien) wurden keine Fragmentionen registriert. Nur die Ionen, die unmittelbar in der Ionenquelle erzeugt wurden, konnten mit Hilfe eines linearen TOF-Gerätes detektiert werden („prompte Fragmentierung“).

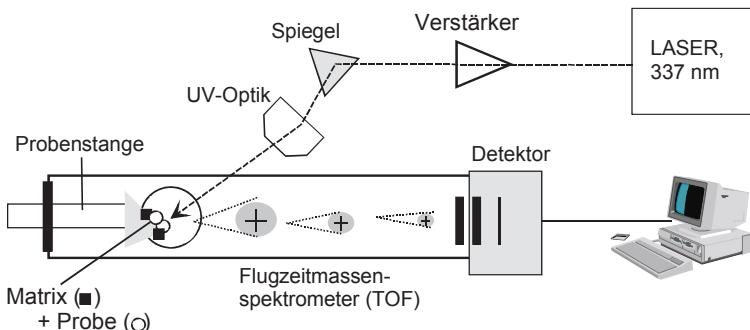


Abb. 11.28 Instrumenteller Aufbau eines MALDI-TOF-MS-Gerätes

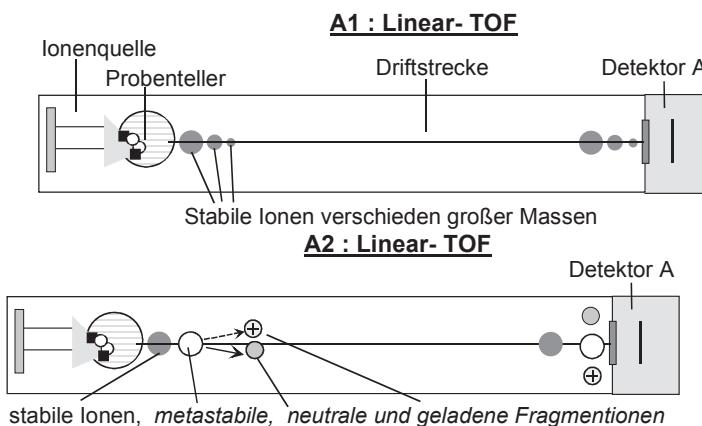


Abb. 11.29 Anordnungen beim Linearen TOF (A1 und A2)

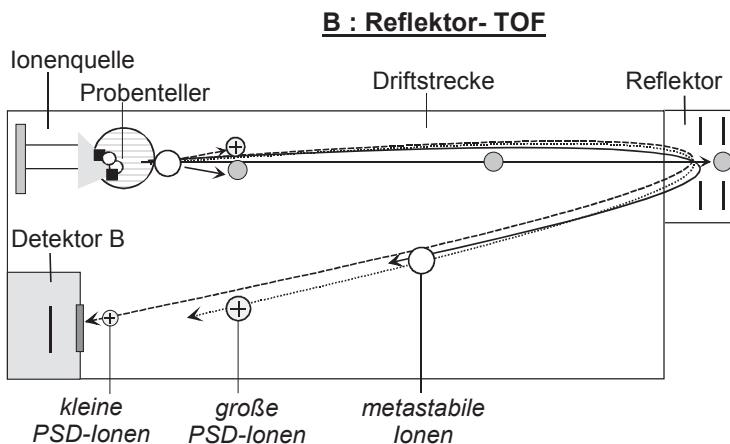


Abb. 11.30 Anordnung beim Reflektor-TOF-Gerät (B)

Erst später bemerkte man, dass die Molekülionen während des Fluges entlang der Driftstrecke im TOF-Gerät auch zerfallen können. Dies wird als „metastabile Fragmentierung“ bezeichnet, wobei aus dem metastabilen Molekülion im Normalfall ein neutrales und ein geladenes Fragmention entstehen (A2, Abbildung 11.29).

Für derartige metastabile Zerfallserscheinungen von Ionen wurde der Begriff PSD (*post source decay*) geprägt. Im linearen TOF-Gerät ist jedoch die Auf trennung dieser PSD-Ionen nicht möglich. Sie erreichen zur gleichen Zeit wie die stabilen bzw. metastabilen Ionen den Detektor (A2).

Erst durch die Entwicklung von speziellen Reflektor-Geräten konnten diese Fragmentionen getrennt und detektiert werden (Abbildung 11.30). Im Reflektor verbleiben die neutralen Fragmentionen und können mit der linearen MALDI-Technik registriert werden. Geladene Fragmentionen werden „umgelenkt“ und erreichen auf einer V-förmigen Bahn den Detektor (B). Für das „Abbremsen“ von PSD-Ionen im Reflektor, worauf die nachfolgende Trennung der Ionen basiert, dienen variable Reflektorspannungen.

Applikationen aus der Glycan-Sequenzierung werden in 15.12.2.5 demonstriert.

11.7.2 Probenpräparation

Grundprinzip der Präparationstechnik in der MALDI-Technik ist das Vermischen der Probe bzw. des Biomoleküls mit einem 10^3 bis 10^4 -fachen Überschuss der Matrixsubstanz, die außerhalb oder innerhalb des Flugzeitmassenspektrometers auf das Target aufgebracht und mit einer gepulsten Laserfrequenz bestrahlt wird.

Einige häufig eingesetzten organischen Matrixsubstanzen und die entsprechenden Laserwellenlängen sind in Tabelle 11.4 aufgeführt. Die Vorbereitungsschritte gehen aus der Abbildung 11.31 hervor.

Tabelle 11.4 Organische Matrixsubstanzen der MALDI-Technik

Matrix	Wellenlängen
Sinapinsäure	337 nm, 355 nm
DHB (2,5-Dihydroxybenzoësäure)	337 nm, 355 nm
Nicotinsäure	266 nm
α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	337 nm, 355 nm
4-Hydroxypicolinsäure	337 nm, 355 nm
Bernsteinsäure	2,94 μ m, 10,6 μ m
Glycerin	2,79 μ m, 2,94 μ m, 10,6 μ m
Harnstoff	2,79 μ m, 2,94 μ m, 10,6 μ m

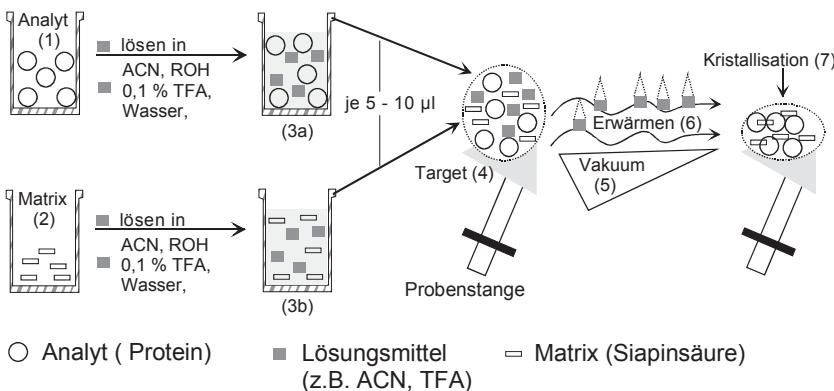


Abb. 11.31 Probenpräparation in der MALDI-Technik

Der Analyt (1), der ein kommerzielles oder aus einer biologischen Matrix isoliertes Biomolekül sein kann, wird in einem separaten Gefäß (3a) zuerst in Lösung gebracht.

Die für das Biomolekül ausgewählte organische Matrix (2) wird entsprechend in einem zweiten Gefäß (3b) aufgelöst. Von jeder Lösung werden je 5–10 μ l auf die Oberfläche des Targets (4) in Form eines Tropfens aufgetragen. Durch Anlegen eines Vakuums (5) bzw. durch vorsichtiges Erwärmen (6) werden die Lösungsmittelmoleküle von der Oberfläche des Targets schonend entfernt.

Dabei tritt ein Kristallisationsprozess (7) ein, der eine kreisförmige feste Randzone hinterlässt. Darin sind die intakten und nicht denaturierten Biomoleküle mit der organischen Matrix homogen „verschmolzen“. Die Qualität dieser „MALDI-Matrix“ insgesamt, ihre Homogenität und die meist empirische Wahl der organischen Matrix und ihrer richtigen Konzentration sind wichtige Parameter für die Güte und Zuverlässigkeit der registrierten Massenspektren.

Die organische Matrix selbst besitzt innerhalb der Prozesse der Desorption und schonenden Ionisierung der Biomoleküle eine Reihe wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften und Funktionen, die die charakteristische Bezeichnung „Matrix-unterstützte Laser Ionisation/Desorption“ besonders dokumentieren.

- (a) Die Matrix absorbiert und akkumuliert Energie aus der Laserstrahlung. Zusätzlich schützt sie auf Grund ihres eigenen Absorptionsvermögens und ihrer hohen Konzentration im Gemisch die Analyte vor Zerstörungen und Fragmentierungen im MS.
- (b) Die Matrixmoleküle übertragen Energie für die Desorption auf Analyte.
- (c) Die Matrix ist selbst an Protonen-Interaktionen und Protonen-Übergängen mit den Analytmolekülen beteiligt und überträgt die erforderliche Ionisierungsenergie. Dabei kann die Matrix sowohl Protonen aufnehmen als auch zur Verfügung stellen.
- (d) Die Matrix vermindert störende Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen untereinander und trägt zur Beseitigung von Adsorptionsphänomenen mit der Oberfläche des metallischen Targets bei.

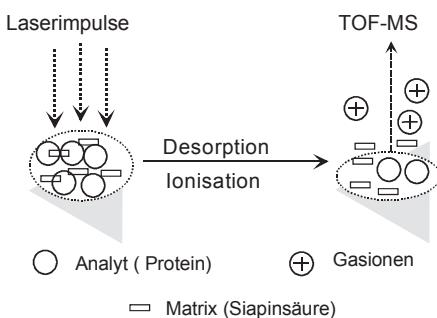


Abb. 11.32 Desorptions- und Ionisationsvorgang der Analyte

Nach der Bestrahlung des Kristallisierungsringes mit gepulstem Laserlicht erfolgt die bereits erwähnte Desorption der hochmolekularen Analyte und ihre Überführung in den gasförmigen Zustand. Durch Anlagerung von Wasserstoff- oder Alkalionen an die Biomoleküle entstehen sogenannte Quasimolekülionen wie $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$.

11.7.3 Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-MS

Diese Quasimolekülionen werden zur Ermittlung der Molekulargewichte herangezogen. Im Vergleich zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und anderen Biomolekülen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Kapitel 8.3.6) oder der Größenausschlusschromatographie (SEC, Abschnitt 5.3.2) stellt die MALDI-TOF-MS auf Grund ihrer Präzision und Einfachheit eindeutig die Methode der Wahl dar. Die Molekulargewichtsbestimmung mit MALDI-MS ist signifikant von der Molekülgröße der Substanz abhängig. Während die Massen kleiner Peptide mit einer Präzision von 0,1 bis 0,01% bestimmt werden können, ist die Genauigkeit für hochmolekulare Proteine meist kleiner als 0,1%.

Für Lysozym resultiert beispielsweise ein Molekulargewicht von 7153,7 (Abbildung 11.33).

Dagegen werden für Proteine, die glycosyliert sind (Muzine, Fetuin, Asialofetuin), sehr breite Signale im MALDI-Spektrum registriert (Abbildung 15.105 in Abschnitt 15.12.2.4). Dies ist auf die Mikroheterogenitäten der Glycoproteine zurückzuführen und vermindert auch die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung.

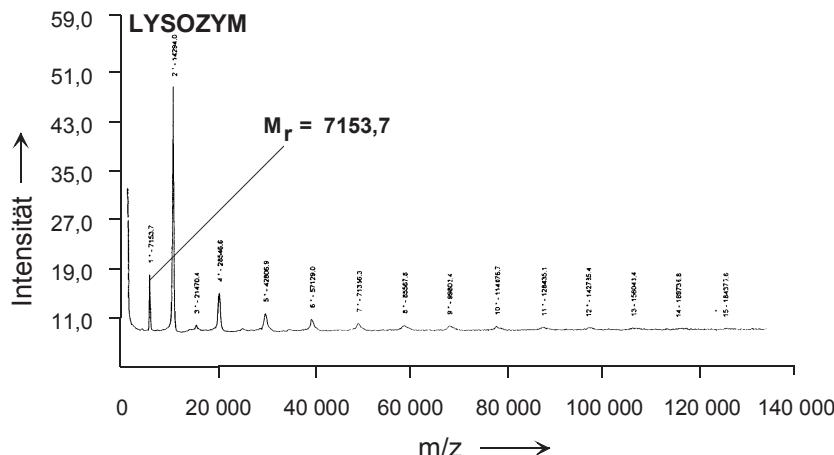


Abb. 11.33 MALDI-MS-Spektrum von Lysozym

11.8 Literatur

- Budzikiewicz H (1992) Massenspektrometrie. Eine Einführung, VCH-Verlag Weinheim
- Dawson PH (1976) Quadrupole mass spectrometry and its applications, Elsevier New York
- Gross JH (2004) Mass Spectrometry, Springer-Verlag Heidelberg
- Hillenkamp F, Karas M (1990) Methods Enzymol 193:280
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Anal Chem 60:2299
- Karas M, Bahr U, Hillenkamp F (1989) Int J Mass Spectrom Ion Proc 92:231
- Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Hillenkamp F (1989) Angew Chemie 101:805
- Lehmann WD (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- MacLafferty FW, Turecek F (1995) Interpretation von Massenspektren, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- Schröder E (1991) Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen, Springer-Verlag Heidelberg
- Waller GR, Dermer OC (1980) Biochemical applications of mass spectrometry, John Wiley & Sons New York

Wir unterscheiden uns weniger
durch die Kräfte, die wir haben,
als durch den Mut, von ihnen Gebrauch
zu machen. Auch im Geistigen.
Genialität ist Mut zu sich selbst.

Hans Kudszus

12 Kopplungstechniken

12.1 Einführung und Systematik

Synonyme und im analytischen Sprachgebrauch für Kopplungstechniken (KT) sind die Bezeichnungen „coupling techniques“ oder „hybride techniques“. Gebräuchlich ist auch „hyphenated techniques“ – also die analytischen Techniken mit einem „Bindestrich“ wie die GC-MS, LC-MS, LC-DAD oder IC-ICP-MS.

Mehrdimensionale Trennsysteme entstehen durch Kopplung mehrerer Trennsysteme, idealerweise mit orthogonalen Trennkriterien.

Die „Verbindung“ einer HPLC-Apparatur mit einem UV/VIS-Detektor oder eines Gaschromatographen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) wird hier ausdrücklich nicht als Kopplungstechnik bezeichnet. Lediglich die in Säulen getrennten Peaks werden von diesen Detektoren registriert. Im Falle der GC-MS oder LC-DAD resultieren jedoch neben der Chromatogramm-Aufzeichnung zusätzlich das Massenspektrum bzw. das UV/VIS-Spektrum für jede einzelne Komponente. Diese Verbindungen sind demzufolge Kopplungstechniken.

Die folgende Zusammenstellung (Abbildung 12.1) gibt einen ersten Überblick zu bevorzugten Kopplungstechniken in der Analytik. Das Ziel besteht vor allem darin, singuläre analytische Methoden mit hoher Aussagekraft miteinander im „On-line-Modus“ zu koppeln, um in automatisierter Arbeitsweise möglichst viele, verbesserte und genauere Informationen über die analytischen Species einer Probe zu erhalten. Auch der „Off-line-Modus“ ist in gewisser Hinsicht praktikabel und hat seinen festen Platz im analytischen Methodenspektrum.

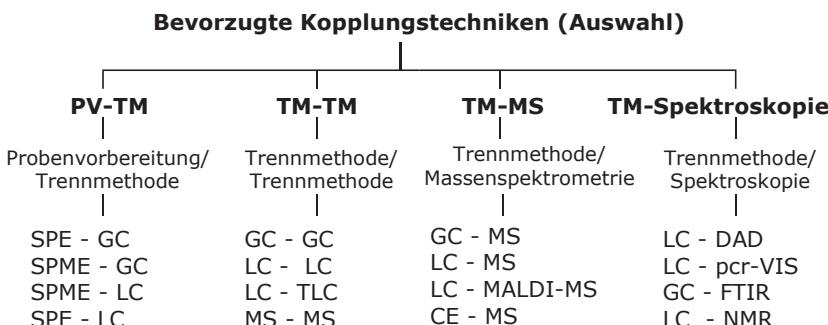


Abb. 12.1 Systematik bevorzugter Kopplungstechniken

Für fast jede analytische Methode gibt es eine oder mehrere „Kopplungen“, ungeachtet dessen, ob dies wirtschaftlich, effizient und vor allem unter Routinebedingungen auch praktikabel ist. Die meisten „hyphenated techniques“ haben allerdings das Leistungsvermögen der instrumentellen Analytik enorm vergrößert. Dies soll anhand der folgenden Beispiele etwas näher erläutert werden.

Die Kopplung einer analytischen Methoden der Probenvorbereitung (Abbildung 12.1) wie die Festphasenextraktion (SPE) oder die SPME mit einer Trennmethode (GC, LC) vereinfacht und beschleunigt vor allem die Analysenverfahren.

Die Verbindungen von Trennmethoden untereinander kann sowohl zwischen gleichartigen (GC-GC, LC-LC) als auch unterschiedlichen Trenntechniken (LC-GC, LC-TLC) erfolgen. Die Kopplung MS-MS stellt auch eine Kombination von Trennmethoden dar; sie gehört aber auch zur „Spektroskopie/Strukturanalytik“.

Favorisiert sind die Kopplungen der Trennmethoden mit der Massenspektrometrie. Für kleinere Moleküle wie Kohlenwasserstoffe/Aromaten ist die GC-MS prädestiniert. So enthalten sehr komplex zusammengesetzte fossile Rohstoffe (z.B. Erdöl und seine Fraktionen) 10^5 bis 10^6 Komponenten; im analytischen Sinne eine starke Herausforderung für die GC-MS-Techniken. Dies gilt auch für den Nachweis und die Identifizierung von Hunderten Aromastoffen. Andererseits enthalten tierische und pflanzliche Zellen etwa 10^5 verschiedene Proteine. Hier hat die Flüssigchromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie (einschließlich MALDI-MS) in den letzten Jahren die entscheidenden Fortschritte erzielt. Der „Wettlauf“ zwischen der miniaturisierten μ l-Kapillar-LC und der 2-D-Elektrophorese (IEF-SDS-PAGE) in Verbindung mit massenspektrometrischen Methoden auf dem Gebiet der Proteinanalytik (Proteomics) scheint heute noch nicht entschieden. Zweite, unabhängige Methoden sind in die Analytik stets willkommen.

Schließlich beinhaltet die 4. Gruppe (Abbildung 12.1) die Kopplungen von Trenn- und spektroskopischen Methoden. Der Dioden-Array-Detektor (DAD) zur On-line-Registrierung der UV/VIS-Spektren von flüssigchromatographisch (LC-DAD) getrennten Peaks gehört heute zum analytischen Standard, während GC-FTIR- oder auch LC-NMR-Kopplungen noch als „exotisch“ gelten; bedingt durch hohe Anschaffungskosten. Demgegenüber besitzen „Verbindungen“ der Flüssigchromatographie mit „Nachsäulenreaktionen“ („pcr“: *post column reaction*) bereits lange Traditionen. Sowohl die klassischen Aminosäure- als auch Kohlenhydratanalysatoren bedienten sich dieser Technik. Die Reaktionsprodukte sind meist farbig und werden sensitiv und selektiv im sichtbaren Spektralbereich registriert (LC-pcr-VIS). Aufgrund der chemischen Reaktion der in der Säule getrennten Analyten wird eine zusätzliche und verbesserte Information (nur ganz bestimmte Species werden umgewandelt und registriert) erhalten, die die Eingruppierung in die Kopplungstechniken im gewissen Maße rechtfertigt.

Die Kopplung ICP-MS ist Bestandteil der Atomspektroskopie (Kapitel 9). Dabei zeichnen sich die Kombinationen der Flüssigchromatographie bzw. Ionenchromatographie mit induktiv gekoppelten Plasma und der Massenspektrometrie (LC-ICP-MS, IC-ICP-MS) durch besonders interessante Applikationsgebiete aus („*Speciations-Analysen*“ von Arsen ($^{(III)}$) und As ($^{(V)}$) oder von Cr ($^{(III)}$) und Cr ($^{(VI)}$)).

12.2 Probenvorbereitung – Trennmethode

12.2.1 Head-space – GC und Purge-and-trap – GC

Die Grundlagen und Funktionsweisen beider Methoden wurden bereits im Abschnitt 3 (Präanalytische Methoden, 3.2.6 Headspace- und Purge-and-Trap-Technik) beschrieben. Sie gehören sowohl zu den analytischen Techniken der Probenvorbereitung und dienen auch als Komponenten für eine On-line-Kopplung mit der Kapillargaschromatographie. In kommerziellen Gaschromatographen sind sie integriert und gehören zum Stand der Technik.

12.2.2 SPE – GC und SPE – LC

Die methodischen Grundprinzipien und die Auswahlmöglichkeiten von entsprechenden Trennsystemen waren bereits Gegenstand der Ausführungen zur Festphasenextraktion (Kapitel 3.2.8). Die SPE kann on-line mit der Gaschromatographie (SPE-GC) oder auch mit der SFC (Superkritische Fluidchromatographie, SFC-GC) gekoppelt werden. Hier wollen wir die spezielle Kopplungstechnik der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der SPE (HPLC-SPE) näher beschreiben.

Die Abbildung 12.2 zeigt die Probenaufgabe mit Hilfe einer Dosierpumpe auf eine mit Sorbens (stationäre Phase) gefüllten SPE-Kartusche. Die Matrix der Probe – im einfachsten Falle Wasser oder ein möglichst reines Lösungsmittel – gelangt nach Passieren der Kartusche außerhalb des Systems in einen Abfallbehälter (Waste). Die Zielaalyte werden von der stationären Phase festgehalten und angereichert. Die HPLC-Trennsäule kann in dieser Zeit in einem eigenen Kreislauf mit einer mobilen Phase konditioniert werden.

Im zweiten Schritt (Abbildung 12.3) erfolgt das Umschalten der Ventile, so dass jetzt die SPE-Kartusche mit Helium getrocknet wird.

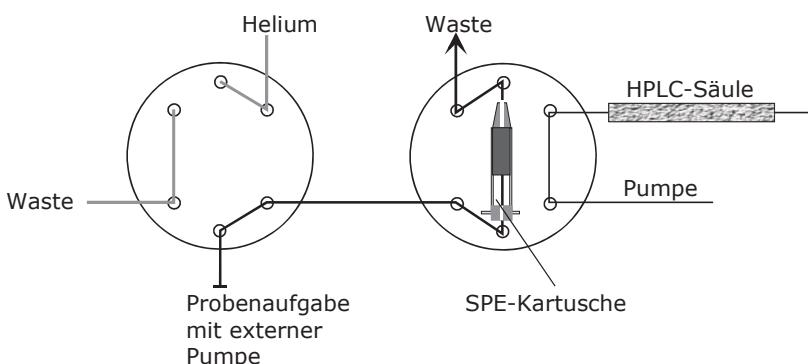


Abb. 12.2 Probenaufgabe bei der SPE-HPLC

Das bewirkt einen gewissen Konzentrierungseffekt der Analyte und eröffnet auch die Möglichkeit, mobile Phasen anderer Selektivität oder Eluenten, die mit der Flüssigkeit der Probenmatrix nicht mischbar wären, einzusetzen. Im dritten Schritt werden nach einem weiteren Ventilumschalten (Abbildung 12.4) die Analyte in der SPE-Kartusche mit Hilfe des HPLC-Eluenten desorbiert und auf die Trennsäule überführt. Dort erfolgt in üblicher Weise die flüssigchromatographische Trennung in einzelne Analyt-Komponenten. Das kann isokratisch oder auch mittels Gradientenelution durchgeführt werden.

Diese Kopplungstechnik ist vollständig automatisiert und erfordert nach Optimierung aller Teilschritte nur einen geringen Zeitaufwand. Zu beachten sind vor allem die Trenneigenschaften und die Selektivität der eingesetzten Sorbentien in der SPE und in der HPLC sowie die Löslichkeit der Analyte in den verwendeten Eluenten.

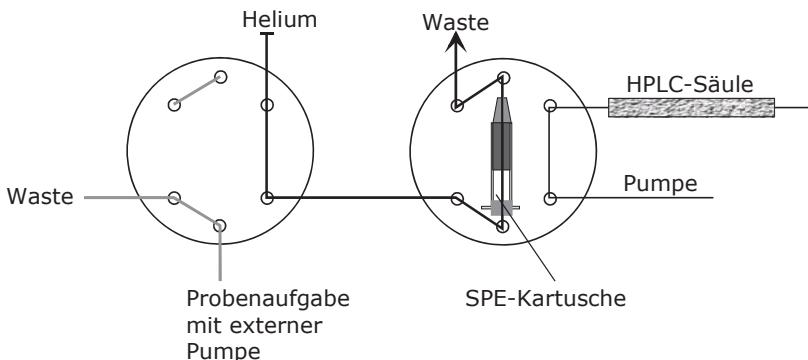


Abb. 12.3 Spülen mit Helium und Trocknen der SPE-Kartusche

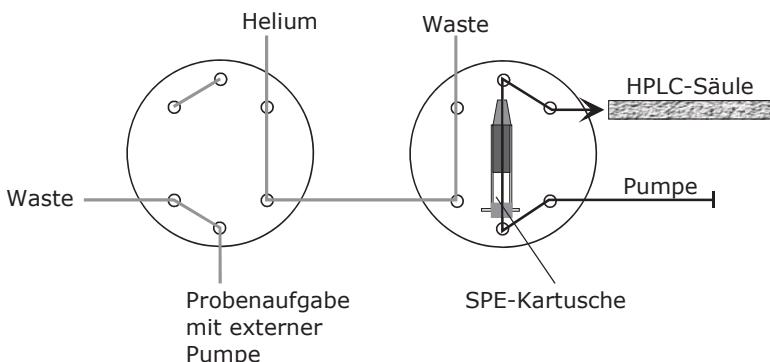


Abb. 12.4 On-line-Kopplung SPE-HPLC

12.2.3 SPME – GC und SPME – LC

Die Festphasenmikroextraktion (Kapitel 3.2.10) etabliert sich immer stärker als präanalytische Methode vor allem innerhalb der Probennahme von Analyten in komplex zusammengesetzten industriellen oder biologischen Matrices. Lösungsmittel, die in größeren Mengen in der Flüssig-flüssig-Extraktion (LLE) und z.T. auch für die SPE erforderlich sind, entfallen vollständig. Die Selektivität der SPME-Faser entscheidet darüber, ob und in welchem Umfang Analyte sorbiert und wieder desorbiert werden.

Im Falle der SPME-GC sind vergleichbare apparative Lösungen zur Methodenkopplung realisiert wie sie in der Head-Space- oder Purge-and-Trap-Technik seit Jahren angewandt werden. Die Desorption der Analyte aus dem Polymer der SPME-Faser erfolgt durch Aufheizen und direkt auf die GC-Kapillartrennsäule.

Das Equipment für die Realisierung einer Kopplung zwischen der Festphasenmikroextraktion und einer HPLC-Säule (SPME-LC) ist in den Abbildungen 12.5 und 12.6 dargestellt. Die SPME-Faser dient zuerst der „Probennahme“. Die Analyte einer flüssigen Probe werden sorbiert. Der Desorptionsvorgang ist davon begleitet, dass die zu analysierenden Stoffe in einen Flüssigkeitsstrom, der zur HPLC-Säule gerichtet ist, überführt und gelöst werden müssen. Dazu dient die Desorptionskammer (Abbildung 12.5, „Load-Position“). In dieser Ventilstellung kann die Trennsäule mit mobiler Phase konditioniert werden, während die Analyte von der SPME-Faser in die Kammer überführt werden.

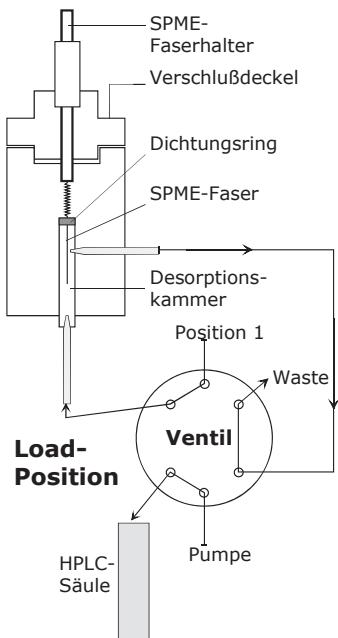


Abb. 12.5 SPME-HPLC: „Load“.

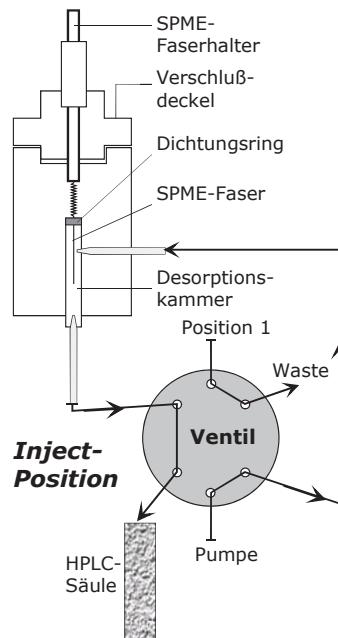


Abb. 12.6 SPME-HPLC: „Injection“

Nach Umschalten in die Position „Injection“ (Abbildung 12.6) wird der HPLC-Eluent in Richtung Desorptionskammer geleitet, in der die Analyte in den Flüssigkeitsstrom aufgenommen und zur Trennsäule weiter transportiert werden. Auch hier hängt der Erfolg dieser automatisierten Kopplungstechnik vor allem von den Sorptionseigenschaften der Faser, von geringen Totvolumina und der Qualität der Trennsäule ab.

12.3 Trennmethode – Trennmethode

Diese Kopplungstechniken kombinieren oft zwei chromatographische Trennsäulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften bzw. Selektivitäten. Dies wird auch als Multidimensionale Chromatographie bezeichnet. Meist werden zwei GC- oder zwei LC-Säulen gekoppelt. Der Begriff „orthogonal“ bezieht sich auf diese zweidimensionalen Trennungen. Die Schaltung der Trennsäulen kann hintereinander oder auch im parallelen Modus erfolgen.

Die Massenspektrometrie (MS) ist auch als „Trennmethode“ einzuordnen, da die Separation der Analyte in einem Analysator (auch Trennsystem genannt) nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis erfolgt. Demzufolge gehören MS-MS-Kopplungen (MSⁿ) in dieses Kapitel. Die Massenspektrometrie liefert dem Analytiker auch strukturelle Informationen.

Weiterhin sind elektrophoretische Trennmethoden sowohl off-line als auch online miteinander kombinierbar. Im Falle der 2-Dimensionalen Elektrophorese werden die Isoelektrischen Fokussierung (Trennung erfolgt nach den isoelektrischen Punkten der Proteine) mit der SDS-PAGE, in der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt, miteinander gekoppelt. Beide Trennungen finden in einer Ebene statt, d.h., meist auf horizontal angeordneten Elektrophoreseplatten mit entsprechend präparierten Gelen (s. Kapitel 8.3.6 und 8.3.7 und 13.4.1).

Interessante Trennergebnisse liefert auch die Kombination der Säulenflüssigkeits-Chromatographie mit einer Dünnschichtplatte (LC-TLC).

12.3.1 LC – TLC

Die methodische Realisierung dieser Kopplung LC-TLC zeigt die Abbildung 12.7. Innerhalb einer HPLC-Säule werden in einer ersten Dimension die Stoffgemische selektiv in einzelne Peaks aufgetrennt. Die Dünnschichtplatte bietet eine zweite Dimension für weitere Auftrennungen an. Hier können die einzelnen „gemischten Substanzpfropfen“ in noch mehr Einzelkomponenten „zerlegt“ werden.

Kombinierbar sind z.B. unpolare HPLC-Trennsysteme (Reversed-Phase-Material) mit polaren Silicagelen auf der Dünnschichtplatte. Analyte können demzufolge nach ihrer Hydrophobizität und anschließend nach unterschiedlichem Adsorptionsvermögen separiert werden.

Allerdings haben sich diese Kopplungssysteme als wenig praktikabel erwiesen. Die Säulenflüssigkeits-Chromatographie (LC) selbst bietet zahlreiche „orthogonale Möglichkeiten“ der Kombination von Säulen mit Adsorbentien (Silicagel, Alu-

miniumoxid) und RP-Material oder auch mit Ionenaustrauschern. Diese multidimensionalen LC-LC-Kopplungen (12.3.2) werden durch Säulenschalttechniken mit programmierbaren Schaltventilen realisiert.

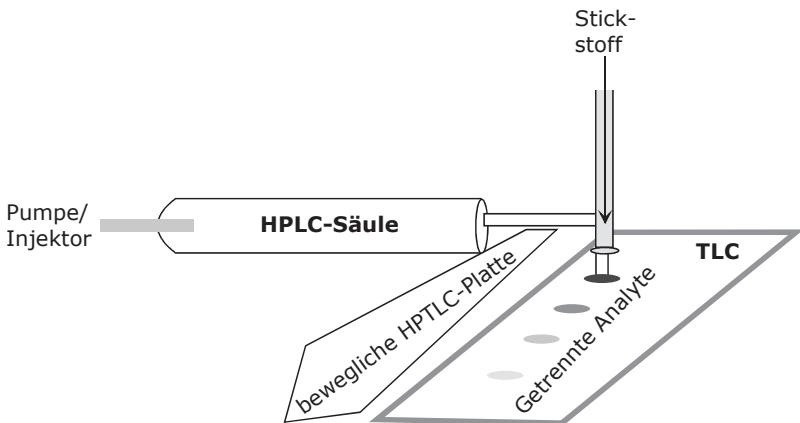


Abb. 12.7 Kopplung LC-TLC

12.3.2 LC – LC (Säulenschalttechnik)

Das Ziel dieser Säulenschalttechniken besteht darin, komplex zusammengesetzte „Substanzpfropfen“, die auf der ersten Säule nicht oder nicht ausreichend getrennt wurden, in einer zweiten Säule möglichst mit Basislinientrennung zu separieren. Die Flüssigchromatographie bietet sowohl die Möglichkeit, die Selektivität der stationären Phase (z.B. polar oder unpolar) als auch die Zusammensetzung der mobilen Phasen hinsichtlich polarer bzw. unpolarer Eigenschaften für die Analyt-Trennung zu optimieren und dem Trennproblem anzupassen. Es werden somit zwei oder mehrere Trennsäulen mit unterschiedlichem Trennvermögen kombiniert. Dies gilt auch für die Kombination Vorsäule mit einer Hauptsäule.

Die Säulen können nun in verschiedenen Varianten geschaltet werden. So unterscheidet man die Serienschaltungen („Geradeausbetrieb“ bzw. die Kombination von hintereinander geschalteten Säulen) oder die Rückspülung (backflash), bei der die Umkehr der Strömungsrichtung erfolgt, wenn alle Zielanalyte die zweite Säule erreicht haben. Weiterhin können Substanzpeaks nach dem Passieren der ersten Säule ausgeblendet oder interessierende Peaks aus dem Chromatogramm „heraus geschnitten“ (*heart cutting*) werden.

Aus den verschiedenen praktizierten LC-LC-Kopplungsvarianten wird das folgende Beispiel (Abbildungen 12.8. – 12.10) näher erläutert. In der Situation 1 erfolgt das Applizieren der Probe in die Injektionsschleife. Die Trennsäule 1 wird separat mit mobiler Phase durch Pumpe 1 konditioniert. Mit Hilfe der zweiten externen Pumpe wird die Säule 2 eluiert, so dass auch hier das Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase rechtzeitig eingestellt wird.

Durch Umschalten des Injektionsventils wird der Inhalt der Probeschleife zur Trennsäule 1 transportiert. Hier erfolgt eine erste Analyt-Separation, die nach dem Säulenausgang auch mit Hilfe eines Detektors verfolgt werden kann. Zu beachten ist, dass die Säulenelution in der Situation 2 von links nach rechts erfolgt. Durch eine weitere Ventilschaltung (Situation 3) werden jetzt die Analytmoleküle in Säule 1 entgegen der bisherigen Flussrichtung zurück gespült (backflush).

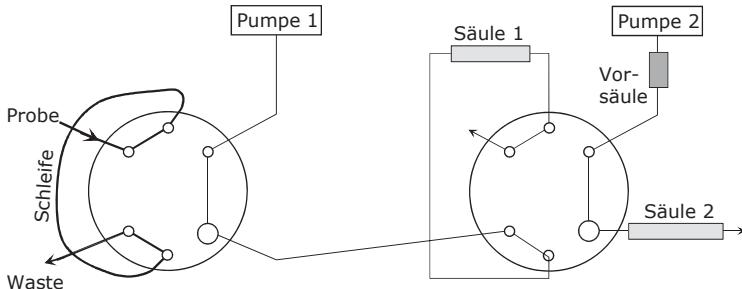


Abb. 12.8 Säulenschalttechnik, Situation 1

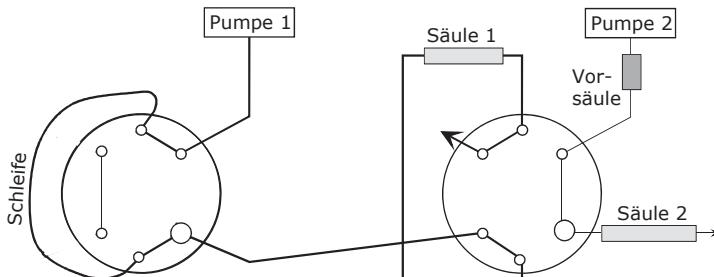


Abb. 12.9 Säulenschalttechnik, Situation 2

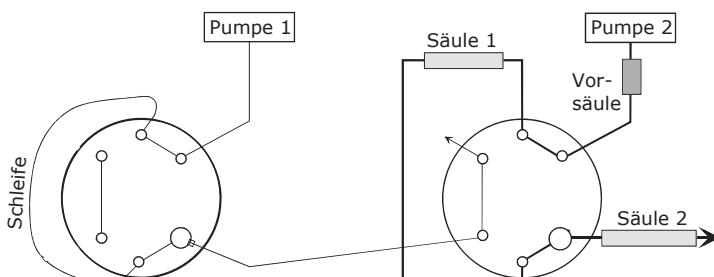


Abb. 12.10 Säulenschalttechnik, Situation 3

Dies betrifft Substanzen, die von Säule 1 unter den vorherigen Bedingungen in der Situation 2 (Selektivität der stationären Phase/Elutionskraft der mobilen Phase) nicht eluiert werden konnten. Pumpe 2 fördert nun eine mobile Phase, die die Analyte von Säule 1 zurück eluiert und zur Säule 2 bewegt. Dort sollte dann eine optimale chromatographische Trennung erfolgen.

In einem anderen Beispiel werden verschiedene Peptidionen-Gemische an einem Ionenaustauscher (IEC-Säule) und nachfolgend an einer RP-Phase getrennt (Abbildung 12.11).

Für die aus positiv geladenen Peptiden bestehenden Gruppen bietet sich zu Beginn des Separationsprozesses eine Kationenaustauscher-Säule an. Mehrfach geladene Ionen werden stärker retardiert. Die „Gruppe“ der einfach geladenen Peptide kann durch Säulenschaltung zuerst auf einer RP-Säule eluiert und in einzelne Individuen aufgetrennt werden. Es folgen die Gruppen der mehrfach geladenen Kationen, so dass im Endeffekt zahlreiche Individuen getrennt werden und identifizierbar sind.

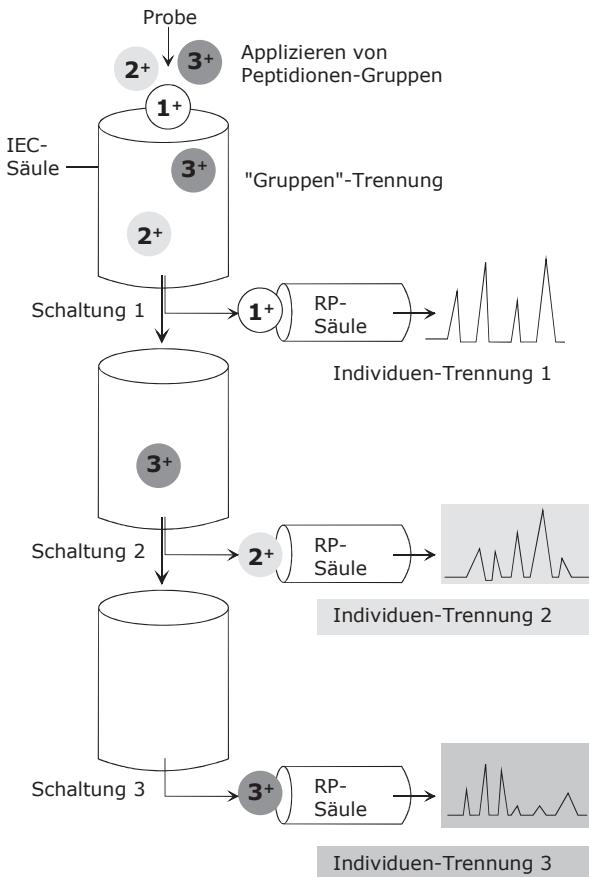


Abb. 12.11 Kopplung einer Kationenaustauscher- und RP-Säule

12.3.3 GC – GC (Säulenschalttechnik)

Die Kopplung von GC-Säulen (zweidimensionale Chromatographie: „heart cutting“) zielt ebenso auf eine Erhöhung der Trennleistung und Selektivität ab. Auch die Strategien des Säulenschaltens sind mit denen in der Flüssigchromatographie vergleichbar, jedoch apparativ anders zu lösen.

Substanzpaare werden mittels GC getrennt, wenn ihre Siedepunkte verschieden sind und/oder, wenn unterschiedliche selektive Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase existieren. Die mobile Phase – das Trägergas – dient lediglich zum Transport der Analyte durch die GC-Säule und beeinflusst das Trennvermögen kaum. Die Eigenschaften der Trennsäulen und ihrer stationären Phasen müssen deshalb so gewählt werden, damit z.B. das auf der Säule 1 nicht aufgelöste Peakpaar nach seinem Transfer auf die zweite GC-Säule möglichst gut und mit Basislinientrennung chromatographiert werden kann, wie in der folgenden Abbildung 12.12 schematisch dargestellt ist.

GC-GC-Kopplungen sind auch so konzipiert, dass das Eluat aus einer ersten GC-Trennung in kleinen Fraktionen auf einer sehr kurzen zweiten GC-Säule erneut aufgetrennt wird. Daraus resultieren deutliche und effiziente Steigerungen in der Trennleistung.

Die GC-GC-Kopplung ist vor allem für leicht flüchtige Substanzen, die sich beim Verdampfen nicht zersetzen, geeignet. Dies trifft für niedermolekulare organische Substanzen wie z.B. Alkohole, Aldehyde, Alkane und Aromaten zu.

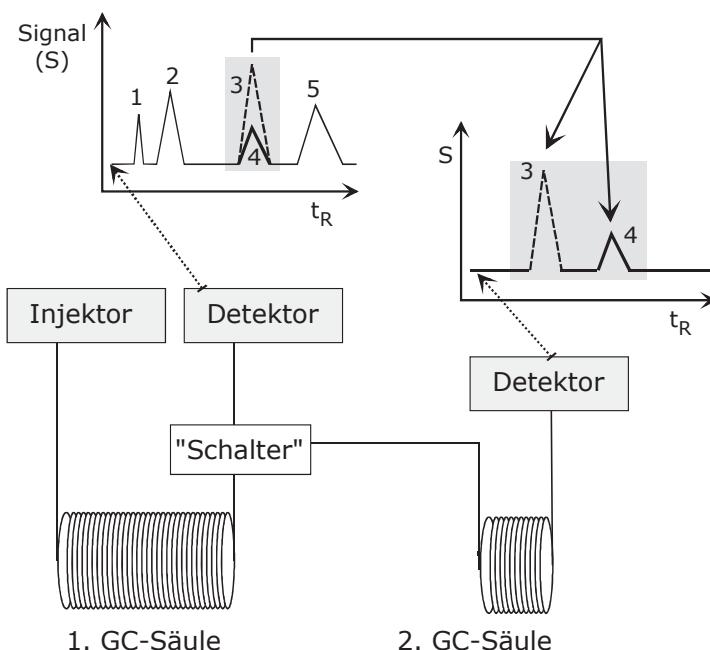


Abb. 12.12 Zweidimensionale Kapillargaschromatographie

12.3.4 IEF – SDS-PAGE

Ganz andere Anforderungen bestehen dagegen für hochmolekulare Substanzen wie Proteine, Glycoproteine oder Nucleinsäuren. Als Separationsmethoden dienen verschiedene Trennmechanismen der slab gel Elektrophorese. In der 2-D-Elektrophorese wird die IEF mit der SDS-PAGE „gekoppelt“, wie in Abbildung 12.13 schematisch dargestellt ist. Grundlagen und Trennprinzipien wurden bereits im Kapitel 8 „Elektrophorese“ behandelt. Die erneute Präsentation dieser Kopplungs-technik soll die große Vielfalt der Kombinationen von Trennmethoden – auch im Hinblick auf verschiedenste Substanzklassen – verdeutlichen.

Mit Hilfe der 2-D-Elektrophorese können mehrere hundert Protein-Spots getrennt und visualisiert werden. In Kombination mit der MALDI-MS gelingt auch eine weitestgehende Identifizierung der Biomoleküle (s. Kapitel 13.3 und 13.4); zumindest sind die Molekulmassen i.d.R. bestimmbar.

Das Proteingemisch wird zuerst auf ein IEF-Gel mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG Strip) appliziert. Nach Anlegen der Spannung wandern die Proteine im Gel zu den „Gelpunkten“, an denen ihre Nettoladung Null beträgt. Das ist der isoelektrische Punkt des entsprechenden Proteins (pI).

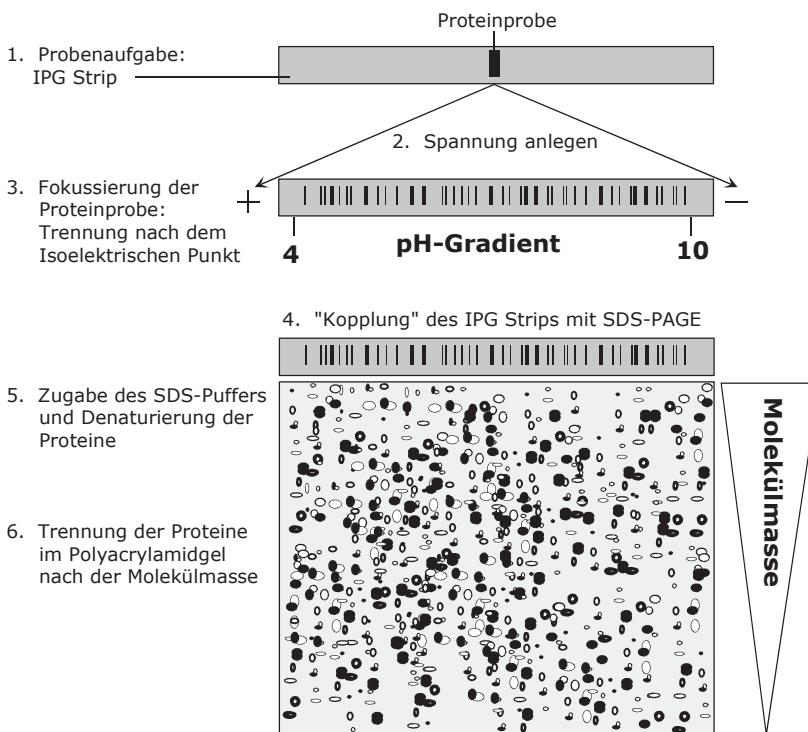


Abb. 12.13 Kopplung IEF - SDS-PAGE (2-D-Elektrophorese)

Der IPG Strip wird anschließend zur SDS-PAGE überführt. Nach Zugabe der entsprechenden Pufferlösungen erfolgt nun in einer zweiten Dimension die weitere Auftrennung der einzelnen Protein-Spots aus dem IEF-Gel heraus. Dies erfolgt im Polyacrylamidgel nach der Größe der Proteine. Kleine Biomoleküle wandern schneller durch das Poresystem des Gels im Vergleich zu hochmolekularen Proteinen. Es resultiert eine Art „Landkarte“ mit Hunderten von Protein-Spots. In der modernen Proteinanalytik (Proteomics, Kapitel 13) repräsentieren sie z.B. die Gesamtheit einer gesunden oder auch einer pathologischen (Krebs)zelle. Ziel ist, die einzelnen Proteine bzw. die eingetretenen Veränderungen innerhalb der Protein-Pattern zu identifizieren. Dafür wird ein enzymatischer Verdau des Proteins entweder direkt im Gel oder außerhalb („in-vitro“) durchgeführt. Die resultierenden einzelnen Proteinfragmente werden mittels MALDI-MS identifiziert und mit Hilfe von Datenbanken zum entsprechenden Gesamtprotein „zusammengesetzt“.

12.3.5 MS – MS

Durch das Hintereinanderschalten von zwei Massenspektrometern (MS-MS) erhält man zwei gekoppelte „Trennmethoden“. Dies wird in der Analytik als mehrdimensionale Massenspektrometrie, als Tandem-MS oder MS-MS bezeichnet. Auch mehrere MS-Trennsysteme sind koppelbar (MSⁿ). Als Analysatoren (Trennsysteme) stehen das TOF (time of flight), das ion trap und vor allem das Quadrupol für eine MS-MS-Kopplung zur Verfügung. Die Kombinationen sind sehr vielfältig und werden problemorientiert angewandt.

Ein relativ einfaches MS-MS-Prinzip ist in Abbildung 12.14 dargestellt. Um z.B. Fragmentierungen zu studieren oder um die Selektivität und Empfindlichkeit (Sensitivität) bei quantitativen Bestimmungen deutlich zu erhöhen, werden mehrere Analysatoren hintereinander gekoppelt. Zwischen zwei Analysatoren wird eine sogenannte Kollisionszelle (Stoßkammer) eingebaut, um den Ionen durch Stöße mit einem inertem Gas (Argon, Stickstoff) Energie zuzuführen. Daraufhin zerfallen die Ionen sehr spezifisch zu anderen (leichteren) Ionen.

Im MS 2 (z.B. Quadrupol) können die Produktionen gescannt werden und man erhält Spektreninformationen über die Struktur des Moleküls. Beobachtet man andererseits nur ein Fragmention, so ist eine sehr sensitive und selektive Quantifizierung (MRM: *multiple reaction monitoring*) möglich.

Weitere Funktionsprinzipien zur Massenspektrometrie (Scan-, SIM- Mode u.a.) gehen aus dem Kapitel 11 hervor.

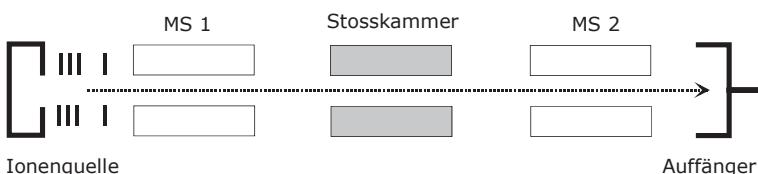


Abb. 12.14 MS - MS (schematisch)

12.4 Trennmethode - Massenspektrometrie

Nachdem die Massenspektrometrie in den vorhergehenden Kapiteln auch als Trennmethoden eingestuft wurde, sollen hier die Besonderheiten der Kombinationen mit den chromatographischen Methoden und (kapillar)elektrophoretischen Trenntechniken im Mittelpunkt der Betrachtung stehen. Schwerpunkt sind vor allem die verschiedensten Varianten der LC-MS-Kopplung, da sie für bioanalytische Fragestellungen die Methoden der Wahl darstellen. Im pharmazeutischen Bereich gewinnt die CE-MS zunehmend an Bedeutung, während die GC-MS für die Analytik komplexer Gemische mit Analyten kleinerer Molmassen geeignet ist.

12.4.1 Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Die Grundlagen der GC mit gepackten Trennsäulen und Kapillargaschromatographie (CGC) wurden bereits im Kapitel 6.3 eingehend beschrieben.

Die Kombination der Gaschromatographie mit einem Massenspektrometer (GC-MS) gilt als universelle Detektionsmethode. Alle gasförmigen Substanzen werden ionisiert und im Massenspektrometer detektiert. Die Probenvorbereitung und die exakte Ermittlung von „Blindwerten“ sind wichtige Voraussetzungen, um GC-MS-Kopplung optimal einzusetzen.

Das Massenspektrometer hat in der GC im Vergleich zu anderen Detektoren (FID, ECD) für bioanalytische Fragestellungen die größte Bedeutung, obwohl nur etwa 20% aller organischen Verbindungen direkt und weitere 5% nach Derivatisierung mittels GC-MS analysiert werden können.

In Abhängigkeit der Ionisationsmethode (CI: chemische Ionisation) und des verwendeten Massenspektrometers (Quadrupol) können Substanzen im Bereich von 10 pg bis 10 fg ($10^{-11} \dots 10^{-14}$ g) nachgewiesen werden, weshalb die GC-MS vor allem für die Analyse und Strukturaufklärung von extrem niedrigen Spurengehalten von niedermolekularen Substanzen in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik fest etabliert ist. In der Bioanalytik wird die Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie für ganz spezielle Untersuchungen eingesetzt (s. Abschnitt 15.12.2.1).

Von Bedeutung ist z.B. die Analyse von flüchtigen Kohlenhydrat-Derivaten (Trimethylsilyl- oder Methylether, Acetate) sowie von Lipidbestandteilen und Fettsäuren, wie im Abschnitt 15.9.2.2 noch gezeigt werden wird.

Besonders geeignet ist die GC-MS-Technik innerhalb der Aufklärung der Bindungsverknüpfung und Isomerie der Glycanstrukturen von Glycoproteinen (Abschnitt 15.12.2.1) oder zur Enantiomerentrennung von optisch aktiven Biosubstanzen. Biopolymere sind dagegen thermolabil, können in der Regel nicht so gut derivatisiert werden und sind folglich für GC-MS-Untersuchungen nicht geeignet. Für die Kopplung von gepackten GC-Säulen und dem Massenspektrometer ist ein Separator (Abbildung 12.15) erforderlich, da die hohe Trägergasmenge von ungefähr 20–60 ml/min nicht direkt in das Massenspektrometer überführt werden kann.

Der Gasstrom und die darin enthaltenen Probemoleküle werden vom Trennsäulenaustritt über eine Düse in eine unter Vakuum stehende Trennkammer überführt. Darin erfolgt die Abtrennung und das Absaugen der Gasmoleküle mit Hilfe einer Vakuumpumpe. Die Probemoleküle gelangen durch die Transferkapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers.

Bevorzugt wird das Prinzip der „offenen Kopplung“. Zwischen Trennkammer und Ionenquelle wird eine Überführungskapillare mit druckdichten Fittings angeordnet. Fused-Silica- oder auch Glaskapillaren können daran problemlos angeschlossen bzw. gewechselt werden, ohne dass das Vakuum im Massenspektrometer unterbrochen werden muss.

Für die Analytik insbesondere von Biopolymeren ist die Kopplung der Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie wesentlich bedeutsamer, weshalb diese Technik hier im Mittelpunkt stehen soll.

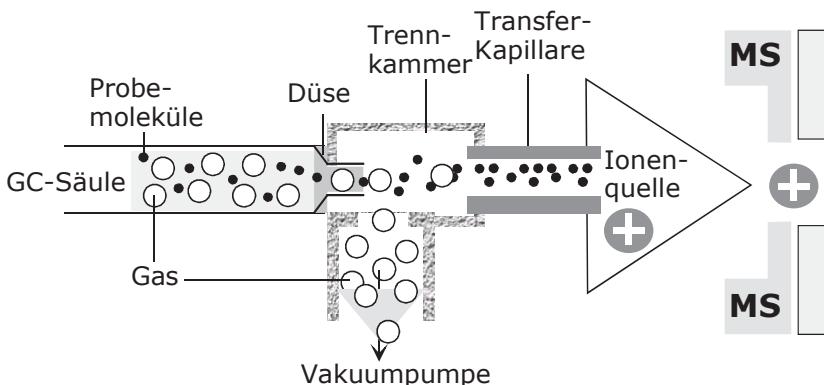


Abb. 12.15 GC-MS-Kopplung über einen Separator

12.4.2 Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie

Die On-line-Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-MS) wird seit den 80-er Jahren in den analytischen Laboratorien angewandt und zählt heute fast schon zu den instrumentalanalytischen Routinemethoden.

Zu den Wegbereitern, die die verschiedensten Varianten und Interfaces für diese leistungsfähige Analysentechnik entwickelten, gehören Forschungsgruppen wie die von Vestal, Arpino, Fenn oder Henion.

Bei der direkten Kombination zwischen zwei so leistungsfähigen Analysetechniken, wie sie die Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie darstellen, existieren jedoch einige methodische Schwierigkeiten. Im Gegensatz zur Kopplung zwischen Kapillargaschromatographie und Massenspektrometrie ist bei der Verbindung zwischen einer HPLC-Säule und einem unter Hochvakuum stehenden MS-Gerät eine drastische Reduzierung der Menge des Säuleneluates notwendig. Übliche Flussraten des Säuleneluates liegen bei etwa 1 ml/min.

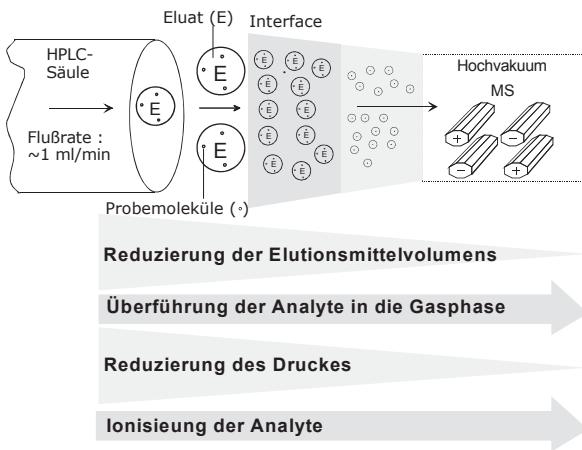


Abb. 12.16 Problematik der LC-MS-Kopplung

Derartig große Flüssigkeitsvolumina führen bei der Einleitung in ein Massenspektrometer zum Zusammenbrechen des Hochvakuums. Das Problem der LC-MS-Kopplung wird in Abbildung 12.16 schematisch aufgezeigt.

Hinzu kommen unerwünschte Effekte bei der Ionisation von nicht flüchtigen bzw. thermolabilen Probemolekülen. Ein Interface zwischen dem LC- und dem MS-Geräteteil zur Reduzierung der großen Lösungsmittelmenge ist deshalb erforderlich. Die Probemoleküle sollen dabei möglichst unbeeinflusst bleiben.

12.4.2.1 „Klassische“ LC-MS-Kopplungen

Die nachfolgend dargestellten Interface-Techniken sind einerseits heutzutage nicht bzw. in ihrer technischen Konzeption kaum noch in kommerziellen Geräten zu finden, andererseits geben sie methodisch und konstruktiv darüber Auskunft, wie „steinig“ die Entwicklungswege zu geeigneten und leistungsfähigen „Spray-Techniken“ für die Realisierung der LC-MS verliefen.

12.4.2.1.1 Moving-Belt Interface

Die Eliminierung großer Elutionsmittelvolumina beim Transfer in ein Massenspektrometer gelang teilweise bereits in den 1970-er Jahren, als die (klassische) *Moving-Belt*-Technik eingeführt wurde. Die aus der Säule austretende mobile Phase, in der die Probemoleküle gelöst sind, tropft auf ein Transportband (*belt*) und wird darauf zur Ionenquelle des Massenspektrometers gefördert.

Während des Transportes erfolgt durch vorsichtiges Erhitzen und Verdampfen die weitestgehende Entfernung des Säuleneluates unter dem Einfluss eines geringen Vakuums. Danach werden die Analytmoleküle am äußersten Ende des Transportbandes schlagartig in die Ionenquelle des Massenspektrometers verdampft. Auf dem „Rückweg“ des Bandes erfolgt seine Reinigung von noch verbliebenen Proberesten durch Zuführung von Wärme und Waschen mit Lösungsmitteln.

Die schematische Darstellung des heute kaum noch verwendeten Interfaces geht aus der Abbildung 12.17 hervor.

Gegenwärtig werden fast ausschließlich Verfahren zum Versprühen der mobilen Phase (Spray-Interfaces; früher: „Thermospray“) eingesetzt. In der Praxis haben sich das *fast atom bombardement*- und das *particle beam*-Interface bewährt; heute finden oft *electrospray*-, *atmosphärendruck*- Interfaces Anwendung.

Zum besseren Vergleich dieser Techniken untereinander sind in den folgenden Abschnitten neben der schematischen Darstellung des entsprechenden Interfaces zusätzlich auch zusammenfassende Übersichtstabellen eingefügt.

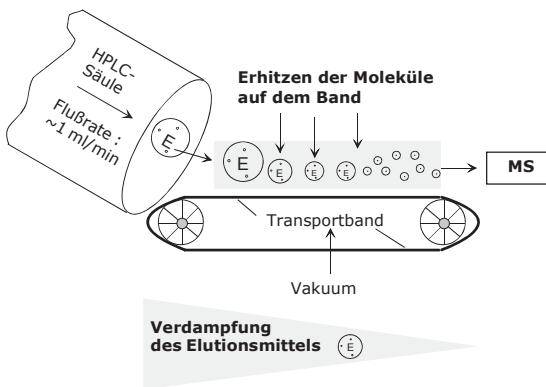


Abb. 12.17 Moving-Belt-Interface

12.4.2.1.2 μ -LC-Direkteinlass-MS

Der Direkteinlass des Säuleneluates (DLI: *direct liquid introduction*) ist ohne ein entsprechendes Interface in der herkömmlichen HPLC-Technik nicht möglich. Durch die Anwendung von Microbore-HPLC-Säulen, der Kapillar-LC oder durch ein nachgeschaltetes Splitsystem bei konventionellen HPLC-Säulen können derart kleine Elutionsmittel Mengen resultieren, dass eine direkte Überführung des Eluates in das Massenspektrometer ohne „Belt- oder Spraytechniken“ möglich ist (Abbildung 12.18).

Eine Art Interface, in dem die mobile Phase mit den Analytmolekülen für die Überführung in die Ionenquelle präpariert wird, ist in der Regel trotzdem erforderlich. Die Vernebelung des Säuleneluates bzw. ein noch notwendiger Teil davon wird durch das Erzeugen eines Flüssigkeitsstromes durch eine kleine Membran hindurch und dem damit verbundenen „Aufreißen“ der Flüssigkeit in einzelne Tröpfchen (Droplets) erzeugt.

Die Vernebelung findet in einer druckreduzierten Desolvationskammer, die mit einer chemischen Ionisationsquelle verbunden ist, statt. Durch die Desolvatisierung der Droplets erfolgt eine schonende Überführung von nichtflüchtigen und thermolabilen Probemolekülen in die Gasphase.

Eine Eluatvermittelte chemische Ionisation der Analytmoleküle kann durch die in der mobilen Phase bei RP-Chromatographie bereits vorhandenen Moleküle initiiert werden.

Für diese miniaturisierten Chromatographie-Techniken sind sehr präzise fördernde Hochdruckpumpen für kleine Flussraten und reproduzierbare Gradientenverläufe erforderlich. Hinzu kommt, dass die externen Totvolumina im Chromatographiesystem noch wesentlich kleiner (z.T. im nl-Bereich) als in der konventionellen HPLC sein müssen. Dies betrifft die Kapillarverbindungen zwischen Injektor und Trennsäule und vom Säulenausgang zur Detektorzelle. Das Volumen der Durchflusssküvette darf allerdings nicht beliebig klein sein. Die Schichtdicke sollte noch ausreichend groß sein, damit entsprechend des Lambert-Beerschen-Gesetzes eine hohe Empfindlichkeit gewährleistet ist.

Miniaturisierte HPLC-Systeme (Kapillar-LC, Nano-LC, Microbore-LC) sollten auch hinsichtlich der Trennleistung charakterisiert und optimiert werden. Dafür ist die Erstellung von H-u-Kurven (Van-Deemter-Kurven) erforderlich.

Diese Techniken sind noch wenig verbreitet, zeichnen sich aber durch hohe Empfindlichkeiten und einfache (auch splittlose) Kopplung zum MS aus.

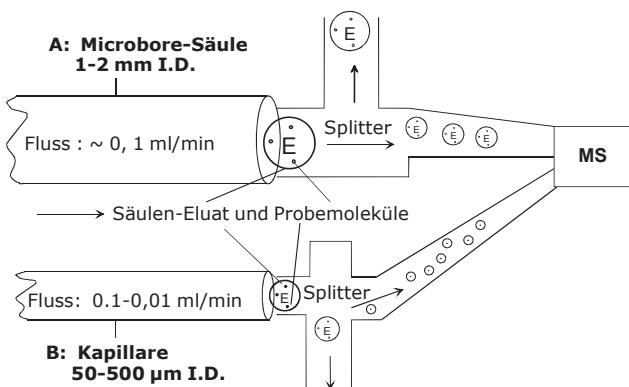


Abb. 12.18 Direct Liquid Introduction

12.4.2.1.3 LC-Thermospray-MS

Das Thermospray-(TSP)Interface („Zerstäuben in der erhitzen Kapillare“, war lange Zeit die Methode der Wahl für die Kopplung zwischen Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS). Auf Grund der geringen Empfindlichkeit und Robustheit wird die Methode gegenwärtig von der Atmosphärendruck- und Electrospray-Technik verdrängt.

Die Überführung des Eluates erfolgt von einer kommerziellen HPLC-Säule, deren Innendurchmesser ca. 4 mm beträgt, in eine auf 150–200°C aufgeheizte Metallkapillare (*Nebulizer*) mit einem Innendurchmesser von wenigen 100 Mikrometern.

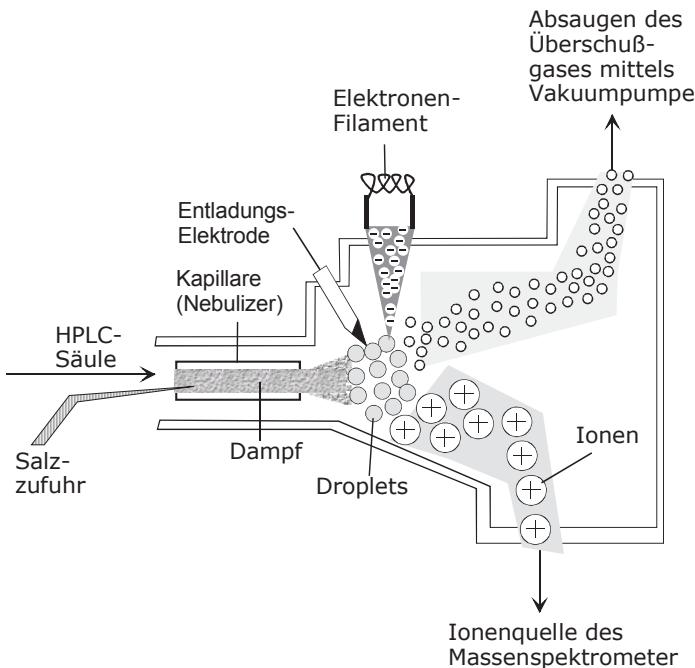


Abb. 12.19 Thermospray-Interface

Eine Vernebelung (Aerosolbildung) des erhitzten Eluates entsteht, wenn das Flüssigkeitsvolumen beim Austritt aus der Kapillare entspannt wird.

Das Aerosol besteht aus kleinen Tröpfchen (*Droplets*), in denen die Probemoleküle hoch verdünnt vorliegen. Die Desolvatisierung der Droplets erfolgt durch das angelegte Vakuum (Vakuumpumpe) in der Niederdruckregion (Aerosolkammer). Die sich anschließende Ionisation der Probemoleküle kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Der mobilen Phase werden flüchtige Salzkomponenten wie Ammoniumacetat (Pufferionisation) mit Hilfe einer weiteren LC-Pumpe zudosiert oder im Eluat sind bereits entsprechende Salzmoleküle für die Ionisation vorhanden. Nicht alle Substanzen werden durch derartige chemische Ionisations (CI) ausreichend ionisiert, was in der Regel zu niedrigen Nachweisempfindlichkeiten führt.

Durch die Verwendung eines Elektronen emittierenden Glühfadens (Filament) oder einer Entladungs(*Discharge*)-Elektrode, die durch eine hohe Feldstärke an ihrer Spitze gekennzeichnet ist, werden Protonentransfer-Reaktionen als effiziente Ionisierungsprozesse mit hohen Ausbeuten ausgelöst. Zur Verstärkung der Ionisation der Probemoleküle dienen außerdem sogenannte Repeller-Elektroden.

Auf Grund der Pufferionen vermittelten Ionisation ist diese Technik besonders für die Analyse von polaren Probemolekülen an Reversed-Phase-Säulen (RP-Säulen) geeignet.

12.4.2.1.4 LC-Fast-Atom-Bombardement-MS

Die Interface-Technik des LC-FAB-MS (FAB: Bombardierung bzw. Beschuss mit energiereichen Atomen) erfordert kleine Flüssigkeitsströme, wie sie in der Microbore-HPLC realisiert sind. FAB wird auch als *dynamic fast atom bombardement* oder meist als *continuous flow – fast atom bombardement* (CF-FAB) bezeichnet. Typische Flussraten für diese Mikrotrennsäulen sind 5–20 µl/min.

Innerhalb einer Fused-Silica-Kapillare wird dem Eluat Glyzerin (Situation 1 in Abbildung 12.20) als sogenannte „FAB-Matrix“ zugesetzt. An die Kapillare ist eine Stahlfritte (*frit-FAB*) oder ein goldbeschichtetes Target gekoppelt (Situation 2). Auf beiden Apparateteilen stellt sich ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der Lösungsmittelverdampfung und der Ausbildung eines gleichförmigen Flüssigkeitsfilms ein. Das Formieren von Ionen erfolgt in der FAB-MS durch Beschuss dieses Flüssigkeitsfilms mit schnellen und energiereichen Atomen oder auch Ionen (Situation 3 und 4). Der Vorteil der CF-FAB besteht darin, dass die Erneuerung des Oberflächenfilms kontinuierlich verläuft. Dadurch wird u.a. das Untergrundrauschen der FAB-Matrix vermindert.

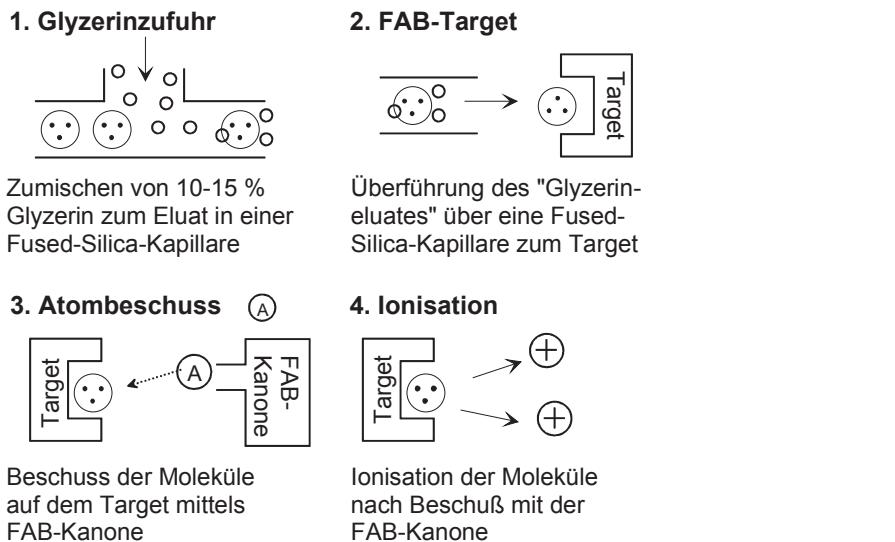


Abb. 12.20 Vorgänge beim Continuous-Flow Fast-Atom-Bombardement

12.4.2.1.5 LC-Particle-Beam-MS

Innerhalb der LC-MS-Kopplung über ein Particle-Beam(PB)-Interface, welches auch unter der Bezeichnung MAGIC (*monodisperse aerosol generator based interface for liquid chromatography*) bekannt ist, können sowohl Methoden der Elektronenstoßionisation (EI) als auch der chemischen Ionisation (CI) angewandt werden. Die Vernebelung des Eluates aus der HPLC-Säule erfolgt mittels Thermospray oder pneumatisch in einem Nebulizer.

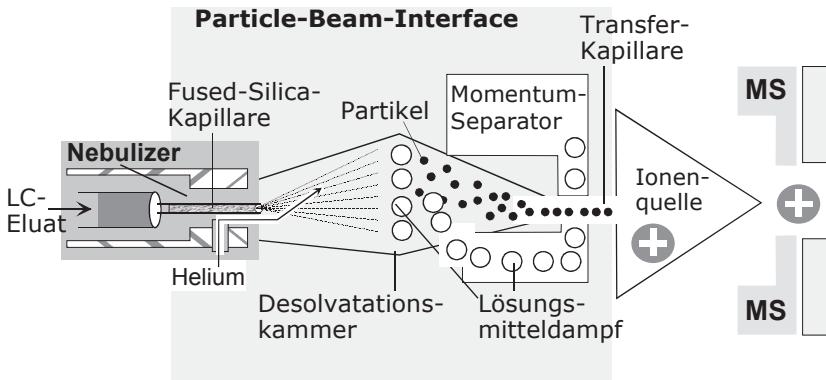


Abb. 12.21 Particle-Beam-Interface

Dieser wird mit Helium beschickt. Das Gas umströmt die Kapillare, die der Säule nachgeschaltet ist. Es entsteht ein Aerosol, das in eine Desolvatisationskammer gesprüht wird. Darin erfolgt mit Hilfe erhöhter Temperatur und durch Unterdruck die Trennung von Partikeln und überschüssigem Lösungsmitteldampf, der über eine Momentum-Separator abgepumpt wird. Der „Partikelstrahl“ (Analyt moleküle) gelangt über eine Transfer-Kapillare zur Ionenquelle und danach in das Massenspektrometer (Abbildung 12.21). Die zusammenfassende Darstellung der Abläufe beim Particle-Beam-Interface zeigt die Abbildung 12.22.

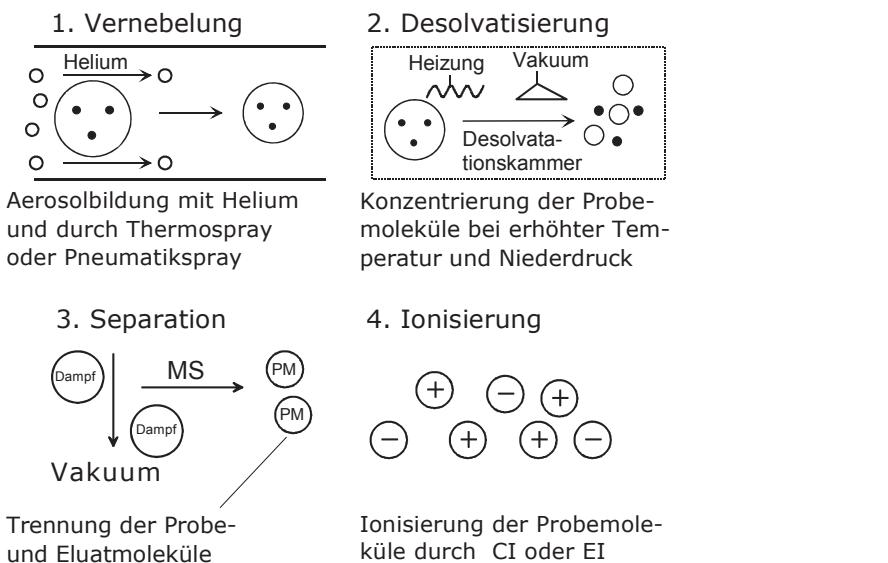


Abb. 12.22 Particle-Beam-Interface

12.4.2.2 LC – Atmosphärendruck – MS

Hauptbestandteil dieser Kopplung ist eine Ionenquelle, die unter Atmosphärendruck (API: *atmospheric pressure ionisation source*) arbeitet. In Kombination mit der chemischen Ionisation (CI) wird diese Technik auch als APCI bezeichnet.

In der Atmosphärendruck-MS können die beiden API-Techniken Ionenspray (*pneumatically assisted electrospray*, Abbildung 12.23) und das *heated pneumatic nebulizer interface* (Abbildung 12.24) als schnelle, empfindliche, selektive und robuste Überführungssysteme von hoch verdünnten Molekülen aus der Flüssigchromatographie in die Ionenquelle eines Massenspektrometers eingesetzt werden. Beide Interfaces bewirken weiche Ionisationen der Analytmoleküle und erzeugen sogenannte Quasimolekülionen ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) im positiven bzw. negativen Modus.

Im Nebulizer-Interface kommen konventionelle HPLC-Säulen mit Flussraten um 1,0 ml/min oder auch kleiner dimensionierte Säulen, die mit 0,1 bis 0,2 ml/min eluiert werden, zum Einsatz. Das Eluat gelangt ohne Splitting (T-Stück) in den Nebulizer (*Sprayer*), in dem es mit Hilfe eines schnell strömenden Luftgasstromes vernebelt wird. Die zugeführte Luft (*make up gas*) treibt die Droplets durch die aufgeheizte Kapillare, in der die Desolvatisierung der Droplets und die Verdampfung der Analytmoleküle in den Gasstrom hinein realisiert wird.

Die Temperatur dieses erwärmten Gases beträgt um 100°C. Diese ist ausreichend hoch, um die Verdampfungsprozesse in Gang zu setzen. Andererseits treten bei diesen Bedingungen noch keine thermischen Spaltungen der Moleküle auf.

Das erwärmte Gas und die darin enthaltenen Analytmoleküle gelangen als stark reduzierter Volumenstrom in das APCI-Interface, in dem die chemische Ionisation der Moleküle durchgeführt wird.

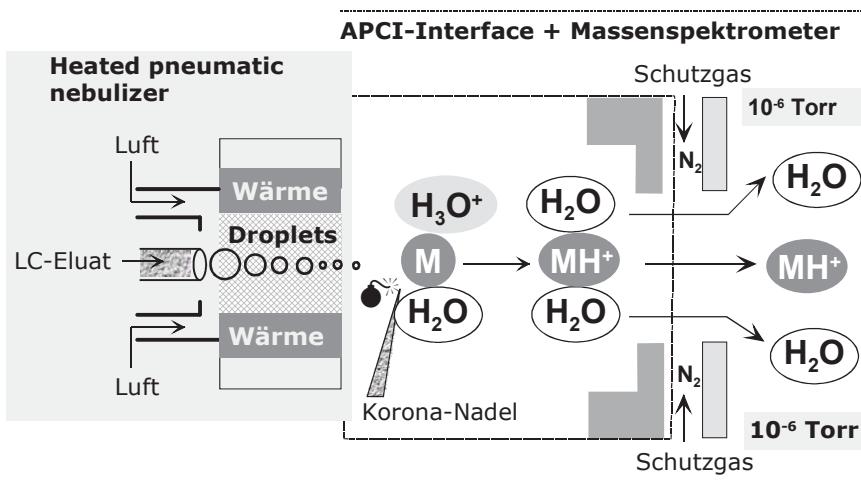


Abb. 12.23 Heated-Pneumatic-Nebulizer-Interface und Atmosphärendruck-Ionisation

Die Ionisation kann auch mit Hilfe einer Korona-Nadel (*corona needle*) ausgelöst werden. Dadurch erfolgt die Überführung der Reagenzien aus dem Lösungsmitteldampf in den ionisierten Zustand. Die Analytmoleküle werden dabei durch Protonentransfer von solvatisierten Protonen im positiven Ionisierungsmodus und durch Elektronentransfer zu den Sauerstoffatomen im negativen Modus ionisiert.

Als Schutzgas (*curtain gas, sheath gas, interface gas*) wird Stickstoff eingesetzt. Dieses trennt den Gasraum zwischen Ionenquelle und dem Massenspektrometer partiell ab. Es bewirkt durch zusätzliche Desolvatisierungseffekte eine Verminderung der Untergrundsignale im Massenspektrum. Weiterhin verhindert dieses Gas ein übermäßiges Eindringen größerer Lösungsmittelmengen sowie von Pufferionen in das Vakuumsystem und trägt damit dazu bei, dass das Massenspektrometer für die analytischen Messungen in einem „sauberen“ und damit stabilen Zustand verbleibt.

Das Ionenspray-Interface (Abbildung 12.24) besteht aus einem koaxial angeordneten Nebulizer, an dem eine elektrische Spannung von 3 bis 6 kV anliegt. Als flüssigchromatographische Trennsysteme werden Microbore-Säulen mit 1–2 mm i.D., die mit geringen Flussraten von ca. 2–50 µl/min betrieben werden, eingesetzt. Das Säuleneluat gelangt über eine 100-µm-Fused-Silica-Kapillare zum Ausgang des elektrisch geladenen Nebulizers. Mit Hilfe von komprimierter Luft erfolgt die Vernebelung des Flüssigkeitsstromes und es resultiert ein Spray (*Aerosol*) mit geladenen Droplets. Für die Adaptation von konventionelle HPLC-Säulen ist ein Splitting erforderlich, das bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 1 ml/min auf ca. 1:20 eingestellt wird, so dass eine Flussrate von 50 µl/min resultiert. Innerhalb dieser Ionen-Spray-Prozesses werden Ionen aus Lösungen, die aus schnell schrumpfenden und hoch geladenen Droplets bestehen, desorbiert. Im Resultat dieses Ionenverdampfungsprozesses entstehen Quasimolekülien, wobei der positive Modus durch eine Aduktion und der negative Modus durch die Abspaltung von Protonen gekennzeichnet sind.

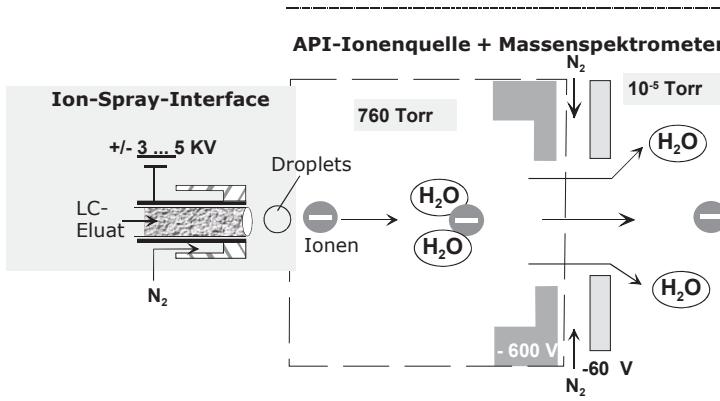


Abb. 12.24 Ionspray-Interface und Atmosphärendruck-Ionisation

Das Ionen-Spray-Interface arbeitet bei Normaltemperatur. Sowohl organische oder wässrige Eluenten als auch isokratische Elutionen oder die Gradienten-Technik können eingesetzt werden. Dies trifft auch für acetat- oder formiathaltige Puffer zu, während Eluenten mit Phosphationen für die Spray-Techniken vermieden werden sollten. Die Gesamtabläufe der Atmosphärendruck-Ionisation sind im Abbildung 12.25 zusammenfassend dargestellt.

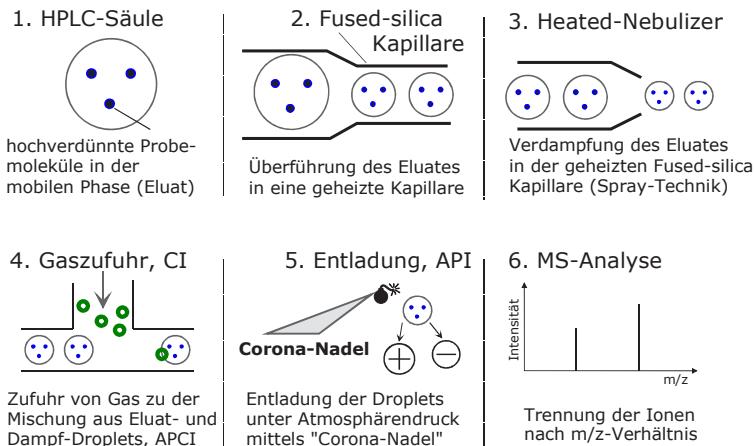


Abb. 12.25 Vorgänge im Atmosphärendruck-Interface

12.4.2.3 LC – Electrospray – MS

Die Electrospray-Technik, auch als „Zerstäuben im elektrischen Feld“ (LC-ESI-MS) bezeichnet, beinhaltet sowohl die Vernebelung des Säuleneluates in einem Aerosol als auch die Ionisation dieser solvatisierten Analytmoleküle nach der Desolvatation der geladenen Droplets. Eine apparative Anordnung einer LC-ESI-MS-MS-Kopplung zeigt die folgende Abbildung 12.26.

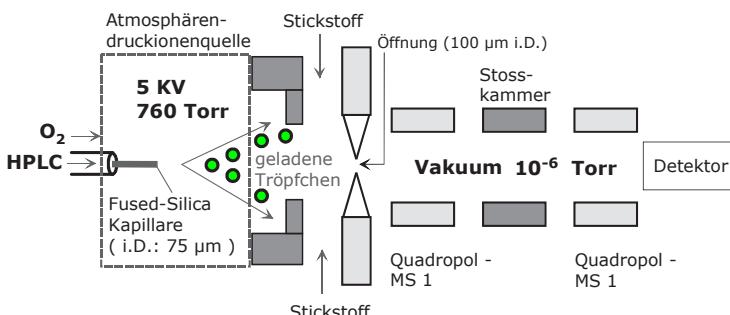


Abb. 12.26 LC-ESI-MS-MS-Kopplung

Die aus der HPLC-Säule (Microbore-Säule) austretende Analytlösung enthält noch sehr große Flüssigkeitsvolumina und wird zuerst durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Die Spannung induziert die Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode. Die Analytlösung wird von diesem elektrischen Feld durchdrungen und die in ihr enthaltenen Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen. Diese stoßen sich gegenseitig ab und treten über die Bildung eines sogenannten Taylor-Kegels (kegelförmige Deformation einer Flüssigkeitsoberfläche im elektrischen Feld) als Spray (Vernebelung) aus der Kapillare heraus. Dieses Spray ist ein Aerosol bestehend aus sehr kleinen Tropfen (Droplets um $10\text{ }\mu\text{m}$). Zur Verbesserung der Vernebelung und der Verdampfung des Elutionsmittels dient zusätzlich ein neutrales Gas wie Stickstoff. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels kommt es zur Verkleinerung der Tröpfchen, während die Dichte des elektrischen Feldes auf ihrer Oberfläche zunimmt. Wird der Radius der Droplets kleiner als das sogenannte Rayleigh-Limit (maximale Anzahl aufnehmbarer, gleicher Ladungen), zerfallen die Tropfen wegen der Abstoßung von gleichartigen Ladungen (Coulomb-Explosionen) in noch kleinere Tröpfchen.

Für die Erklärung der Bildung von freien Ionen in der Gasphase gibt es verschiedene Modellvorstellungen. Das sogenannte CRM-Modell (*Charge Residue Model*) oder „Modell des geladenen Rückstands“ besagt z.B., dass im Endeffekt der Desolvatisierung nur ganz winzige Tröpfchen um 1 nm Durchmesser übrigbleiben, die nur noch ein ionisiertes Analytmolekül enthalten. Danach erfolgt die Überführung und Analyse der Ionen im Massenspektrometer. Iontrap-, Quadrupol- oder TOF-Analysatoren dienen als Trennsysteme. Die einzelnen Teilschritte des Elektrosprays sind auch vereinfacht in Abbildung 12.27 zusammengefasst.

Die Art der Spannung an der Kapillare bestimmt die Ladung der erzeugten Ionen. Bei positiver Spannung erfolgt die Bildung positiv geladener Ionen, im negativen Modus resultieren entsprechend negativ geladene Ionen. Charakteristisch sind sogenannte Quasimolekülionen, die je nach angewandten Modus als positives ($[\text{M}+\text{H}]^+$) oder negatives ($[\text{M}-\text{H}]^-$) Signal im MS erscheinen. Weiterhin können durch vorhandene oder zugespeiste Bestandteile des Eluenten (Puffers) Adduktionen ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) gebildet und registriert werden. Beim Elektrospray können außerdem im Gegensatz zum APCI mehrfach geladene Ionen auftreten.

Elektrospray ist eine weiche bzw. sanfte Ionisationsart, die auch für empfindliche („labile“) Moleküle geeignet ist. ESI gehört wie APCI zu den Ionisationsverfahren, bei denen die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet.

Es ist das bevorzugte Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen, da es sehr schonend für das Analytmolekül ist und kaum zu Fragmentierungen führt. Außerdem ist es auch für die Ionisierung hochmolekularer Verbindungen (Proteine) besonders gut geeignet. Weitere Applikationsgebiete für ESI sind z. B. die Bestimmung der Molekülmasse, die Analyse und Sequenzierung von Proteinen und Oligonucleotiden sowie die quantitative Bestimmung von Pharmaka.

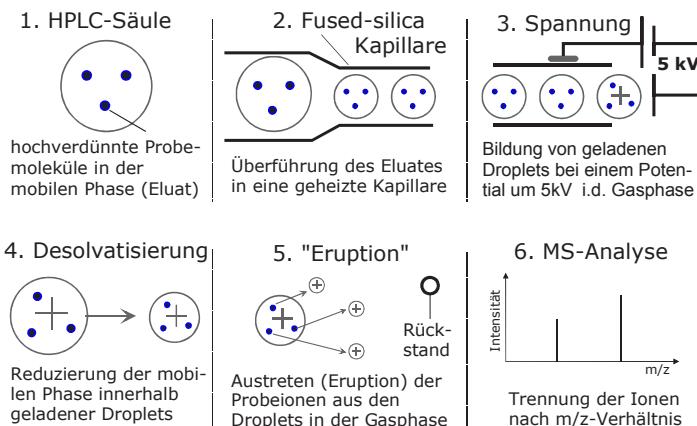


Abb. 12.27 Vorgänge beim Electrospray

12.4.2.4 Applikationen der LC – MS – Kopplungen

Betrachtet werden die vier Aflatoxine B1, B2, G1 und G2. Alle sind durch Basislinientrennungen mittels HPLC separiert und von den einzelnen Species Massenspektren registriert worden. Die Aflatoxine unterscheiden sich in ihren Molekülmassen nur geringfügig, wie aus den Abbildungen 12.28 und 12.29 hervorgeht.

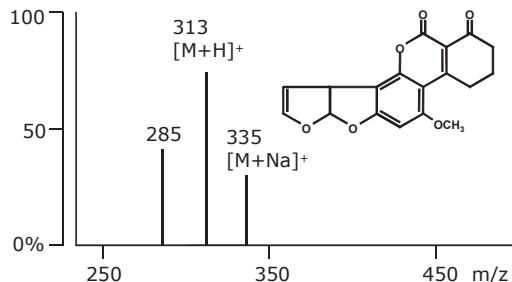


Abb. 12.28 Massenspektrum von Aflatoxin B1 (schematisch)

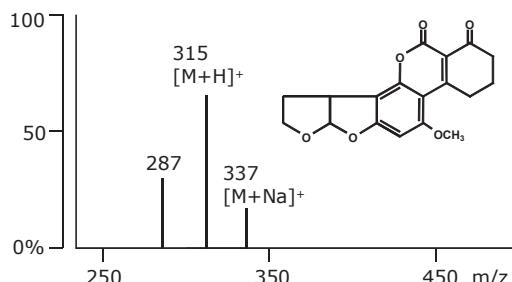


Abb. 12.29 Massenspektrum von Aflatoxin B2 (schematisch)

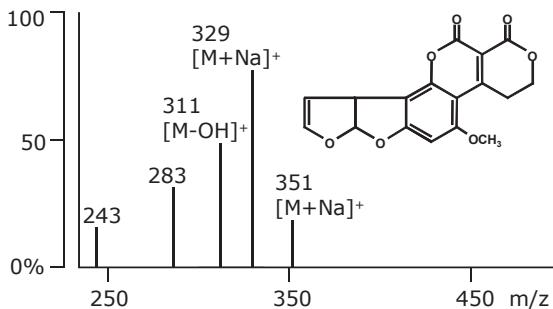


Abb. 12.30 Massenspektrum von Aflatoxin G1 (schematisch)

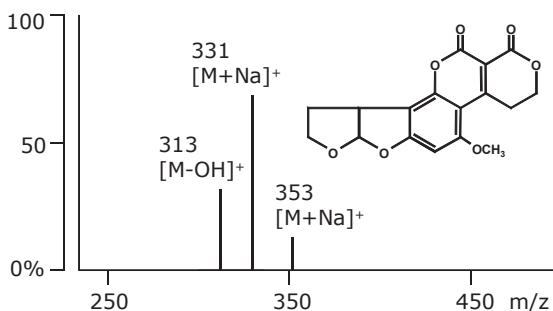


Abb. 12.31 Massenspektrum von Aflatoxin G2 (schematisch)

Die Quasimolekülionen $[M+H]^{+}$ besitzen Massen von 313 (B1) und 315 (B2). Für die Aflatoxine G1 und G2 werden diese Ionen bei 329 und 331 registriert (Abbildung 12.30 und 12.31).

Allerdings unterscheiden sich die Aflatoxine viel deutlicher in ihrer Toxizität. Es sind hochtoxische Stoffwechselprodukte einiger Stämme der Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Bisher wurden ca. 20 verschiedene Typen von Aflatoxinen, die zur Gruppe der Mycotoxine gehören, identifiziert. Die 4 wichtigsten sind die bereits erwähnten Aflatoxine B₁, B₂, G₁, und G₂, deren Toxizität in dieser Reihenfolge abnimmt. Die Buchstaben B und G bezeichnen die blaue bzw. die grüne Fluoreszenzfarbe dieser Verbindungen, während die tiefgestellten Bezieferungen „1“ im Vergleich zu „2“ höhere R_F-Werte innerhalb der früher angewandten Dünnschichtchromatographie bedeuten.

Vor allem das Aflatoxin B₁ gilt als hochpotentes Kanzerogen und kann zu Leber- aber auch Nierenkrebs führen. Besonders Produkte, die aus relativ warmen (Temperaturen: 25–32°C) und gleichzeitig feuchten Regionen stammen, sind für den Befall von Schimmelpilzen und deren Aflatoxine besonders gefährdet. Hier ist eine besonders sorgfältige Lebensmittelüberwachung für derartige Importe notwendig. Dies betrifft vor allem Nahrungsmittel wie Mandeln, Pistazien oder Para-, Hasel- und Erdnüsse.

Bereits geringe Aflatoxinmengen können für den Menschen toxisch und tödlich sein. Nach der Aflatoxinverordnung ist für Lebensmittel nur ein sehr geringer Gehalt erlaubt. So darf die Höchstmenge an Gesamtaflatoxinen in allen Lebensmitteln 4 µg/kg nicht überschreiten. Spezielle für Aflatoxin B₁ gilt ein Grenzwert von 2 µg/kg. Es ist demzufolge eine differenzierte Erfassung dieser Toxine in geringsten Konzentrationen innerhalb der Lebensmittelanalytik erforderlich, wofür die LC-MS-Kopplung gut geeignet ist.

12.4.3 LC – MALDI – TOF – MS

Diese Kopplungstechnik (Abbildung 12.32) ist besonders auf die vertiefte Analytik von synthetischen Polymeren gerichtet. Die Chromatographie-Säule („LC“) enthält eine hydrophobe und in einem weiten pH-Bereich robuste und hydrolyse stabile stationäre Phase (z.B. auf der Basis von Styren-Divinylbenzen). Zur Elution kommen hier organische Eluenten zum Einsatz. Die Kopplung bzw. Strukturbestimmung der Analyte erfolgt mit einem MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight – mass spectrometry*, s. Kapitel 11.7).

Grundlage der LC-Trennung von organischen Polymeren (z.B. Styrol-Oligomere) ist die Gelpermeationschromatographie (GPC). Sie dient der Trennung von organischen Polymeren nach ihrer Molekülmasse und besitzt einen vergleichbaren Trennmechanismus wie die Gelfiltration (SEC, Kapitel 5.3.2). Diese erfordert im Gegensatz zur GPC jedoch hydrophile stationäre Phasen und wässrige Eluenten (physiologische Bedingungen), damit die biologische Aktivität der Proteine bzw. Enzyme bei ihrer Trennung/Reinigung erhalten bleibt.

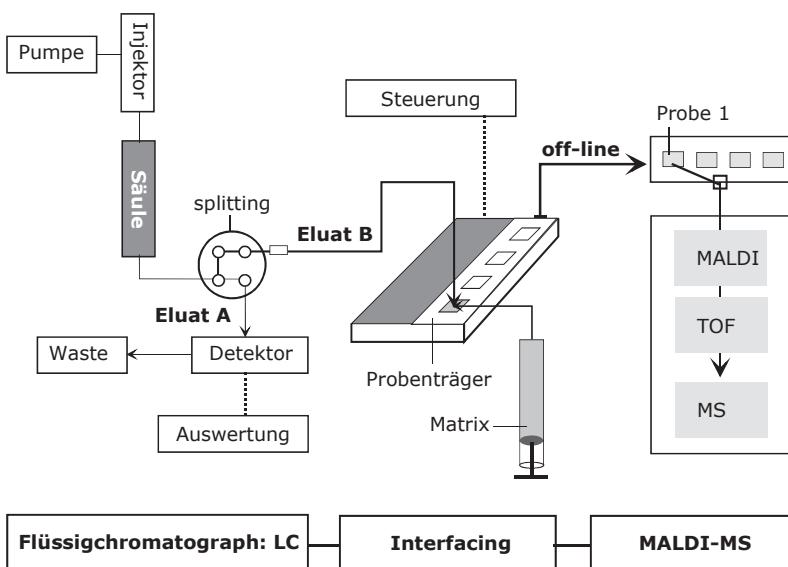


Abb. 12.32 Kopplung LC-MALDI-MS

Das Equipment bietet hier mehrere Möglichkeiten der Polymercharakterisierung. Im einfachsten Fall werden die in der Säule separierten Polymer-Species von einem Detektor (z.B. RI-Detektor, RI: *refractive index* bzw. „Brechungsindex-Detektor“) als eigenständige Peaks erfasst und ausgewertet.

Damit werden jedoch keine strukturellen Informationen über die Polymere gewonnen. Dies erfolgt erst, wenn für die Polymer-Species aussagekräftige Massenspektren aufgenommen werden können. Durch ein vorgeschaltetes Splitting werden die einzelnen Polymerpeaks auf einen Probenträger transferiert und dort mit einer organischen Matrix gemischt (Kapitel 11.7).

Dieser Schritt erfolgt im Off-line-Modus und die mit der organischen Matrix präparierte Polymerprobe wird nachfolgend in das MALDI-TOF-MS überführt.

Hier erfolgt die Trennung nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis und für jedes einzelne Polymer wird eine Molekülmasse ermittelt.

12.4.4 CE – MS

Die Vorteile der Kapillarelektrophorese (CE) bestehen im Vergleich zur LC in der noch höheren Trennleistung und gegenüber der GC darin, dass auch thermolabile und höher molekulare Biosubstanzen analysierbar sind. Die Kombination der CE mit der Massenspektrometrie (Abbildung 12.33) ist deshalb im analytischen Sinne äußerst vielversprechend und hat sich in der Bioanalytik und vor allem in der pharmazeutischen Forschung und Routine (CE von Peptiden bzw. von Arzneimitteln) einen festen Platz erobert.

Allerdings sind die Flüsse der Migrationspuffer sehr gering, so dass im Vergleich zur GC-MS-Kopplung am Ende der Fused-Silica-Kapillare noch ein zusätzlicher Fluss („sheath-flow“) eingespeist werden muss, um die Analyte in das Massenspektrometer erfolgreich zu überführen. Als Interface bzw. Ionenquelle dient ein Electrospray (CE-ESI-MS).

Der auch als *make-up-flow* bezeichnete Zusatzstrom beträgt ca. 2–10 µl/min. Er liefert die Gegenionen für die CE-Trennung und erhöht die Stabilität des Electrosprays. Zu beachten ist auch, dass MS-kompatible und leichtflüchtige Puffer wie Ameisensäure oder Ammoniumsalze eingesetzt werden.

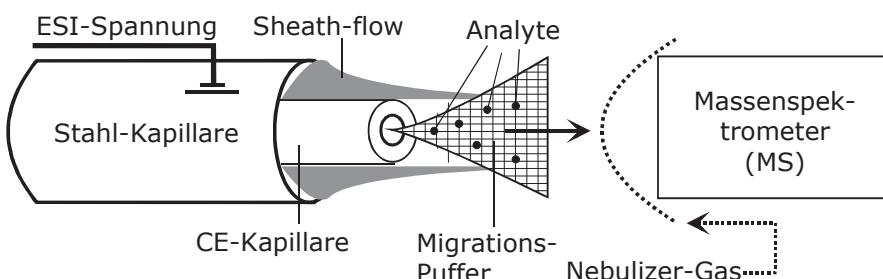


Abb. 12.33 Kopplung CE-MS

12.5 Trennmethode – Spektroskopie

12.5.1 LC – DAD

Eine HPLC-Apparatur ausgestattet mit einem UV/VIS-Detektor stellt noch keine Kopplungstechnik (KT) dar. Erst wenn neben der Registrierung der Elutionskurve bei konstanter Wellenlänge zusätzlich im On-line-Betrieb in den Peakmaxima der Analyte UV/VIS-Spektren mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) registrierbar sind, handelt es sich um eine „hyphenated technique“.

Das Prinzip der LC-DAD-Technik ist in der Abbildung 12.34 schematisch dargestellt. Grundlage ist eine herkömmliche HPLC-Apparatur mit den speziellen Detektionsmöglichkeiten im UV/VIS-Bereich. Die in der Säule getrennten Analyte können nach Passieren der Durchflussküvette bei einer Wellenlänge (λ_1) registriert werden, so dass ein entsprechendes Chromatogramm resultiert.

Beim Arbeiten mit dem DAD kann das ausgesandte Licht (oder ein definierter Bereich) des ultravioletten und/oder sichtbaren Spektralbereiches in der Durchflussküvette von den einzelnen Analyten absorbiert und als abgeschwächte Strahlung zum Gitter-Monochromator weiter geleitet werden. Mit hochauflösenden Gittern wird die elektromagnetische Strahlung in einzelne Wellenlängen ($\lambda_0 \dots \lambda_n$) aufgetrennt. Die verbliebene Energie jeder Wellenlänge (z.B. 210, 254, 420, 756 nm) gelangt nun zu den separaten Photodioden. Hunderte dieser Dioden (z.B. 1 024) in einem „Array“ registrieren alle Wellenlängen gleichzeitig, und zwar im Millisekundenbereich, so dass eine On-line-Spektrenregistrierung während des Chromatogramm-Lauf möglich ist (s. Abbildungen 12.36–12.38).

Dioden Arrays sind Halbleiterbauelemente (Chips), auf denen die Photodioden der Reihe nach angeordnet sind. Jede dieser zahlreichen Dioden ist mit einem entsprechenden Kondensator und schaltbaren Transistor integriert vernetzt und mit der Außenelektronik verbunden. Der elektronische Abfragezyklus der Photodioden beinhaltet in zeitlicher Reihenfolge mehrere Teilabschnitte. Dazu gehören u.a. das Aufladen der Kondensatoren auf einen konstanten Wert und die partielle Entladung je nach Lichtintensität durch den Photostrom der Dioden. Es schließt sich ein sequentielles Nachladen der Kondensatoren an und der Ausgangswert wird erreicht. Dies erfolgt durch kurzzeitiges Schließen (aller 10 ms!) der Transistororschaltung (Abfragezyklus: es entsteht ein Primärspektrum). Der Strom, der nachgeladen wird, ist letztendlich das „Messsignal“. Es schließt sich die elektronische Weiterverarbeitung der Primärspektren vom Photodiodenarray-Detektor an. Essentiell für eine On-line-Registrierung der Primärspektren während der LC-Trennung sind die äußerst kurzen Zeitabstände im Bereich von 10–40 ms. Es folgen weitere Speicherungen und Korrekturen der Messwerte (Dunkelstrom, Extinktionswerte), so dass im Endeffekt die Spektren in dreidimensionaler Form (Zeit–Wellenlänge–Extinktion) gespeichert werden und abrufbar sind.

Abbildung 12.34 zeigt, dass nach der LC-Trennung die Analyte nach Passieren der Durchflussküvette des DAD im Millisekunden-Bereich registriert werden.

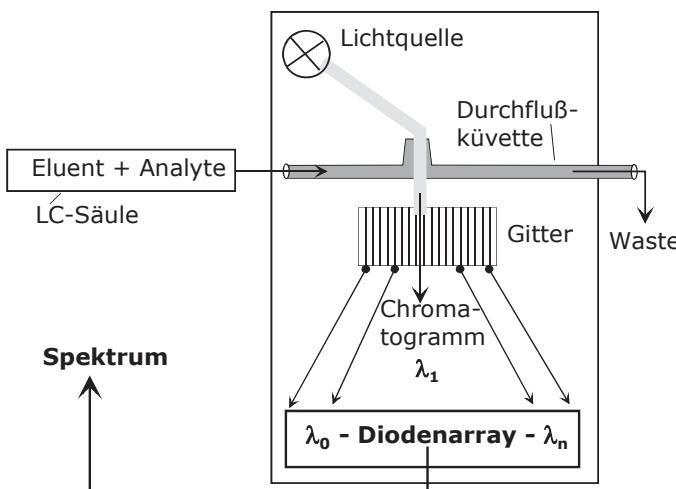


Abb. 12.34 Schematische Darstellung der LC-DAD-Kopplung

Die LC-DAD-Kopplung gilt für zahlreiche analytische Applikationen und Fra gestellungen als etablierte Methode. So liefert sie wertvolle Beiträge zur Identifizierung von Medikamenten oder auch Drogen (Drogenscreening) nach Vergiftungen. Mageninhalte oder biologische Flüssigkeiten wie Serum oder Urin können nach einem Suizid mittels LC-DAD analysiert werden. Toxische Substanzen oder überdosierte Schlafmittel werden erkannt und sind anhand der DAD-Spektren nach dem Abgleich mit einer Datenbank identifizierbar.

Auch in der Forschung über kanzerogene Substanzen liefert die LC-DAD-Technik aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich der Bestätigung neu entstandener Molekülstrukturen, z.B. nach gezielter Metabolisierung des polycyclischen aromatischen Kohlenwassersoffes Anthranthen (Abbildung 12.35).

Bei diesen Experimenten wurde das Anthranthen mit Rattenleber-Mikrosomen (P 450 mischfunktionelle Oxygenasen), mit einem Puffer sowie mit NADPH versetzt, um Sauerstoff in das Anthranthenmolekül einzuführen. In einer Phase-1-Reaktion (Oxidation) werden demzufolge u.a. Strukturen wie Chinone, Epoxide oder Phenole erwartet. Da das Anthranthen selbst über ein ausgedehntes π -Elektronensystem verfügt, resultieren für diesen Aromaten und seine Metaboliten signifikante UV/VIS-Spektren, die für entsprechende Substanzidentifizierungen sehr gut geeignet sind.

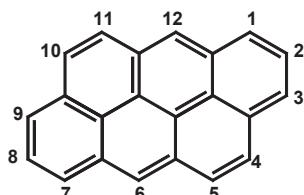


Abb. 12.35 Anthranthen-Struktur

Zuerst steht jedoch die Auswahl und Optimierung eines geeigneten Trennsystems. Anhand der folgenden Chromatogramme (Abbildungen 12.36 A und B) wird angedeutet, dass in Abhängigkeit der Selektivität der Trennsäule ganz unterschiedliche chromatographische Auflösungen und „Peak-Pattern“ resultieren. Teilweise kommt es zu Koelutionen der PAK- bzw. Anthranthen-Species. Für die Aufnahme und Identifizierung einzelner Metabolite wurden singuläre Peaks aus beiden Chromatogramm-Läufen ausgewählt, um möglichst eindeutige Identifizierungen anhand der DAD-Spektren zu erreichen.

Die Spektren von vier Anthranthen-Metaboliten (s. Abbildungen 12.37, 12.38), die in einer Phase-1-Reaktion entstanden, sollen die Leistungsfähigkeit und Aussagekraft der LC-DAD-Kopplung nachweisen.

Grundlage der Spektrenvergleiche sind Anthrathen-Metabolite, die synthetisch hergestellt und deren Spektren nach LC-Trennung in einer Bibliothek (*Library-Spektrum*) innerhalb der Software der LC-DAD-Kopplung hinterlegt wurden. Für einige aus den Metabolisierungsversuchen resultierenden Species wurden identische Retentionszeiten ermittelt und auch die Spektrenvergleiche (*Target-Spektrum*) sind in diesen ausgewählten Beispielen signifikant.

Für das Anthranthen-1,6-chinon (Abbildung 12.37 A) wird nach den Spektrenvergleichen ein Matchfaktor von 997 (1 000 würde eine 100%-ige Übereinstimmung von Library- und Target-Spektrum bedeuten) ermittelt. Der für die „zweitplazierte“ Struktur (Antranthen-3,6-chinon) erfasste Faktor beträgt lediglich 689. Dieses Anthranthren-derivat wurde an einer anderen Stelle im Chromatogramm identifiziert. Der Spektrenvergleich (Abbildung 12.37 B) zeigt mit einem Matchfaktor von 984 einen ausreichend guten Nachweis für das Anthranthen-3,6-chinon. Zwei weitere Aromaten (Abbildung 12.38, A: Anthranthen-3-phenol, B: Anthranthen-6,12-chinon) konnten mit der Methode auch sicher identifiziert werden.

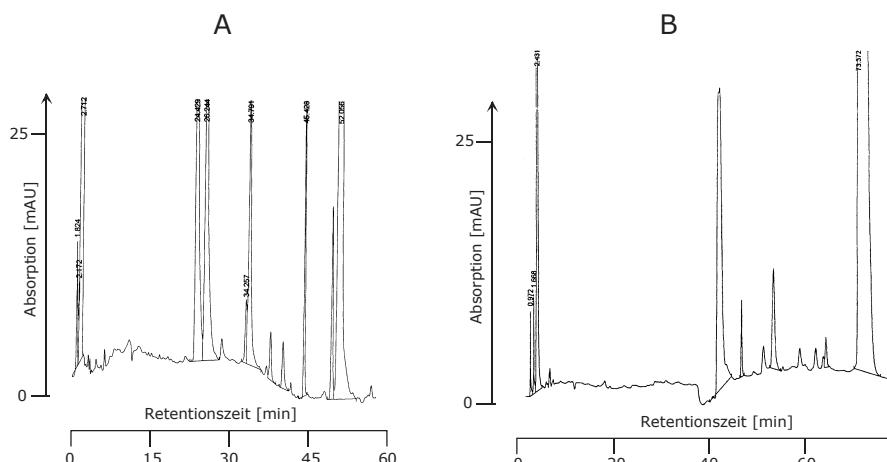


Abb. 12.36 RP-Chromatogramme von Anthranthen-Metaboliten, die an einer RP-2-(A) und RP-18-Phase (B) getrennt wurden

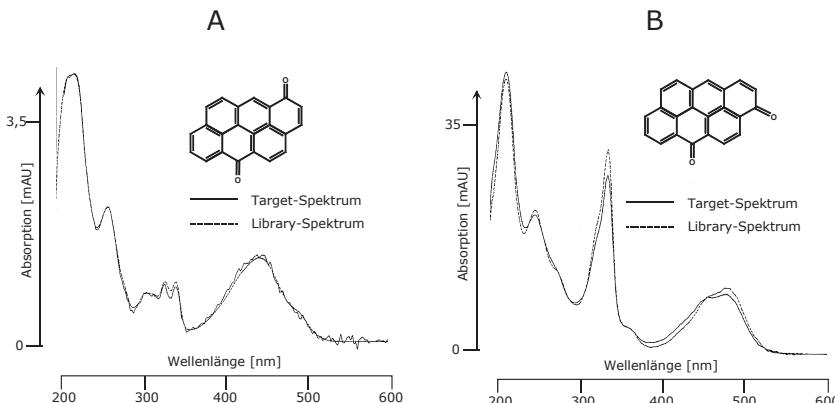


Abb. 12.37 Spektren von A: Anthanthren-1,6-chinon, B: Anthanthren-3,6-chinon

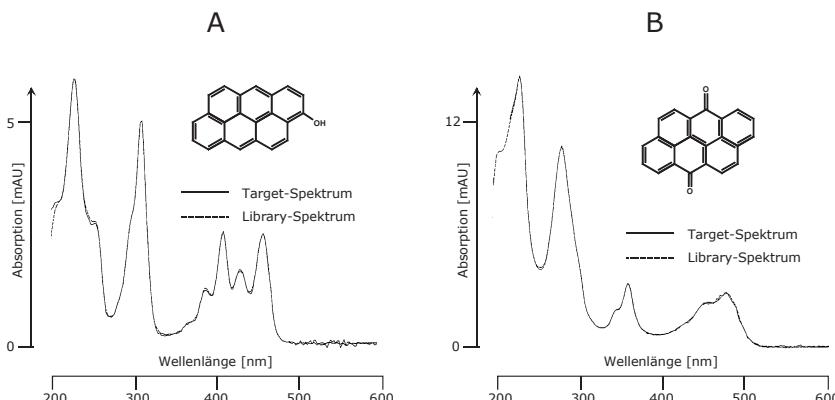


Abb. 12.38 Spektren von A: Anthanthren-3-phenol, B: Anthanthren-6,12-chinon

12.5.2 LC – pcr – VIS

Diese Kopplungstechnik verbindet die Flüssigchromatographie (LC: *liquid chromatography*) mit der Spektroskopie des sichtbaren Bereiches (VIS: *visible*). Nach der Trennsäule und noch vor der Detektion findet eine Reaktion mit dem Analyten statt („pcr“: *post column reaction*). Die Einordnung in die Rubrik „Trennmethoden – Spektroskopie“ resultiert demzufolge aus den Funktionsweisen der einzelnen Kopplungskomponenten. Zuerst erfolgt eine flüssigchromatographische Trennung der Analyte in einer LC-Säule. Diese kann als stationäre Phase polare Adsorbentien, unpolare Reversed-Phase-Material oder Ionenaustauscher enthalten. Ziel ist es, die einzelnen Komponenten mit ausreichend guter Auflösung bzw. mit Basislinientrennung zu chromatographieren.

In diesem Falle wäre ein üblicher HPLC-Detektor zur Registrierung der Peaks ausreichend. Ist diese Detektion nicht empfindlich genug, bietet sich eine Derivatisierung der Analyte an. Die Kopplung mit Reagenzien, die π -Elektronen im Molekül enthalten, erhöht die Sensitivität des Analytnachweises. Oft resultieren farbige Verbindungen, die im sichtbaren Bereich, in dem andere Analyte oft gar nicht registriert werden, sehr empfindlich nachweisbar sind.

Ein entsprechendes Equipment für diese Kopplungstechnik ist in der Abbildung 12.39 gezeigt. Eine zweite Pumpe wird für die Zudosierung der Reagenzlösung benötigt. Das Eluat mit Analyt und das Derivatisierungsreagenz treffen nun in einer Mischkammer zusammen. Sind die Reaktionsbedingungen wie Temperatur und/oder Zeit ausreichend, findet die Derivatisierung sofort statt („*pcr*“: *post column reaction*) und das stark absorbierende Reaktionsprodukt kann nach kurzer Überführung innerhalb der Durchflusszelle des Detektors registriert werden.

Erfordert die Derivatisierung eine längere Reaktionszeit und außerdem höhere Temperaturen, ist ein Reaktor erforderlich. Dieser besteht meist aus einem thermostatisierten „Coil“ mit möglichst geringem Totvolumen, so dass Peakverbreiterungen und damit Verluste des Trennvermögens zwischen den einzelnen Komponenten möglichst gering gehalten werden. Die Detektion des Reaktionsproduktes im sichtbaren Spektralbereich bedeutet oft nicht nur eine Verbesserung der Sensitivität sondern auch der Selektivität. Nicht reaktionsfähige Komponenten, die möglicherweise mit den Zielanalyten koeluiieren, werden nicht registriert.

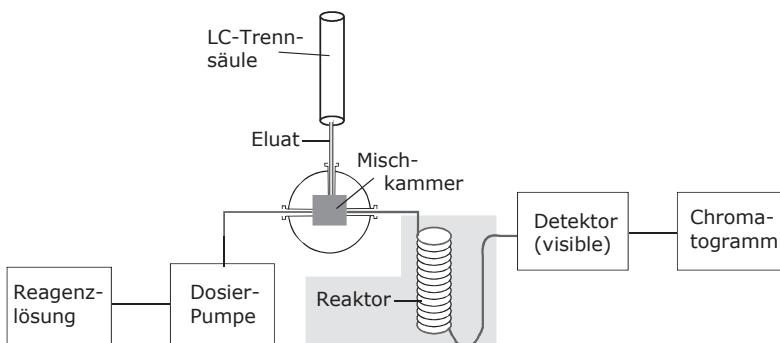


Abb. 12.39 Kopplung der LC mit einer Nachsäulenreaktion und VIS-Detektion

12.5.3 CGC – FTIR

Die Kapillargaschromatographie (CGC: *capillary gas chromatography*) wird mit der Fouriertransformspektroskopie (FTIR: *fourier transformed infrared spectroscopy*) gekoppelt. Mittels FTIR werden charakteristische Schwingungen und auch Rotationen von Molekülen erfasst. Sie geben darüber Auskunft, auf Grund welcher signifikanter funktioneller Gruppen und Bindungen (Tabelle 10.3) eine unbekannte Verbindung näher charakterisiert bzw. identifiziert werden kann.

Das Potential der Kapillar-GC liegt im hohen Trennvermögen von leicht verdampfbaren und flüchtigen Analyten mit meist geringer Molekülgröße.

Die Kopplung GC-FTIR bietet damit eine beträchtliche Erweiterung der analytischen Möglichkeiten, da auch von Einzelsubstanzen in Gemischen Infrarotspektren erhalten werden. Auf dem Gebiet der Geruchs- und Aromastoffe hat sich die Kopplung gut etabliert. Die Gaschromatographie ist für die Analytik dieser leicht-flüchtigen Stoffe in alkoholischen Getränken, Parfümen, Tee-/Kaffee-Extrakten prädestiniert; mit der FTIR werden zusätzlich strukturelle Informationen erzielt.

Die technische Realisierung dieser Kopplung geht aus dem folgenden Blockschema (Abbildung 12.40) hervor. Die Probe wird über einen Injektor auf die GC-Kapillarsäule appliziert. Damit werden die Probenverdampfung und die Separation der Analyte im gasförmigen Zustand realisiert. Über eine Transfer-Kapillare erfolgt danach die Überführung der Analyte in das schnell registrierende FTIR-Analysensystem. Herzstück ist eine sehr kleine Gasdurchflussmesszelle (100–200 μm i.D.), die als „Light-Pipe“ (Abbildung 12.41) bezeichnet wird. Sie besteht aus Borsilikat und ist an der Innenwand mit Gold beschichtet. Kontinuierlich können nun IR-Interferogramme, die die spektrale Information enthalten, von den einzelnen Substanzen aufgenommen werden.

Die IR-Strahlung, die von einem Globar emittiert wird, passiert nach dem Durchlaufen einiger Umlenkspiegel die Durchflussmesszelle und wird von einem empfindlichen MCT-Detektor, der mit flüssigem Stickstoff auf -196°C gekühlt wird, registriert. Herzstück des Detektors ist ein Element bestehend aus einer Quecksilber-Cadmium-Tellur-Legierung (MCT: *mercury, cadmium, telluride*).

Die mit dem MCT-Detektor registrierten IR-Interferogramme werden über Fourier-Transformationen in IR-Spektren umgewandelt (s. Kapitel 10.4.3).

Allerdings unterscheiden sich diese Gasphasen-IR-Spektren von den Standard-IR-Spektren, so dass die Interpretation teilweise erschwert ist.

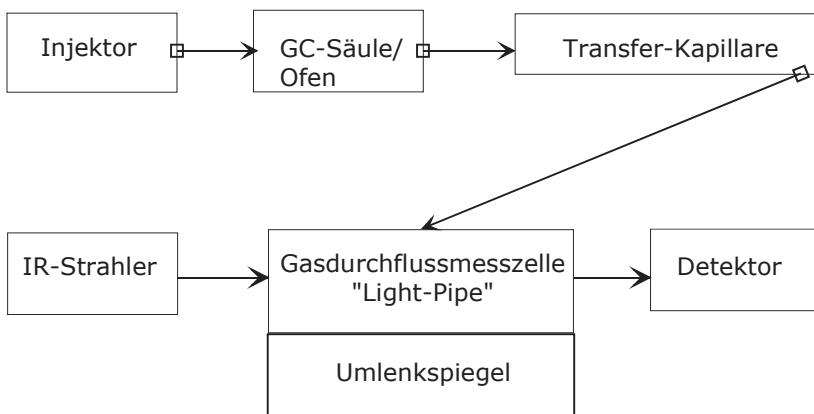


Abb. 12.40 GC-FTIR-Kopplung (Blockschema)

Auch für die Light-Pipe werden neben den günstigen Kosten auch einige Nachteile beschrieben. Dies betrifft die relativ geringe Empfindlichkeit sowie mögliche Reaktionen der Analyte, die bei hohen Temperaturen > 200°C an aktiven Schichten der Kapillarinnenwand auftreten können.

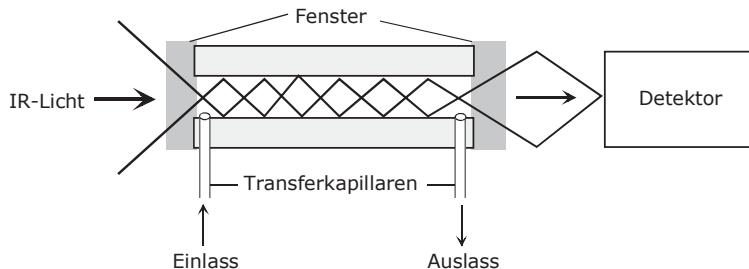


Abb. 12.41 Light-Pipe (schematisch)

12.5.4 LC – NMR

Die On-line-Kopplung LC-NMR (*liquid chromatography – nuclear magnetic resonance*) besitzt einen sehr hohen Informationsgehalt für Strukturaufklärungen vor allem von Naturstoffen. Die Abbildung 12.42 zeigt ein Blockschema, das die wesentlichsten Elemente dieser Kopplung enthält. Zwischen dem am Ende einer HPLC-Apparatur über Verbindungskapillaren angeschlossenen UV/VIS-Detektor und dem NMR-Spektrometer wird ein computergesteuertes Schaltventil-Modul (BPSU: *Bruker Peak Sampling Unit*) positioniert. Detailliertere Angaben zum NMR-Geräteaufbau geht aus der Abbildung 10.57 hervor. Weitere Darstellungen zu den LC-NMR-Kopplungen enthält die Firmenliteratur (Bruker BioSpin: LC-NMR/MS, Varian: NMR-Spectrometer Systems with VNMR 6.1C Software).

Derartige Operationstechniken zeigen die Abbildungen 12.43–12.46. So erfolgen die Aufnahmen von NMR-Spekten in einem kontinuierlichen Fluss. Hier muss die begrenzte Aufnahmezeit für ^1H -NMR-Spektrum beachtet werden, weshalb diese Methode hohe Probenkonzentrationen erfordert. Bei der Stopped-Flow-Technik wird die LC-Trennung zu einem gewünschten Zeitpunkt angehalten und die NMR-Messzeit kann der jeweiligen Probenkonzentration angepasst werden.

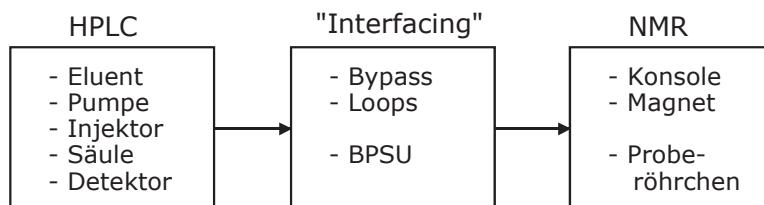


Abb. 12.42 Blockschema HPLC-NMR-Kopplung (stark vereinfacht)

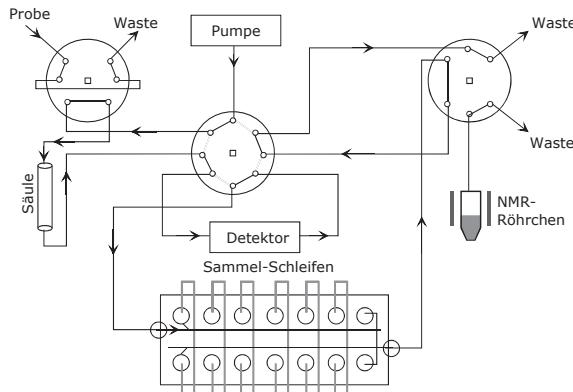


Abb. 12.43 LC-NMR-1: Fluss-Schaltbild für „Collecting Separated Peaks“

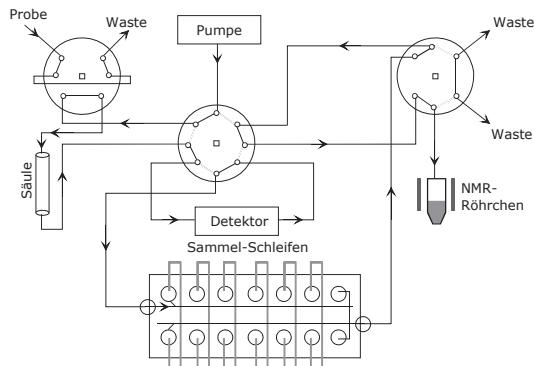


Abb. 12.44 LC-NMR-2: Fluss-Schaltbild für „On-Flow“

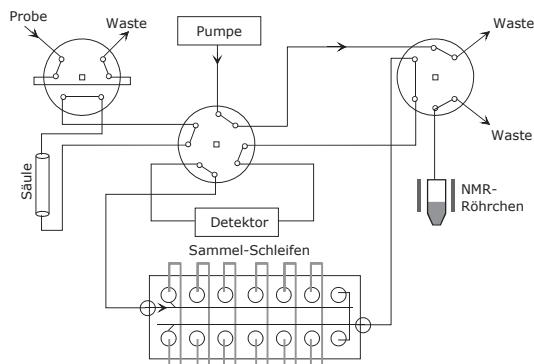


Abb. 12.45 LC-NMR-3: Fluss-Schaltbild für „Stopped-Flow“

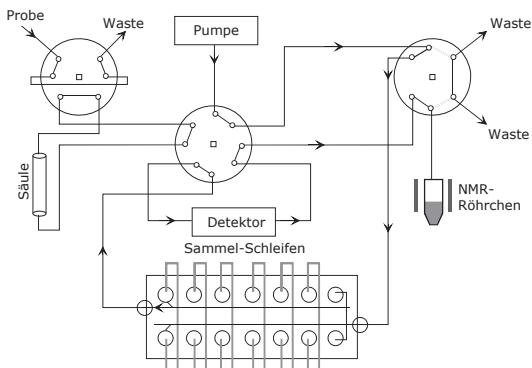


Abb. 12.46 LC-NMR-4: Fluss-Schaltbild für „Loop-Elution“

12.6 Literatur

- Albert K (2002) On-line LC-NMR and Related Techniques, John Wiley & Sons
 Ardrey RE (2003) Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, John Wiley & Sons
 Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Acad Verlag
 Gey MH (1998) Instrumentelle Bioanalytik, Friedr Vieweg & Sohn Verlag Braunschweig Wiesbaden
 Gross JH (2004) Mass Spectrometry, Springer-Verlag Heidelberg
 Lee MS (2002) LC/MS Applications in Drug Development, John Wiley & Sons
 Lehmann WD (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
 Lieber DC (2002) Introduction to proteomics, Humana Press Totowa New Jersey
 Lottspeich F, Engels JW (2006) Bioanalytik, Spektrum Acad Verlag München
 Kellner R, Lottspeich F, Meyer HE (1994) Microcharacterization of Proteins, VCH-Verlag Weinheim
 Otto M (1995) Analytische Chemie, VCH-Verlag Weinheim
 Pasch H, Schrepp W (2003) MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers, Springer-Verlag Heidelberg
 Schröder E (1991) Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen, Springer-Verlag Heidelberg
 Schwedt G (1995) Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme Verlag Stuttgart
 Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S (2002) A Global View of LC/MS, Global View Publishing Pittsburgh USA

Man müßte Gott selber sein, um Erfolge
und Mißerfolge unterscheiden zu können.

Anton Tschechow

13 Omics – Proteomics

13.1 Einführung in die „OMICs“-Techniken

Der Begriff „OMICs“ (dt.: -omiks) hat sich in den vergangenen Jahren für die Bezeichnung zahlreicher Fachgebiete (Tabelle 13.1) fest etabliert. „OMICs“ kennzeichnet als adjektivische Nachsilbe Teilgebiete der modernen Biologie, die sich mit der Analyse von Gesamtheiten ähnlicher Einzelelemente beschäftigen. Unterdes ist diese Nachsilbe in vielen anderen Disziplinen sehr „beliebt“, so dass hier für das Fachgebiet wichtige „OMICs“ aufgeführt werden.

Tabelle 13.1 Naturwissenschaftliche Gebiete mit der Bezeichnung „-OMICs“

Einzelement	Gesamtheit	Fachgebiet
Gen	Genom	Genomics
Transcript (mRNA)	Transcription	Transcriptomics
Metabolit	Metabolom	Metabolomics
Protein	Proteom	Proteomics

Das „Genom“ (Erbgut) eines Lebewesens ist die Gesamtheit der vererbaren Informationen einer Zelle, die als DNA vorliegt. Es enthält die Informationen, die zur Ontogenese (Entwicklung) und zur Ausprägung der spezifischen Eigenschaften des Lebewesens erforderlich sind. Diese Informationen sind in der Basensequenz der DNA enthalten. Der Begriff wurde 1920 von Hans Winkler geprägt. Die Erforschung des Genoms und die Wechselwirkung der darin enthaltenen Gene wird als Genomik (*genomics*) bezeichnet.

Die Bezeichnung „Metabolom“ wurde in Analogie zu den Begriffen Genom und Proteom geprägt. Das Metabolom umfasst charakteristische Stoffwechsel-Eigenschaften (Metabolit-Spiegel, Enzymaktivitäten, Interaktionen, Kompartimentierung) einer Zelle. Weitere Gesichtspunkte sind der Effekt von Wirksubstanzen auf den Stoffwechsel und die verschiedenen Funktionen der Zellen, wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Im besonderen Fokus von *metabolomics* steht die Analytik von Pharmaka-Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten (Urin, Serum) mit Hilfe von Kopplungstechniken (LC-MS, GC-MS).

13.2 Das Proteom und seine Beeinflussung

Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen (Zelle, Gewebe, Kompartiment) unter exakt definierten und vergleichbaren Bedingungen wird als Proteom bezeichnet (Proteom des Menschen, der Kartoffelknolle, der Bakterienzelle). Der Begriff Proteom wurde 1994 von dem Australier Mark Wilkins auf einem wissenschaftlichen Kongress zur Proteomforschung in Siena (Italien) geprägt.

Dies erfolgte in Anlehnung und Analogie zu den bereits etablierten Bezeichnungen Genom und Transkriptom (Summe der von der DNA in die RNA übergeschriebenen Gene bzw. die Gesamtheit aller in einer Zelle hergestellten RNA-Moleküle). Unter der Bezeichnung „Transkriptomik“ versteht man die Studie der mRNA-Expression einer Zelle.

Das Proteom wird permanent von den verschiedensten Faktoren (Abbildung 13.1) beeinflusst. Dies führt auch zu strukturellen Veränderungen.

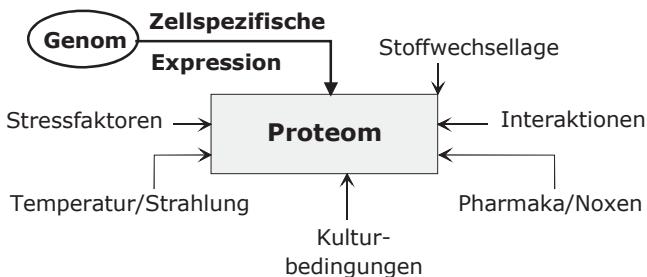


Abb. 13.1 „Einflüsse“ auf das Proteom

Das Proteom steht weiterhin in einem Gleichgewicht ständiger Neusynthese von Proteinen bei gleichzeitigem Abbau nicht mehr benötigter Proteine. Hinzu kommen die posttranskriptionalen Modifikationen (Abbildung 13.2), die vor allem für die Änderungen in den einzelnen Proteinen interessant sind. Damit ist das Proteom im Gegensatz zum relativ statischen Genom ständig Änderungen in seiner Zusammensetzung unterworfen.



Abb. 13.2 Mögliche posttranskriptionale Modifikationen

Diese Modifikationen werden über komplexe Regulationsprozesse gesteuert und sind maßgeblich durch Umwelteinflüsse und Schadstoffe (Noxen) sowie Krankheiten und Pharmaka beeinflussbar. Das Proteom ist somit hoch dynamisch und eine Art Spiegel seiner Umgebung.

13.3 Proteomics vs. „klassische“ Proteinanalytik

Jeder Zelltyp enthält Tausende von Proteinen und oft unterscheiden sich Proteine mit der gleichen Funktion von Art zu Art (oder sogar zwischen Individuen einer Art). Während einige Proteine sehr häufig vorkommen, liegen regulatorische Proteine oft nur in wenigen Kopien in einer Zelle vor.

Wenn ein unbekanntes Protein gereinigt werden soll, müssen häufig mehrere chromatographische Methoden verwendet werden. Ihre Auswahl ist dabei oft mehr oder weniger empirisch; im besten Fall kann man auf Erfahrungen mit einem ähnlichen Protein zurückgreifen. Manchmal lässt sich ein Protein mit einer bestimmten Methode zwar reinigen, verliert aber dabei seine spezifische Aktivität. Da diese Aktivität oft das einzige ist, was man von einem noch nie zuvor isolierten Protein kennt, lässt sich das gesuchte Protein dann nicht mehr in der Probe nachweisen und die Aufreinigung muss von vorn beginnen. Wichtig ist vor allem, das richtige Ausgangsmaterial für die Aufreinigung des Proteins zu wählen und sich über die spätere Verwendung des Proteins im Klaren zu sein.

Tabelle 13.2 Klassische Proteinanalytik versus Proteomics

„Klassische“ Proteinanalytik	Proteomics
→ Isolierung, Hochreinigung und Konzentrierung in vielen Stufen,	Isolierung, „Grobreinigung“,
→ Einzelne(s) Protein/Proteine,	Proteinmischung (einer Zelle),
→ Komplette Sequenzanalyse,	Partielle Sequenzanalyse,
→ Struktur und Funktionen des Proteins stehen im Fokus,	Identifizierung der Proteine durch MS und Datenbanken-Abgleich,
→ „Struktur-Biochemie“	„System-Biochemie“

13.4 Strategien in der Proteom-Analytik

Ziel der Proteomanalytik ist, die Proteine möglichst einer ganzen Zelle zu erfassen, zu identifizieren und die Ergebnisse mit denen einer anderen (pathologischen) Zelle zu vergleichen und entsprechende Schlussfolgerungen daraus zu ziehen (Punkt 1: *Wissenschaftliche Fragestellung*). Die Isolierung der Proteine aus einer komplexen biologischen Matrix (Zelle, Kompartiment, Organismus) und die anschließende „Präanalytik“ (s. Kapitel 3.3) sind sehr sorgfältig durchzuführen.

Dazu gehören auch die enzymatischen Spaltungen der Proteine („Verdau“) (Punkt 2: *Probenvorbereitung*). Als Trennsystem ist vor allem die 2-D-Elektrophorese (s. Kapitel 8.3 und 12.3.4) für die Separation der Proteine in *proteomics* kommerziell eingeführt worden. Aber auch Micro-LC, Kapillarelektrophorese (CE, Kapitel 8.4) und andere miniaturisierte Analysentechniken sind geeignet und werden methodisch weiter entwickelt (Punkt 3: *Trennsysteme für Proteine in der Proteomanalytik*). Weitere Aufgaben innerhalb *proteomics* sind die massenspektrometrischen Analysen von Proteinen mittels MALDI-MS bzw. LC-ESI-MS/MS (Punkt 4: *Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen*).

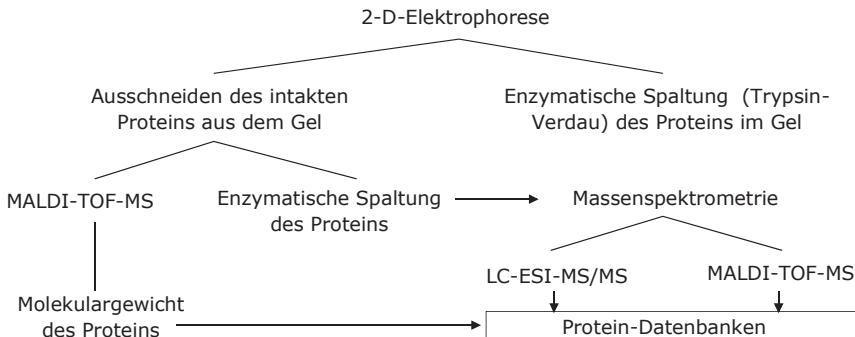


Abb. 13.3 Strategie-I in der Proteomanalytik

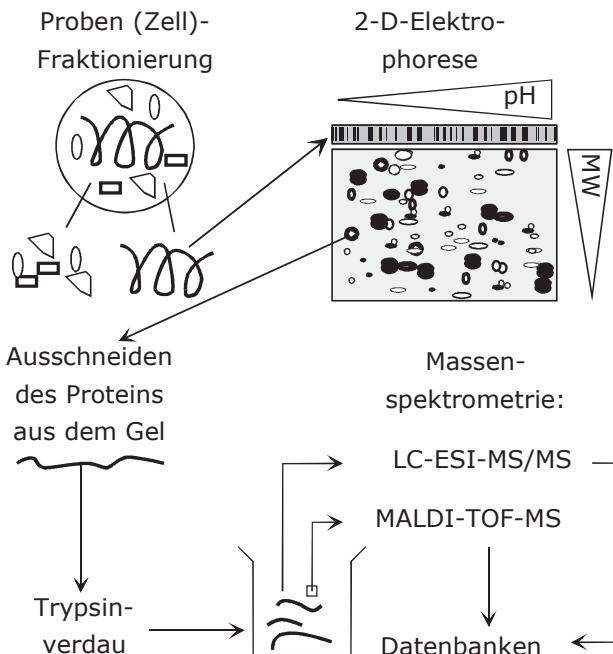


Abb. 13.4 Strategie-II in der Proteomanalytik

Schließlich erfordert die endgültige Identifizierung der Proteinmuster und Interpretation der Ergebnisse elektronische Bildverarbeitungs- und Datenbank-Programme, um einen aussagekräftigen Informationsgewinn zu erzielen. Infolge der extremen „Datenfluten“ kann der Proteomanalytiker zeitweilig überfordert werden. Insofern sollen hier einfache Beispiele und Strategien für eine erste Einarbeitung in die Proteomanalytik vorgestellt werden (Abbildungen 13.3, 13.4).

13.4.1 Zweidimensionale Elektrophorese

Die 2-D-Elektrophorese kombiniert zwei Trenntechniken, die Isoelektrische Fokussierung (IEF) und die SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteine werden zuerst nach Ladung und danach nach Molekulargewicht getrennt (s. Kapitel 8.3.6, und 8.3.7 und 12.3.4).

Heute werden für die Isoelektrische Fokussierung meistens immobilisierte pH-Gradienten genutzt, die kommerziell als streifenförmige Fertiggele mit verschiedenen pH-Bereichen und Längen erhältlich sind. Sie können entsprechend des isoelektrischen Punktes (pI) der zu trennenden Proteine und der gewünschten Auflösung ausgewählt werden. Bei der IEF wandern die Proteine im elektrischen Feld unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 2% nichtzwitterionischen Detergenzien wie Triton X-100 bzw. CHAPS) sowie unter reduzierenden Bedingungen (Mercaptoethanol, Dithiothreitol) im pH-Gradienten bis zu ihrem pI. An diesem Punkt bleiben die Proteine im Gel liegen, da sie keine Nettoladung mehr besitzen und sich deshalb im elektrischen Feld nicht mehr bewegen können.

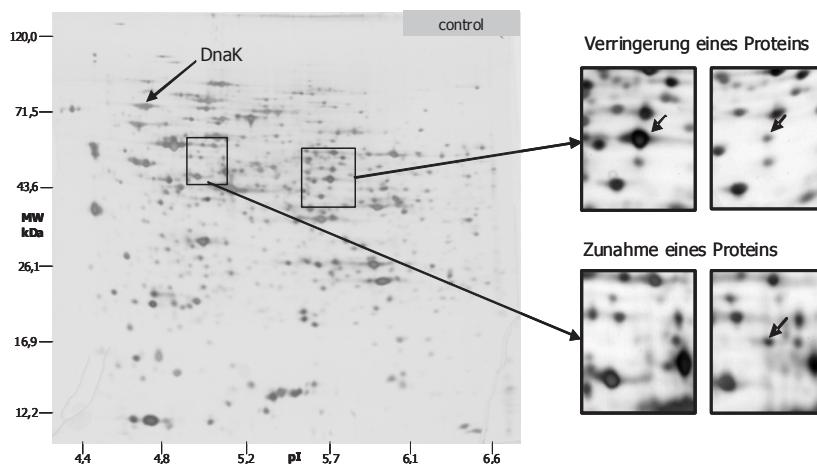


Abb. 13.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen von *Pseudomonas putida* KT 2440 [Mit freundlicher Unterstützung und Genehmigung von Dirk Benndorf et al. (2006) Proteomics 6:3319].

DnaK: Hitzeschockprotein DnaK, identifiziert mit MALDI-TOF-MS (siehe Abbildung 13.7 und Tabelle 13.4).

Die IEF-Gele werden nach der Fokussierung in einer SDS-haltigen Lösung zum Austausch der Detergenzien inkubiert, auf die Oberfläche eines SDS-Gels gelegt und mit Agarose fixiert. Nach der Trennung in der 2. Dimension nach Molekülgrößen und einer Färbung der Proteine (Coomassie, Silber, Fluoreszens) erhält man ein zweidimensionales Punktmuster, dass mit Hilfe einer Software qualitativ und quantitativ ausgewertet werden kann.

Je nach gewünschter bzw. erforderlicher Auflösung kann die zweidimensionale Elektrophorese in Minigelen ($6\text{ cm} \cdot 9\text{ cm}$) oder in großen Gelen ($24 \cdot 20\text{ cm}$) durchgeführt werden. Während Minigele mit einem Arbeitsaufwand von weniger als zwei Tagen für neue Proben entsprechend optimiert werden können, erfordern große Gele innerhalb der Methodenoptimierung ca. 3 bis 4 Tage, wobei aber auch hohe Auflösungen von bis zu 2 000 Spots pro Gel erreicht werden.

Die hohe Trennleistung macht die 2-D-Elektrophorese als analytische Methode attraktiv, jedoch gibt es auch eine Reihe von Nachteilen:

1. Die Qualität der Trennung hängt stark von der Qualität der Probenvorbereitung der Proteinfraktion ab. Daraus resultiert z.T. ein hoher Arbeitsaufwand für die Reinigung (z.B. Entsalzung) und Anreicherung der Proteine.
2. Es wird vor allem der Verlust vieler hydrophober Proteinen (insbesondere Membranproteine) beobachtet, da sie sich schlecht in den verwendeten Puffern für die Isoelektrische Fokussierung lösen.
3. Trotz entsprechender Software ist ein hoher Aufwand für die Auswertung der Ergebnisse erforderlich.
4. In 2D-Gelen werden auch bei sensitiven Färbungen (Fluoreszens, Silber) nur Proteine mit hohen Kopienzahlen in der Zelle erfasst.

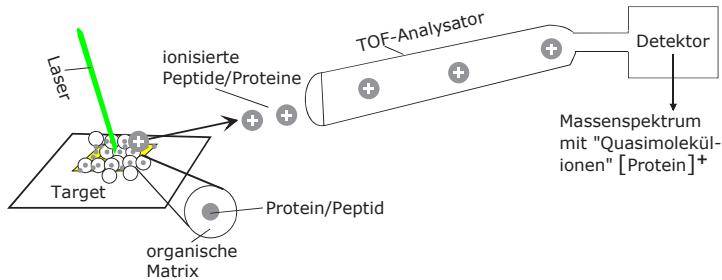
13.4.2 MALDI - TOF – MS und Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Die Identifizierung von Proteinen aus ein- oder zweidimensionalen Gelen erfordert ihre Extraktion aus der Gelmatrix. Außerdem ist eine Identifizierung allein durch die Messung des Molekulargewichts des intakten Proteins nicht möglich, da es zu viele Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten gibt. Deshalb werden die ausgeschnittenen Proteinspots in der Regel durch Endoproteasen in kleinere Peptide geschnitten (verdaut). Dieser Schritt erleichtert die Extraktion der Peptide und erhöht gleichzeitig die Menge der messbaren Information.

Voraussetzung ist die Nutzung von Endoproteasen mit definierten Spaltstellen wie Trypsin, LysC oder AspN (Tabelle 13.3). Trypsin schneidet carboxyterminal von Arginin (R) oder Lysin (K). Die Zahl und die Größe/Masse der entstehenden Peptide ist damit direkt abhängig von der Aminosäuresequenz des Proteins.

Tabelle 13.3 Spaltungsspezifität von Proteasen

Enzyme	Spaltungsspezifität
Trypsin	/K-, /R-, \P
Chymotrypsin	/W-, /Y-, /F-, \P
Glu C (V8 Protease)	/E-, D-, \P
Lys C	/K-, \P
Asp N	/D-

**Abb. 13.6** Prinzip des MALDI-TOF-MS

Die entstandenen Peptide werden aus dem Trenngel durch mehrfaches Waschen mit leicht angesäuerten Mischungen wässriger bzw. organischer Lösungsmitteln extrahiert.

Die Messung mit einem MALDI-TOF-MS (s.o. und Kapitel 12.4.3, 11.7.1, Abbildungen 11.28–11.30) erfordert für eine hohe Sensitivität die anschließende Entsalzung der Proben mit Hilfe miniaturisierter Entsalzungssäulen, den sogenannten ZipTips, die mit Reversed-Phase-Material (C-18-Phasen, ODS), gefüllt sind.

Die ZipTips binden die Peptide, aber haben zu Salzen keine Affinität. Die gebundenen Peptide werden mit 50% Acetonitril/0,1% TFA meist direkt auf das MALDI-Target eluiert und mit der Matrix-Substanz (HCHA) gemischt.

Die Messung der Massen der Peptide erfolgt im MALDI-TOF-MS. Die meist einfach geladenen Peptide werden im positiven Modus detektiert. Ihre Flugzeit korreliert mit der Masse der Peptide. Dabei sollte unbedingt auf eine aktuelle Kalibrierung, eine hohe Massengenauigkeit (mindestens kleiner 100 ppm) und eine gute Auflösung geachtet werden, denn die Qualität der Daten hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg der anschließenden Datenbanksuche.

Deshalb sollte möglichst im Reflektor-Mode gemessen werden, wobei die Energie des Lasers so gewählt werden muss, dass einerseits genügend Signalintensität messbar ist und andererseits nicht durch zu hohe Laserenergie die Peptide fragmentiert werden. Hier ist PSD (post source decay) unerwünscht.

Die Auswertung der Spektren erfolgt mit der zum Messgerät gehörigen Software. Dabei werden nur die monoisotopischen Peaks der Peptide einbezogen und nur Signale oberhalb eines festgesetzten Intensitätslimits ausgewählt, denn eine zu hohe Zahl vor allem falscher Massensignale aus dem Untergrund des Spektrums verschlechtert das Suchergebnis.

Zu zwei der mittels Datenbanksuche gefundenen Peptide (Abbildung 13.7) wurden die Aminosäure-Sequenzen der Peptide zugeordnet. Die gestrichelte Linie zeigt das gewählte Limit bei der Selektion der Massenpeaks. Peaks mit weniger als 5% der Intensität des höchsten Peaks wurden ausgeschlossen.

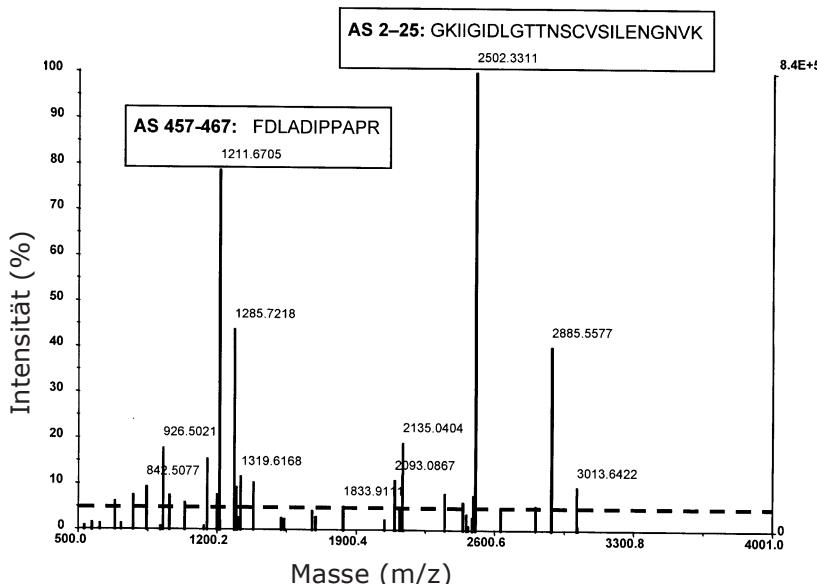


Abb. 13.7 Peptid Mass Fingerprint des Proteins DnaK von *Pseudomonas putida* KT 2440. (Mit freundlicher Unterstützung und Genehmigung von Dirk Benndorf).

Bei der Datenbanksuche werden die gemessenen Massen mit den Peptidmassen aller Proteine bzw. Gene in einer Datenbank (NCBI, Uniprot) verglichen. DNA-Sequenzen werden dazu in Proteinsequenzen übersetzt und *in silico* mit der beim Verdau benutzten Protease geschnitten.

Identische Massen innerhalb eines Limits werden positiv bewertet, falsche Massen negativ. Übersteigen die errechneten Punkte (Score) ein festgesetztes Limit, gilt das Protein als identifiziert. Außerdem werden noch weitere Parameter zur Validierung des Ergebnisses wie die Zahl der gefundenen Peptide, die Sequenzabdeckung sowie der Vergleich des theoretischen Molekulargewichts und isoelektrischen Punktes mit den im 2D-Gel ermittelten Werten herangezogen.

Sowohl Verdau als auch das Spotten, Messen und Auswerten der Daten erfolgt häufig mit einem hohen Automatisierungsgrad.

Tabelle 13.4 Ergebnis der Datenbanksuche (Peptide Mass Fingerprint) des Proteins DnaK mit dem Suchprogramm MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com/>).

Protein View

Match to: **AAN70299** Score: 228 Expect: 3.2e-18AE016791 NID: - **Pseudomonas putida** KT2440Nominal mass (M_r): 68873; Calculated pI value: 4.83

NCBI BLAST search of AAN70299 against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Pseudomonas putida KT2440

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

DNAK_PSEPK from Pseudomonas putida KT2440

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 24

Number of mass values matched: 18

Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in Bold Red

1 MGKIIGIDLG TTNSCVSILE NGNVKVIENA EGARTTPSIV AYANDGEILV
51 GQS~~A~~KRQAVT NPHNTLFAVK R~~L~~IGR~~R~~FEED VVQ~~K~~D~~I~~KLVP YKIV~~K~~ANN~~G~~D
101 AWVEAAGKEM APPQSAEVL KKKMK~~T~~AEDY LGEPVTEAVI TVPAYFND~~SQ~~
151 RQATKDAGR IAGLDVKR~~I~~ EPTAA~~A~~LAYG MDK~~A~~KGDHTV IVYD~~L~~GGGT~~F~~
201 DVS~~V~~EIAEV~~D~~ DGEHQ~~F~~EVLA TNGD~~T~~FLGGE DFD~~M~~R~~L~~IDYL VDEF~~K~~KESGM
251 DLKNDPLALQ R~~L~~KEAAEAKAK IELSSAQSTD VNLPYITADA TGPKH~~N~~V~~K~~I
301 SRAKLESLVE DLV~~K~~R~~T~~IEPC RIALKDAGID ASKIDDVILV GGQ~~T~~R~~M~~PLVQ
351 KEVADFFGKE ARKDVN~~P~~DEA VAMGA~~A~~IQGA VL~~A~~GDVKDVL LLDVSP~~L~~T~~G~~
401 IETMGGVMTA LIE~~K~~NTI~~T~~PT KKSQVFESTAD DNQSAVTIH~~V~~ LQGER~~K~~QAAQ
451 NKSLGKFDLA DIPPAPRGVP QIEVTFDIDA NGILHVGAKD KATGKTQSIV
501 IKANGLS~~D~~SE EIERMVRDAE ANAEEDR~~K~~FE ELAAARNQGD ALVHSTR~~K~~MV
551 ADAGDKVTAE EKTAIEAAVV ALEAAVKGDD KAAIDAKVEE LSKV~~S~~APVAQ
601 KMYAEQSAEQ PQGGAQQAEP EAKHDDVVDA EFEEVKDNNK Q

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
2	25	2502.33	2501.32	2501.32	0.01	1	GKIGIDLGTTNSCVSILENGNVK
26	34	958.51	957.51	957.49	0.02	0	VIENAE G AR
35	55	2134.09	2133.09	2133.10	-0.01	0	TTPSIVAYANDGEILVGQS A K
76	84	1149.58	1148.58	1148.58	-0.01	1	R F EEDV V Q K
125	151	3013.64	3012.63	3012.47	0.16	1	KTAEDYLV G EPVTEAVITV P AYFND SQ R
126	151	2885.56	2884.55	2884.38	0.17	0	TAEDYLV G EPVTEAVITV P AYFND SQ R
167	183	1833.91	1832.90	1832.95	-0.04	1	R I INE T AA A LAYGMDK
236	246	1382.74	1381.73	1381.75	-0.02	1	LIDYL V DEF K
254	261	926.50	925.49	925.50	-0.00	0	NDF L ALQR
271	294	2491.38	2490.37	2490.25	0.12	0	IELSSAQSTDVNLPYITADATGPK
316	321	775.39	774.38	774.37	0.01	0	T I EP C R
334	345	1285.72	1284.71	1284.70	0.01	0	IDDVILVGQ T R
363	387	2439.33	2438.32	2438.25	0.07	1	KDVNP D EA V AMGA A IQGA V LAGDV K
457	467	1211.67	1210.66	1210.63	0.03	0	FDLAD I PPAPR
503	514	1319.62	1318.61	1318.60	0.01	0	ANGLS D EE I ER
528	536	1034.57	1033.56	1033.56	0.00	1	KFEELAA R
537	547	1197.59	1196.58	1196.59	-0.00	0	NQGDALVHSTR
602	623	2348.07	2347.07	2347.04	0.03	0	MYAEQSAEQPQGGAQQAEPEAK

No match to: 684.32, 842.51, 1296.69, 2093.09, 2135.04, 2807.43

Ein wichtiger Nachteil dieser Hochdurchsatzmethode ist jedoch die Tatsache, dass die Datenbanksuche nur dann erfolgreich ist, wenn die entsprechenden Protein- bzw. Genomdaten verfügbar sind. Die Verfügbarkeit dieser Daten ist also ein wichtiger Faktor bei der Auswahl des biologischen Materials zur Durchführung der Experimente.

Tabelle 13.4 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Datenbanksuche (Peptide Mass Fingerprint) des Proteins DnaK (s. Abbildungen 13.5, 13.7) mit dem Suchprogramm MASCOT. In der Proteinsequenz fett hervorgehobene Aminosäuren gehören zu den Peptiden, die im Massenspektrum (Abbildung 13.7) gefunden wurden. Unterstrichene Aminosäuren sind alle möglichen Spaltstellen der Endoprotease Trypsin.

13.4.3 LC – ESI – MS/MS

Die Kopplung einer Flüssigchromatographie über eine Elektrosprayquelle an ein Massenspektrometer (s. Kapitel 12.4.2.3) ermöglicht die Trennung komplexer Peptidgemische vor der Messung der Massen.

Ein wesentlicher Vorteil ist die simultane Detektierbarkeit von Massen hoher Abundance und von Massen mit geringer Präsenz in einem Experiment, da sie oft zu verschiedenen Zeiten von der Säule eluiieren. Demgegenüber werden bei Messungen mittels MALDI-TOF-MS die wenig abundanten Peptide durch die Gegenwart reichlich vorhandener Peptide unterdrückt. Dies wird insbesondere bei der Vermessung von tryptischen Verdauen notwendig, in denen mehrere Proteine enthalten sind (Banden aus SDS-PAGE oder direkter Verdau von Proteingemischen ohne vorherige elektrophoretische Trennung). Prinzipiell erfolgt die Trennung der Peptide mittels Reversed-Phase-Chromatographie an einem C18-Material. Die Elution wird mit einem Gradienten von 0% bis 60% Acetonitril bei leicht sauren pH-Wert (Zusatz von 0,1% TFA oder Ameisensäure) durchgeführt.

Ein weiterer Vorteil der Kopplungstechnik ist die Nutzung der ESI-Quelle. ESI- und MALDI-Quellen haben andere Ionisierungseigenschaften, so dass einige Peptide besser mit der ESI-Quelle, andere Peptide wiederum mit der MALDI-Quelle günstiger ionisiert werden. Tryptische Peptide sind i.d.R. bei der Ionisierung mit der ESI-Quelle mindestens zweifach geladen. Ursache sind mindestens zwei Aminogruppen im Peptid, die aminoterminale Aminogruppe und eine Aminogruppe in der Seitenkette des carboxyterminalen Lysins bzw. Arginins.

Die zweifache und bevorzugt an den beiden Enden eines tryptischen Peptides lokalisierte Ladung wirkt sich günstig auf die Fragmentierung von Peptiden in Tandemmassenspektrometern (s. Kapitel 11.4.5) aus, denn bei der Fragmentierung verteilt sich die Ladung meist auf beide Fragmente. Die Peptidbindungen eines Peptides zerbrechen bevorzugt. Bei der Fragmentierung in Ionenfallen- oder Triple-Quadropol-Massenspektrometern (siehe Kapitel 11.4) entstehen hauptsächlich aminoterminale b- und carboxyterminale y-Ionen. Die Massendifferenzen zwischen den jeweiligen b- bzw. y- Ionen in einem Fragmentspektrum (s. Spektrum in Abbildung 13.9 und Massentabelle 13.5) entsprechen genau den Massen eines Aminosäure-Restes im Peptid (s. Tabelle 13.4).

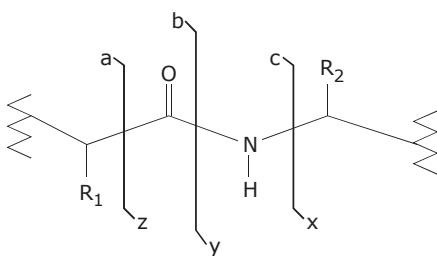


Abb. 13.8 Fragmentierung

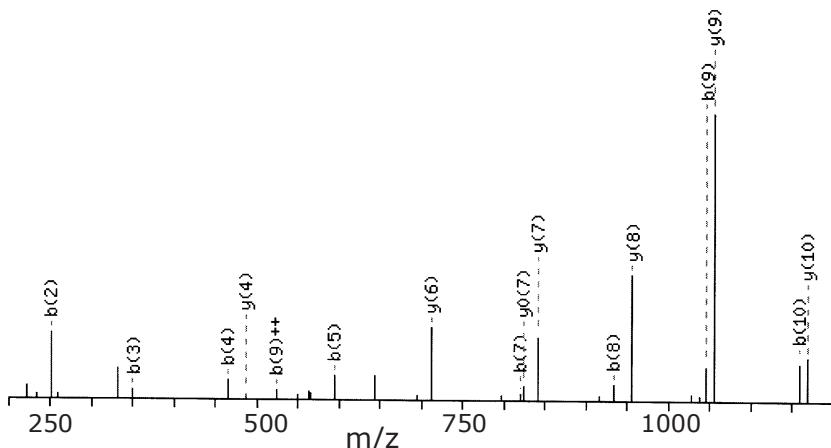


Abb. 13.9 Fragmentspektrum eines tryptischen Peptides aus Rinderserumalbumin als Ergebnis einer MS/MS-Ionen-Suche mit MASCOT (Mit freundlicher Unterstützung und Genehmigung von Dirk Benndorf).

Die Messung erfolgte mit einem LC-ESI-Ion Trap Massenspektrometer. Die Masse des zweifach geladenen Peptides betrug 653,6 und die rechnerische Masse des ungeladenen Peptides 1304,7088.

Würden alle Peptidbindungen mit gleicher Häufigkeit zerbrechen, könnte man sehr leicht die Aminosäure-Sequenz eines Peptides aus dem Spektrum ableiten. Das Fehlen einzelner Ionen in den Ionenserien komplizieren allerdings häufig eine solche *de novo* Sequenzierung von Peptiden.

Außerdem erschweren noch einige Aminosäuren mit fast gleicher bzw. identischer Masse (K und Q, oxidiertes M und F, I und L), die auch mit den meisten Massenspektrometern nicht unterschieden werden können, die Bestimmung einer neuen Aminosäure-Sequenz.

Tabelle 13.5 Theoretisch erwartete Fragmente des tryptischen Peptides aus Rinderserumalbumin und tatsächlich gefundene Fragmente (fettgedruckt). Mit freundlicher Unterstützung und Genehmigung von Dirk Benndorf.

#	b	Sequenz	y	#
1	138.0662	H		11
2	251.1503	L	1168.6572	10
3	350.2187	V	1055.5732	9
4	465.2456	D	956.5047	8
5	594.2882	E	841.4778	7
6	691.3410	P	712.4352	6
7	819.3995	Q	615.3824	5
8	933.4425	N	487.3239	4
9	1046.5265	L	373.2809	3
10	1159.6106	I	260.1969	2
11		K	147.1128	1

Tabelle 13.6 Durchschnittliche „Restmassen“ von Aminosäuren

Aminosäure	Code	Restmassen
Glycin	G	57,05
Alanin	A	71,08
Serin	A	87,08
Prolin	P	97,12
Valin	V	99,13
Threonin	T	101,11
Cystein	C	103,14
Leucin	L	113,16
Isoleucin	I	113,16
Asparagin	N	114,10
Asparaginsäure	D	115,09
Lysin	K	128,17
Glutamin	Q	147,13
Glutaminsäure	E	129,12
Methionin	M	131,19
Histidin	H	137,14
Phenylalanin	F	147,18
Arginin	R	156,19
Thyrosin	Y	163,18
Tryptophan	W	186,21

Trotzdem können auch unvollständige Spektren zur Identifizierung herangezogen werden. Es erfolgt ähnlich wie beim PMF eine Suche in Datenbanken. Dabei werden hier zusätzlich die gemessenen Massen der Fragmente eines Peptides mit den theoretisch erwarteten Fragmentmassen von Peptiden aus der Datenbank verglichen. Je mehr Peptide mit einer guten Übereinstimmung im Vergleich zu den theoretischen Werten gefunden werden, desto höher ist die Bewertung und um so sicherer ist die Identifizierung.

Im Unterschied zum PMF besteht bei dieser Vorgehensweise die Chance auch Proteine, deren Sequenzen nicht in Datenbanken hinterlegt sind, auf Grund einzelner identischer Peptide mit homologen Proteinen zu identifizieren.

13.4.4 Ausblick zur Proteomanalytik

Die Methoden der Proteomanalyse werden permanent weiterentwickelt. Neuere Techniken versuchen bisher schlecht oder gar nicht detektierbare Proteine wie Membranproteine und wenig abundante Proteine zu erfassen.

Besonders gelfreie Techniken wie die Kopplung von mehrdimensionaler Flüssigchromatographie und MS (s. auch Kapitel 12./12.3.2) sind zur Trennung tryptischer Peptide aus komplexen Gemischen gut geeignet. Während der Probenvorbereitung werden die Peptide bzw. Proteine zweier Proben verschieden gelabelt und können dadurch in der Massenspektrometrie quantifiziert werden, z.B. ICAT (Isotope coded affinity taq) und andere Labelling-Techniken.

Seit einigen Jahren können Proteine vor der zweidimensionalen Elektrophorese (2D-PAGE) kovalent mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Difference Gel Electrophoresis: DIGE, GE-Healthcare) markiert werden. Sie werden danach gemeinsam in einem 2D-Gel getrennt und bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen (s. Kapitel 10.3) detektiert. Die gleichzeitige Trennung zweier Proben in einem Gel reduziert erheblich den Auswertungsaufwand mit einer Software und macht die Quantifizierung veränderter Proteine zuverlässiger.

Im Fokus der permanenten Entwicklung der Proteomanalyse steht natürlich auch die Weiterentwicklung von Techniken, die eine Beschreibung posttranskriptionaler Modifikation und den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen. Es zeigt sich jedoch zunehmend, dass wesentliche Fortschritte im Verständnis zellulärer Prozesse nur durch den koordinierten Einsatz aller OMICS - Techniken zu erreichen sind.

13.5 Literatur

Benndorf D, Thiersch M, Loffhagen N, Kunath C, Harms H (2006) *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites, *Proteomics* 6:3319

De Hoffmann E, Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons
Cammann K (2001) *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Acad Verlag
Hillenkamp F, Peter-Katalinic' J (2007) *MALDI MS*, WILEY-VCH

Kellner R, Lottspeich F, Meyer HE (1994) Microcharacterization of Proteins, VCH-Verlag Weinheim

Lieber DC (2002) Introduction to proteomics, Humana Press Totowa New Jersey

Lottspeich F, Engels JW (2006) Bioanalytik, Spektrum Acad Verlag München

**Die Pflicht zum Widerspruch
ist im Gehalt inbegriffen.**

Theodor Heuss

14 Sensitive und spezifische Bioanalytik

14.1 Biosensoren

14.1.1 Einführung

Ein Sensor (lat. *sensus*: das Gefühl) ist ein miniaturisierter Messwertfühler, der chemische Verbindungen oder Ionen selektiv und reversibel erfassst und dabei konzentrationsabhängige elektrische Signale liefert (JUPAC, 1989). Charakteristisch für Sensoren sind zwei in Serie geschaltete Grundkomponenten – ein chemisches (molekulares) Erkennungssystem („Rezeptor“) für den Analyten und ein physikochemischer Transduktor (JUPAC-Ergänzung, 1999). Im Rezeptor (Erkennungssystem) entsteht infolge der Wechselwirkung mit den Probemolekülen (Analyten) eine Änderung der physikalischen Eigenschaften, im Transduktor (Wandler) wird diese Eigenschaftsänderung in ein elektrisches Signal (Strom, Spannung, Widerstand) umgewandelt. Man unterscheidet u.a. zwischen optischen, elektrochemischen, elektrischen, massenempfindlichen, magnetischen Sensoren oder thermometrischen Sensoren.

Biosensoren sind Messfühler, die mit biologischen Komponenten ausgestattet sind. Diese finden vor allem bei biotechnologischen Prozessen Anwendung. Sie basieren auf der direkten räumlichen Kopplung eines immobilisierten biologisch aktiven Systems mit einem Signalumwandler (Transduktor) und einem elektronischen Verstärker. Abbildung 14.1 zeigt das Messprinzip eines Biosensors.

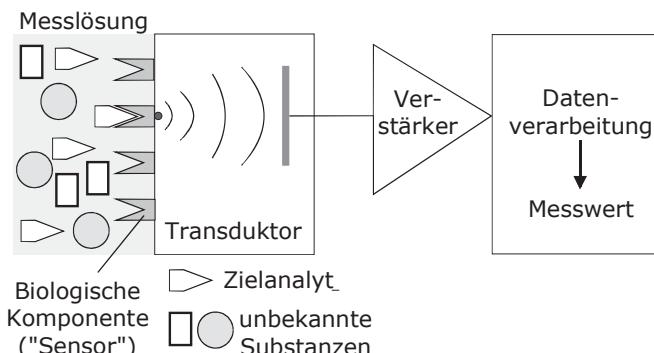


Abb. 14.1 Aufbau eines Biosensors (schematisch)

Für die Erkennung der zu bestimmenden Substanzen nutzen Biosensoren biologische Systeme auf unterschiedlich hohem Integrationsniveau. Solche biologischen Systeme können z. B. Antikörper/Antigene, Enzyme, Rezeptoren oder Mikroorganismen sein. Das immobilisierte biologische System des Biosensors tritt in Wechselwirkung mit dem Analyten. Dabei kommt es zu physiko-chemischen Veränderungen, wie z. B. die Abweichungen in der Schichtdicke, der Brechzahl, der Lichtabsorption oder der elektrischen Ladung. Diese Änderungen können mit Hilfe eines Transduktors (optoelektrische Sensoren, amperometrische und potentiometrische Elektroden, Feldeffekttransistoren) bestimmt werden.

Nach der Messung muss der Ausgangszustand des Sensorsystems erneut hergestellt werden. Die Bestimmung eines Analyten mit Hilfe eines Biosensors kann zusammenfassend in folgende Teilschritte untergliedert werden. Zunächst erfolgt die spezifische Erkennung des Analyten durch das biologische System des Biosensors. Danach findet die Umwandlung der physiko-chemischen Änderungen, die durch entsprechende Wechselwirkungen des Analyten mit dem Rezeptor entstehen, in ein elektrisches Signal statt. Dieses Signal wird verarbeitet und verstärkt. Die Empfindlichkeit und Selektivität bezieht ein Biosensor aus dem verwendeten biologischen System.

Auch schaut der Mensch von der Natur viele biologische Prozesse ab und versucht diese technische Systeme zu integrieren. Insofern lohnt sich auch ein Vergleich zu den Analogien in der Signalverarbeitung zwischen lebenden Organismen (Mensch) und intelligenten Maschinen (Sensor). Die einzelnen Teilschritte sind in der Abbildung 14.2 gegenübergestellt. Ausgehend von einer umweltrelevanten bzw. biologischen Substanz, die der Organismus wahrnimmt und die auf ihn wirkt, kommt es zur Erfassung dieser „Information“ über die Sinneszellen und zur Weiterleitung über die Nervenbahnen bis zum Gehirn, wo diese Impulse analysiert und verarbeitet werden. Analoges findet in einem Biosensor (rechter Zweig) statt.

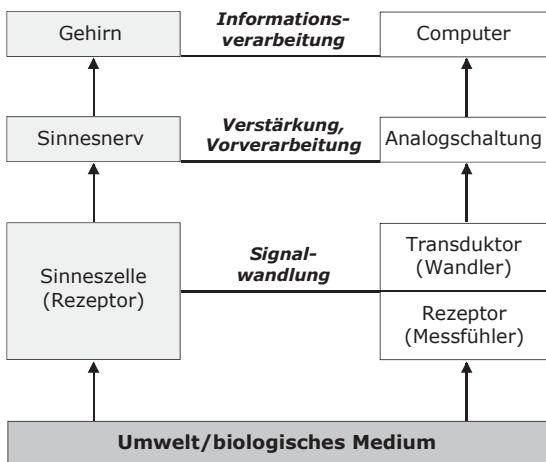


Abb. 14.2 „Mensch und Biosensor“

14.1.2 Lactatsensor

Als aktuelles Beispiel für den schnellen Vor-Ort-Einsatz von Sensoren innerhalb der Sportmedizin und dem Leistungssport dient die Lactatbestimmung. Lactat als Salz der Milchsäure (lat.: *acidum lacticum*) ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Stoffwechsel und wird beim Abbau von Zuckern durch anaerobe Glykolyse gebildet. In Abwesenheit von Sauerstoff (anaerob) entstehen innerhalb des Glucosemetabolismus im menschlichen Körper aus dem Zucker Glucose zwei Moleküle ATP (Adenosintriphosphat) und zwei Moleküle L-Lactat. Unter aeroben Bedingungen resultieren hingegen 38 Moleküle ATP für den Glucoseabbau.

Die schnelle Ermittlung einer erhöhten Lactatkonzentration (5–40 mmol/l) im Blut ist notwendig, um die Sauerstoffversorgung des Gewebes zu beurteilen, bevor der pH-Wert abfällt, Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen auftreten und Elektrolytverschiebungen stattfinden. Dadurch können optimale Trainingsbedingungen für den Sportler ermittelt werden.

Das Funktion und Wirkungsweise eines Biosensors zur Bestimmung der Lactatkonzentration im humanen Blut geht aus der Abbildung 14.3 hervor. Sorgfältig und standardisiert muss zuerst die Blutentnahme erfolgen. Die Punktionsstelle soll dabei gut gereinigt sein, da der Lactatgehalt im auftretenden Schweiß nicht vernachlässigbar ist. Blut, das nicht ausreichend stabilisiert ist, ändert seinen Lactatgehalt sehr schnell und muss rasch analysiert werden.

Ein wichtiges Grundelement des Sensors ist die am Transduktor immobilisierte Lactatdehydrogenase. Diese wandelt das gebundene Lactat unter Sauerstoffzusatz in Pyruvat und H_2O_2 (s. erste Gleichung) um. Das Wasserstoffperoxid wird danach amperometrisch (Abbildung 14.3) detektiert. Der resultierende Elektronenfluss wird als Stromsignal registriert und korreliert mit dem Lactatgehalt in der verdünnten Blutprobe. Die Lactatsensoren werden automatisch kalibriert. Der Messbereich für Lactat liegt zwischen 0,5 und 40 mmol/l.

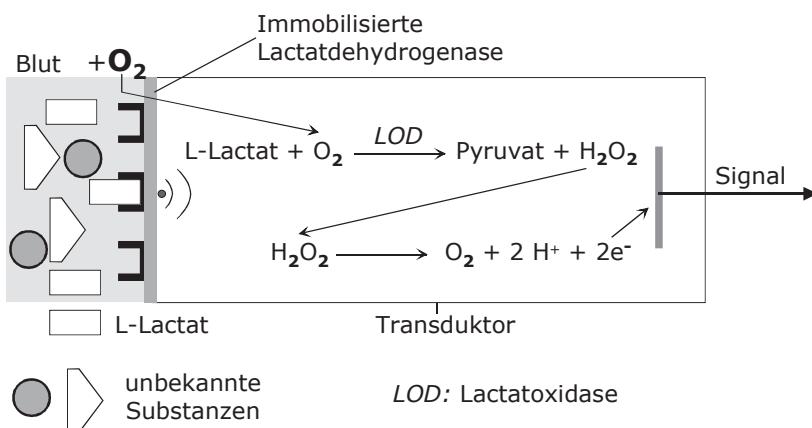
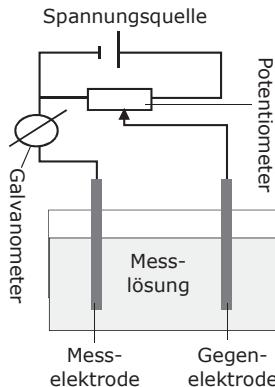


Abb. 14.3 Schematische Aufbau eines Lactat-Sensors

**Abb. 14.4** Amperometrische Schaltung

Die Amperometrie ist eine elektroanalytische (elektrochemische) Methode, die auf der Messung der elektrischen Stromstärke beruht und der Konzentrationsbestimmung von Analyten dient.

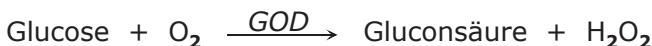
Die Messelektrode (Arbeitselektrode) amperometrischer Sensoren ist mit einer Enzymschicht überzogen, die selektiv mit dem zu analysierenden Stoff reagiert. Dieses Prinzip ist in der medizinischen Diagnostik weit verbreitet und findet auch Anwendung bei amperometrischen Glucosesensoren.

Wie bereits in Abbildung 14.3 dargestellt, erfolgt die Umsetzung von Lactat mit Lacatatoxidase. Dabei wird Sauerstoff verbraucht. Amperometrisch registriert wird die Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration oder die Abnahme der Sauerstoffkonzentration, je nach Wahl des Elektrolysepotentials.

14.1.3 Glucosesensor

Der Glucosesensor war der erste Biosensor überhaupt. Clark und Lyons (1962) nannten ihre verwendete Messanordnung „Enzymelektrode“. Glucosesensoren sind in ihrem Aufbau und ihren Funktionen dem Lactatsensorsystem ähnlich. Der erste kommerzielle Biosensor zur Bestimmung von Glucose im Vollblut kam 1974 auf den Markt.

Das Grundprinzip des Glucosesensors beruht auf der Umsetzung von Glucose unter Sauerstoffbeteiligung mit dem Enzym Glucoseoxidase (GOD). Dabei entstehen Gluconsäure und Wasserstoffperoxid (Abbildung 14.5). Die an dieser Reaktion beteiligten Stoffe können unterschiedlich detektiert werden. So ist Sauerstoff mittels Amperometrie oder Fluorimetrie nachweisbar. Wasserstoffperoxid hingegen kann amperometrisch oder mittels Photometrie bestimmt werden.

**Abb. 14.5** Bestimmung von Glucose mittels Glucoseoxidase (GOD).

14.2 Immunoassays

14.2.1 Einführung

Immunoassays umfassen eine ganze Reihe von Methoden und Verfahren in der modernen Bioanalytik, die als gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und damit den Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens (AG) an einen Antikörper (AK) besitzen (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Je nach der Ausstattung und Konfiguration des Immunoassays können auf der einen Seite das Antigen und andererseits der Antikörper der Ziel-Analyt, der nachzuweisen ist, sein. Bei der Durchführung von derartigen Assays wird die hohe Bindungsstärke und Spezifität der Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern ausgenutzt.

Immunoassays können auf komplexe Matrices (biologische Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Urin sowie Lebensmittel und Umweltproben) angewandt werden. Sie sind hoch spezifisch und hinsichtlich der nachzuweisenden Analytmenge äußerst sensitiv (Pico- bis Attomolbereich).

14.2.2 Immunoassay versus Immunosensor

In der Abbildung 14.6 sind grundlegende Reaktionsprinzipien zwischen einem Immunosensor und einem Immunoassay gegenübergestellt. Die Reaktionen zwischen AK und AG sind vergleichbar. Der Immunosensor stellt ein möglichst kleines und in-sich-geschlossenes Gerät dar, in dem alle Reaktionen und Auswertungen schnell und im On-line-Betrieb ablaufen. Diesen hohen Anspruch besitzen Immunoassays nicht unbedingt. AK-AG-Reaktionen, Waschvorgänge, Markierungen der Analyte und quantitative Auswertungen erfolgen in einzelnen Schritten und meist off-line.

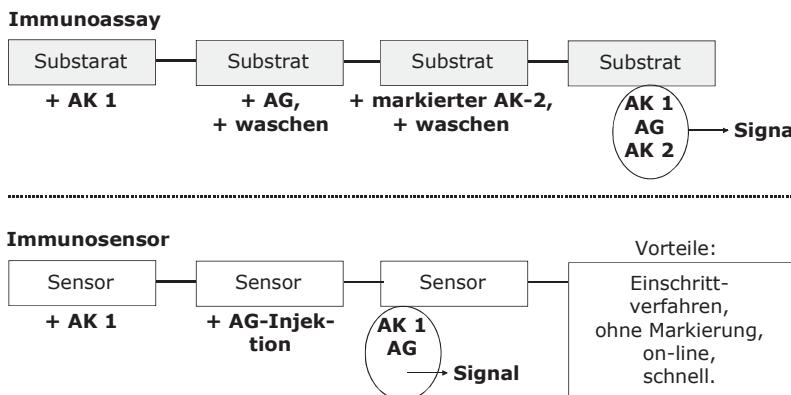


Abb. 14.6 Immunoassay versus Immunosensor

14.2.3 Radio-Immunoassay

Der Radio-Immunoassay (*RIA*: *radio immuno assay*) wurde 1959 von Yalow und Berson entwickelt, die erstmals zeigten, dass der menschliche Organismus auch gegen körpereigene Stoffe (z.B. Insulin) Antikörper produzieren kann. Mitte der 1960-er Jahre setzte aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität der Methode vor allem für Peptide/Proteine und spezielle Hormone eine rasante Entwicklung von RIA-Tests ein. Dabei gelangen Nachweisgrenzen bis zu 10^{-18} mol/l.

Zur Durchführung des Tests wird ein radioaktiv markiertes Antigen und ein spezifisches Antiserum benötigt. Zur Konzentrationsbestimmung einer unbekannten Probe wird ein definierter Standard eingesetzt und die Separation der gebundenen Species von der freien Phase erfolgt mittels geeigneter Trennmethode.

Radio-Immunoassays verwenden als Marker Radioisotope wie Jod (^{125}I). Dabei handelt es sich um einen niederenergetischen Gammastrahler mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen. Die Detektion erfolgt mit dem Natrium-Jodid Szintillationsdetektor (Gammacounter).

Das zu bestimmende Antigen wird zusammen mit einer bekannten Menge radioaktiv markiertem Antigen mit spezifischen Antikörpern zur Reaktion gebracht. Die Antikörper binden sich kompetitiv an die zu analysierenden Antigene und an die radioaktiven künstlichen Antigene. Nach erfolgter Reaktion wird die Strahlungsaktivität des ausgespülten Antigen-Antikörper-Komplexes ermittelt. Auf diesem Wert basiert die anschließende Berechnung der gesuchten Antigenkonzentration in der Probe. Zusammenfassend ist der RIA-Test in den Abb. 14.7 dargestellt.

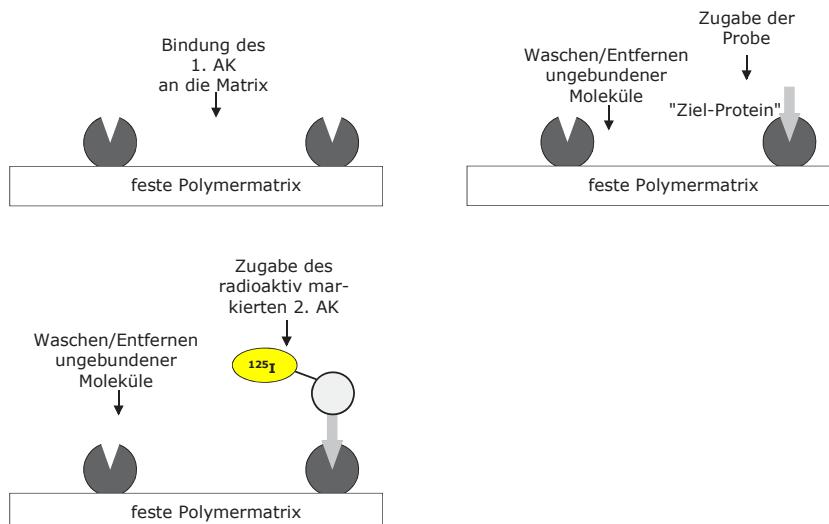


Abb. 14.7 Radio-Immunoassay (schematisch)

Dieser beinhaltet die einzelnen Teilschritte Bindung des 1. AK an die Polymermatrix, Zugabe der Probe und Bindung des Zielanalyten (Protein) an der AK, Entfernung ungebundener Moleküle, Markierung mit Hilfe eines zweiten (radioaktiv markierten) Antikörpers, gefolgt von einem weiteren Waschschritt und der Auswertung des Assays.

14.2.4 Enzym-Immunoassay

Dieser Assay (*EIA: enzyme immuno assay*) ist wie der RIA auf die immunologische Bestimmung biologisch aktiver Substanzen in Körperflüssigkeiten gerichtet. Hier erfolgt nach Reaktion von Antigen und spezifischem Antikörper die Bestimmung eines an das AG oder den AK gebundenen Enzyms (bekanntes Beispiel: Meerrettichperoxidase).

Der EIA-Test ist prädestiniert für die Analytik von Medikamenten, Hormonen und Proteinen (Tumormarker). Im Vergleich zum RIA ist er meist etwas weniger sensitiv, aber benötigt auch keine radioaktiven Substanzen.

Ein Antigen wird zuerst auf eine feste Oberfläche gebunden (Abbildung 14.8). Die Bindung ist nicht kovalent, aber auf Polymermaterialien sehr fest und stabil. Nach Hinzufügen eines Enzym-gekoppelten Antikörpers verbindet sich dieser mit dem Antigen. Die Inkubation mit einem entsprechenden Substrat führt zu einem farbigen Produkt, das meist mit Hilfe der Fluoreszenz (oder auch mit UV/VIS-spektroskopie) sehr empfindlich detektiert wird.

Man unterscheidet zwischen dem homo- und heterogenen Enzym-Immunoassay. Für diesen Test ist charakteristisch, dass der AG-AK-Komplex von den freien Antigenen bzw. Antikörpern getrennt ist. Beim homogenen EIA ist keine Trennung zwischen dem Komplex und den entsprechenden Proteinen notwendig.

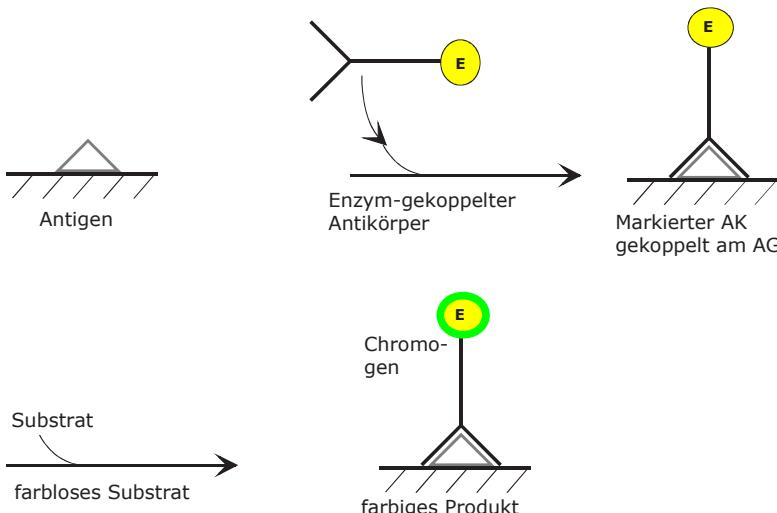


Abb. 14.8 Prinzip eines einfachen Enzym-Immunoassays, EIA

14.2.5 Enzymgekoppelter Immunabsorptions-Test

Dieser Immunoassay (*ELISA: enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein dem EIA vergleichbares immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer AK zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

14.2.5.1 Kompetitiver ELISA-Test

Dieser ELISA-Test dient zur Bestimmung der Antigenkonzentration in einer komplex zusammengesetzten (biologischen) Matrix. Hier wird zuerst ein Antikörper an eine feste Phase immobilisiert. Es folgt die Inkubation mit einem Enzym-markierten Antigen sowie mit der Probelösung, die ihrerseits auch Antigene enthält, die jedoch nicht mit dem Enzym markiert sind. Alle Antigene, die entsprechend selektive Bindungen mit dem Antikörper eingehen können, bilden diese Komplexe aus. Nicht bindungsfähige Antigene werden von der Phase abgewaschen. Im letzten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Substrat und das entstehende farbige Produkt kann spektroskopisch vermessen werden.

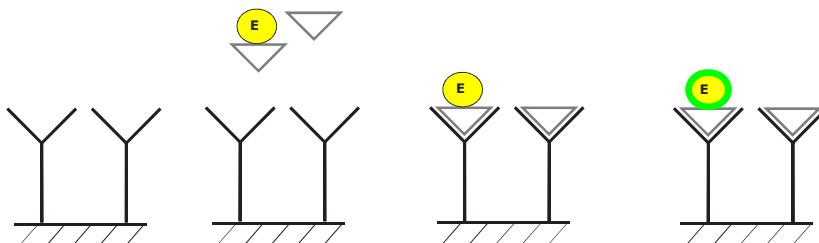


Abb. 14.9 Prinzip eines kompetitiven ELISA-Test

Ein weiteres Beispiel zeigt das Prinzip eines kompetitiven ELISA-Tests zur Bestimmung der Antigen-Konzentration mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Antikörpers. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit Enzym-markierten und unmarkierten Antikörpern. Es schließt sich die AG-AK-Komplexbildung an. In diesem Schritt werden gleichzeitig nichtbindende Moleküle abgewaschen. Nach der Inkubation mit dem Substrat ist die entstandene Menge an farbigem Produkt der AK-Konzentration direkt proportional.

Eine weitere methodische Differenzierung resultiert durch die Varianten des direkten und indirekten ELISA. Bei der ersten Methode konnte der spezifische Antikörper direkt markiert werden.

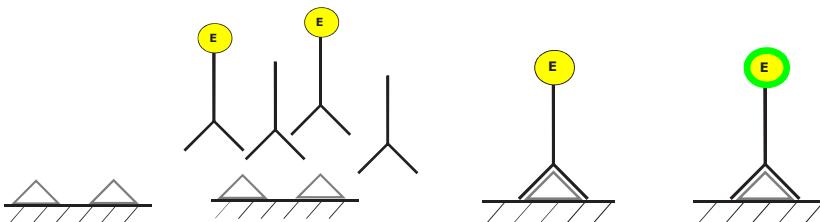


Abb. 14.10 Kompetitiver ELISA-Test zur Bestimmung der AG-Konzentration

Diese AK-Enzym-Kopplung ist jedoch oft nicht möglich. In diesem Fall kann der an das Antigen gebundene AK mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Zweit-Antikörpers aus einer anderen Spezies (z.B. Ziege anti-Maus IgG) nachgewiesen werden. Das wird als indirekter ELISA-Test bezeichnet und geht schematisch aus der folgenden Abbildung hervor.

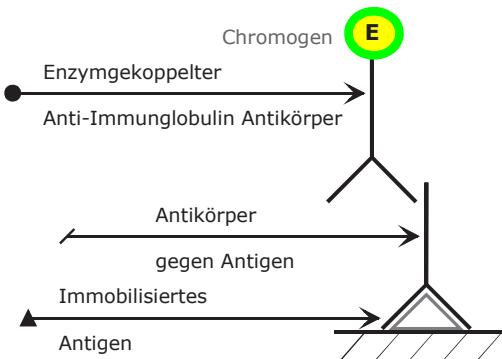


Abb. 14.11 Indirekter ELISA

14.2.5.2 Nicht-kompetitiver ELISA-Test

Bei dieser ELISA Technik (Sandwich-ELISA) werden zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, verwendet. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen koppeln, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die wells gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit koppelt der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am *coating*-Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(*detection*)-Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *horseradish*), Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener Glucoseoxidase (GOD) gebunden ist.

Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA – das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein Chromogen (z.B. *p*-Nitrophenylphosphat, pNPP, für AP) zugegeben. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab und es entsteht *p*-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion kann in einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Man unterscheidet zwischen dem direkten und indirekten „Sandwich“-ELISA. Bei der direkten Variante wird der erste Antikörper (der sogenannte „Fänger“-AK) an die feste Phase gebunden und anschließend die Antigen-haltige Probe aufgegeben. Die immobilisierten AK binden sehr spezifisch die Antigene. Es folgt die Zugabe des zweiten Enzym-gekoppelten AK. Dieser Antikörper reagiert nun mit einem anderen Epitop am Antigen als der erste AK. Nach Zugabe des Substrates wird die Konzentration des entstandenen farbigen Produktes ermittelt. Sie ist direkt proportional der Antigen-Konzentration in der Probe.

Im Falle des indirekten Sandwich-ELISA (Abbildung 14.12) wird ein Enzym-gekoppelter Antikörper gegen den zweiten AK eingesetzt. Dabei ist sicherzustellen, dass der markierte AK nur mit den zweiten AK und nicht mit dem immobilisierten AK reagiert.

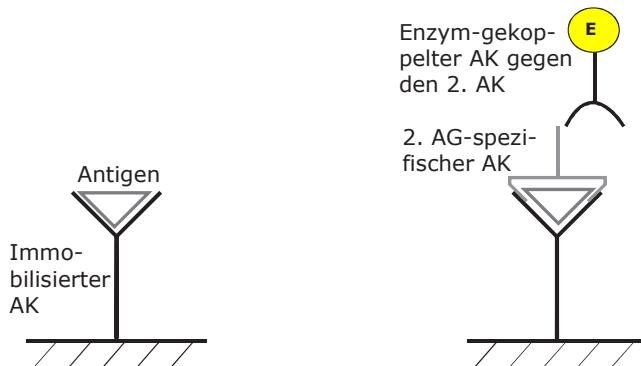


Abb. 14.12 Indirekter Sandwich-ELISA

14.2.6 HIV-Test

Ein HIV-Test ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe festgestellt werden kann, ob eine Person mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV: *human immunodeficiency virus*) infiziert ist. Auch die Bezeichnung „menschliches Immunschwäche-Virus“ ist gebräuchlich. Das Virus gehört zur Familie der Retroviren (**Reverse Transkrip-**

tase Onkoviren). Eine Ansteckung führt nach unterschiedlich langer und oft mehrjähriger Inkubationszeit zu Aids (*acquired immunodeficiency syndrome*, erworbenes Immundefektsyndrom) – eine auch heute kaum bzw. noch unheilbare Immunschwächekrankheit.

Die Konzentration an HIV im Blut sind jedoch für einen analytischen Nachweis viel zu gering. Ein HIV-Test (ELISA) basiert auf dem Nachweis von Antikörpern, die wenige Wochen nach der Infektion in ausreichender Menge vorhanden sind. Das Prinzip eines derartigen Tests geht aus der Abbildung 14.13 hervor.

Zuerst erfolgt die Fixierung von HIV-Virusproteinen (Antigene) am Boden der Probengefäße und danach die Zugabe von Bluts serum der Testperson. Wenn Antikörper (IgG) im Serum vorhanden sind, findet eine Immunreaktion statt. Das Gefäß wird anschließend gewaschen und der AG-AK-Komplex bleibt am Boden haften. Schließlich wird ein speziell Enzym-gekoppelter monoklonaler AK hinzugefügt, der sich mit dem HIV-Antikörpern, die an den Virusproteinen angelagert sind, verbindet. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe der Vorstufe eines Farbstoffes, der durch das Antikörper-gekoppelte Enzym eine signifikante Farbänderung hervorruft. Im diesem Fall tritt eine deutliche Rotfärbung ein, die den Nachweis für die vorhandenen HIV-Antikörper erbringt und den Probanden bzw. Patienten als HIV-positiv einstuft.

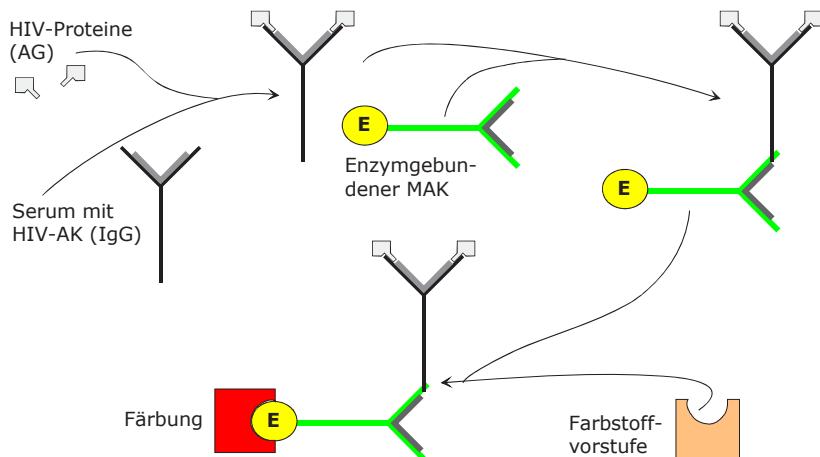


Abb. 14.13 ELISA-HIV-Test (schematisch)

14.2.7 Schwangerschafts-Test

Zum Nachweis einer Schwangerschaft wird die Anwesenheit des sogenannten schwangerschaftserhaltenden Peptidhormons hCG (*humanes Choriongonadotropin*) im weiblichen Körper analysiert. Dieses Hormon (ein Gonatropin) kommt im Trophoblastengewebe vor, das vom Fetus oder der Plazenta gebildet wird. Demzufolge ist es nur während einer Schwangerschaft nachweisbar.

Im Schnelltest wird weiblicher Urin mit Hilfe eines speziellen Immunoassays unter Verwendung von Teststreifen untersucht, der in der medizinischen Diagnostik als „immunchromatographischer“ Test bezeichnet wird.

Erfolgt eine Benetzung dieser Streifen mit Urin, so bindet das hCG-Antigen (Farbe: grün) an einen Farbstoff-markierten hCG-Antikörper (rosa). Der Antigen-Antikörper-Farbstoff-Komplex wandert zur Reaktionszone, in der sich ein zweiter hCG-Antikörper (grau) befindet. Dieser immobilisierte Antikörper bindet den ankommenden Antigen-Antikörper-Farbstoff-Komplex innerhalb dieser Zone, so dass eine Färbung resultiert. Überschüssiger Farbstoff-markierter hCG-Antikörper (rosa) wandert weiter zur Kontrollzone, in der sich ein anti-Fc-Antikörper (dunkelgrau) fixiert ist. Der immobilisierte anti-Fc-Antikörper bindet den überschüssigen Farbstoff-markierten hCG-Antikörper (rosa) in dieser Zone und färbt diese an.

14.2.8 ELISPOT-Test

Beim ELISPOT-Testverfahren (*Enzyme Linked Immuno Spot Technique*) wird die Freisetzung von Zytokinen oder Antikörpern einzelner Immunzellen gemessen. Das erfolgt unter Verwendung von Antigenen oder Antikörpern, die z.B. Zytokine spezifisch binden.

Nach realisierter Bindung der Zytokine an den primären AK erfolgt die Zugabe eines biotinylierten sekundären Antikörpers. Dieser Komplex wird mit Streptavidin/Alkalische Phosphatase versetzt, so dass eine Bindung mit den sekundären AK entsteht. Durch Zugabe des Substrates BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) resultieren dunkelblaue Spots am Boden der Mirkotiterplatten. Damit können Rückschlüsse auf die Aktivität von Immunzellen gezogen werden. Dies ist u.a. für die Erforschung und Diagnostik von Infektionskrankheiten von Bedeutung.

14.2.9 Drogentest

Mit Hilfe eines MAHSAN-Drogen-Tests können Drogen und deren Metaboliten mit Hilfe der „Immunchromatographie“ im menschlichen Urin nach qualitativ nachgewiesen werden.

Der Test basiert auf der Kompetition um eine begrenzte Menge des Gold-Antikörper-Konjugats zwischen der membrangebundenen Droge und der Droge, die im Urin enthalten ist.

Die Austestung beginnt damit, dass 3 Tropfen des Urins in jedes Probenloch pipettiert werden und der Urin von der Membran in die Testkarte gesogen wird. Die Droge im Urin bindet an das Gold-Antikörper-Konjugat. Sobald die Konzentration der Droge größer bzw. gleich der Menge des Gold-Antikörper-Konjugats ist, sind die jeweiligen Grenzwerte für die Drogen erreicht und kein Gold-Antikörper-Konjugat verbleibt, um an die membrangebundene Droge zu binden und die rote Testlinie zu bilden.

14.1 Literatur

- Gründler P (2004) Chemische Sensoren, Springer-Verlag Heidelberg
- Hall EAH (1995) Biosensoren, Springer-Verlag Heidelberg
- Scheller FW, Schubert F, Fedrowitz J (1997) Frontiers in Biosensorics I, II, Birkhäuser Verlag Basel
- Roitt IM et al. (1995) Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Raem, AM, Rauch, P (2007) Immunoassays, Spektrum Akademischer Verlag

Das tiefste und erhabenste Gefühl,
dessen wir fähig sind, ist das Erlebnis des
Mystischen. Aus ihm allein keimt wahre Wissenschaft.
Wem dieses Gefühl fremd ist,
wer sich nicht mehr wundern und in Ehrfurcht verlieren
kann, der ist seelisch bereits tot.

Albert Einstein

15 Spezielle und angewandte Bioanalytik

Die Kapitel 15.5 – 15.7 und 15.9 – 15.11 waren bereits Bestandteil der 2. Auflage dieses Buches „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“ und sind nahezu unverändert geblieben. Die Neuauflage beinhaltet zusätzlich die Kapitel zur Analytik von Pharmaka bzw. Arzneimitteln, von Drogen, Dioxinen und Aminosäuren. Sie erweitern somit das Gebiet der speziellen und angewandten Bioanalytik deutlich. Hinzu kommt ein weiteres Kapitel zur Zuckeranalytik innerhalb der Problematik „Lactoseintoleranz“. Die zu analysierenden Stoffklassen beinhalten hauptsächlich Vertreter von niedermolekularen Substanzen.

Die große Bedeutung der Pharmaka-Analytik muss nicht besonders betont werden – sie reicht von der strukturellen Charakterisierung während der einzelnen Synthesestufen über die Qualitätskontrolle der Produkte bis zum Nachweis entstandener Metaboliten in humanen Körperflüssigkeiten. Analysenmethoden für Pharmaka sind auch essentielle Begleitmethoden innerhalb klinischer Studien.

Der Nachweis von Drogen spielt im Straßenverkehr bzw. innerhalb der Forensischen Analytik eine wichtige Rolle und gewinnt zunehmend an Bedeutung. Auch die Problematik Doping im Sport ist ein Beispiel für den Kampf zwischen immer raffinierteren Manipulationen und einer immer empfindlicher und spezifischer werdenden instrumentellen Hochleistungs-Analytik.

Dioxine sind in der Vergangenheit durch das Bekanntwerden von Futter- und Lebensmittel-Skandalen in den Blickpunkt der Öffentlichkeit und analytischen Forschung gerückt. Ihr Nachweis in kleinsten Spuren (Pikogramm-Bereich) erfordert eine sehr anspruchsvolle und leistungsfähige Kopplung zwischen hochauflösender Kapillargaschromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie. Besonders sorgfältig ist die Probenaufarbeitung durchzuführen. Qualifiziertes Personal sowie hochreine Gerätschaften und Labore sind die Voraussetzung für eine erfolgreiche Dioxinanalytik. Die Analysenkosten sind demzufolge erheblich.

Aminosäuren sind die Grundbausteine von Proteinen/Enzymen und Peptiden. Lebensmittel enthalten wichtige essentielle Aminosäuren. Ihr Fehlen oder auch ein Überangebot an Aminosäuren in biologischen humanen Kompartimenten/Körperflüssigkeiten ist mit Erkrankungen (z.B. Phenylketonurie) verbunden. Die analytische Bestimmung sowohl von proteinogen als auch von exotischen Aminosäuren ist demzufolge ein wichtiges Untersuchungsfeld innerhalb der klinischen Chemie.

Auf Grund der Komplexität der Proben und vielfältigen Species innerhalb dieser Substanzklassen gelten vor allem Chromatographie und Elektrophorese als die Methoden der Wahl.

15.1 Pharmaka-Analytik mittels HPLC-Methoden

Pharmaka (Arzneimittel, Medikamente) sind i.d.R. wasserlösliche organische Verbindungen, die polare Gruppierungen im Molekül enthalten. Sie können einen sauren oder basischen Charakter aufweisen. Herkömmliche Trennsysteme auf der Basis von RP-Phasen, die nach hydrophoben Wechselwirkungen trennen, sind deshalb nur wenig geeignet. Mittels „saurer“ RP-HPLC sind jedoch viele Trennungen und Analysen von Pharmaka ganz erfolgreich. Eine weitere gut praktikable Methode ist die Ionenpaarchromatographie. Schließlich hat sich auch die Kapillarelektrophorese (CE) in der Pharmaka-Analytik einen festen Platz erobert. Nach dem Motto, was mit HPLC/UHPLC nicht trennbar ist, kann ggf. mit der CE erfolgreich durchgeführt werden.

Im nächsten Abschnitt werden zunächst einige notwendige Definitionen von Begriffen innerhalb der pharmazeutischen Wissenschaft erläutert, danach folgen einige ausgewählte Beispiele zur Pharmaka-Analytik mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese.

15.1.1 Was sind Arzneimittel – was sind Drogen?

Arzneimittel (auch Arzneien oder gleichbedeutend Medikamente: lat.: *medicamentum* – das Heilmittel) sind nach gesetzlicher Definition „Stoffe oder Stoffzusammensetzungen, die als Mittel mit Eigenschaften zur Heilung oder zur Verhütung menschlicher oder tierischer Krankheiten bestimmt sind oder aber im oder am menschlichen oder tierischen Körper verwendet oder einem Menschen bzw. Tier verabreicht werden können, um entweder die menschlichen bzw. tierischen physiologischen Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung wiederherzustellen, zu korrigieren oder zu beeinflussen oder eine medizinische Diagnose zu erstellen“. Diese Beschreibung basiert auf zwei grundlegenden gesetzlichen Regelwerken über die Human- und Tierarzneimittel in der Europäischen Union, den Richtlinien 2001/83/EG (Gemeinschaftskodex für Humanarzneimittel) und 2001/82/EG (Gemeinschaftskodex für Tierarzneimittel) in der jeweils gültigen Fassung. Sie ist mittlerweile in etliche nationale Arzneimittelgesetze eingeflossen, darunter auch in das deutsche Arzneimittelgesetz. Die Behandlung mit Arzneimitteln wird als Medikation bezeichnet (aus Wikipedia).

15.1.2 Saure RP-HPLC von Pharmaka

Bei Elutionen von polaren Komponenten (Pharmaka) an Reversed-Phase-Säulen mit Hilfe üblicher ACN/Wasser- oder MeOH-Wasser-Gemische werden diese Stoffe nicht oder kaum retardiert und erscheinen meist schon mit der Durchbruchsfrente (Totzeit) im Chromatogramm.

Erfolgt eine Verschiebung des pH-Wertes des Eluenten in den sauren pH-Bereich (ca. 3–4), so können polare Pharmaka protoniert werden. Dadurch werden sie weniger polar bzw. ihre Hydrophobizität nimmt zu.

So können nun diese Analyte hydrophobe Wechselwirkungen mit der RP-Phase eingehen, so dass sie retardiert und aufgetrennt werden. Voraussetzung sind auch speziell synthetisierte RP-Phasen für die Pharmaka-Analytik. Herkömmliche RP-Trennsäulen zeigen oft asymmetrische Peakprofile (*tailing, fronting*).

In der Abbildung 15.1 ist die Trennung von 6 Pharmaka mittels „saurer RP-HPLC“ dargestellt. Für die Komponenten erfolgte Basislinientrennung und es sind auch recht gute Peaksymmetrien ersichtlich. Als Säule diente ThermoHypersil (Säulendimension 250 x 4,6 mm i.D.; stationäre Phase: 5 μ m-HyPURITY C18). Zur Elution kam ein Gemisch bestehend aus 70% Methanol und 30% eines 50 mM Phosphatpuffers, der mit verdünnter Trichloressigsäure (TCA) auf pH=3 eingestellt wurde, zum Einsatz. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min entstand ein Säulenvordruck von 95 bar. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 235 nm und der Absorptionsrange war auf 0,08 eingestellt.

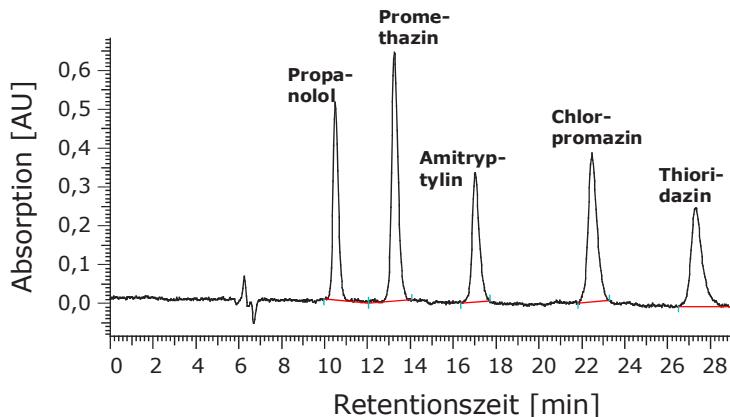


Abb. 15.1 Pharmaka-Trennung mittels saurer RP-HPLC

15.1.3 Ionenpaar-HPLC

Die Ionenpaarchromatographie (IPC: *ion pair chromatography*) wurde im Grundprinzip bereits im Kapitel 5.2.4 beschrieben. Sie bietet sich für die Trennung polarer Pharmaka besonders an. Entgegen geladene Ionen (z.B. Anionen), die dem Eluenten beigemischt werden, bilden mit den pharmazeutischen Wirkstoffen (in dem Falle vorliegend als Kationen) Ionenpaare aus.

Vorteilhaft ist, wenn das Gegenion leicht anregbare Π -Elektronen bzw. chromophore Gruppen besitzt, die zu einer Empfindlichkeitssteigerung bei der Detektion des Ionenpaares führt. Eine lange Alkylkette bzw. eine Gruppierung mit hoher Hydrophobizität ermöglicht den Einsatz der universellen und robusten Reversed-Phase-Chromatographie. Für jede Pharmaka-Applikation sollte eine eigene RP-Säule mit unverändertem Ionenpaar-Reagenz verwendet werden. „Zumischungen“ zum Eluenten sind im Vergleich zu kovalent gebundenen Species an der stationären Phase z.T. problematisch hinsichtlich Langzeitstabilität.

15.1.4 Kapillarelektrophorese

Die Grundlagen der Kapillarelektrophorese (CE) wurden im Kapitel 8.4 ausführlich dargelegt. Die CE dient in der Pharmaka-Analytik als Ergänzungs- bzw. Alternativmethode zur HPLC und ist sehr gut etabliert.

Die Abbildung 15.2 zeigt die Trennung von 4 Pharmaka an einer 50 cm langen Kapillare. Es wurde ein 50 mmol Phosphatpuffer ($\text{pH}=2,7$; eingestellt mit Trifluor-essigsäure) verwendet und die Detektion erfolgte bei 235 nm. Die CE-Bedingungen waren nicht optimiert worden und die Migrationszeit betrug mehr als 20 Minuten. Durch Erhöhung der Spannung auf 30 kV konnte die Analysenzeit annähernd halbiert werden (Abbildung 15.3). Hohe Spannungen können aber auch die Lebensdauer der Kapillare verkürzen.

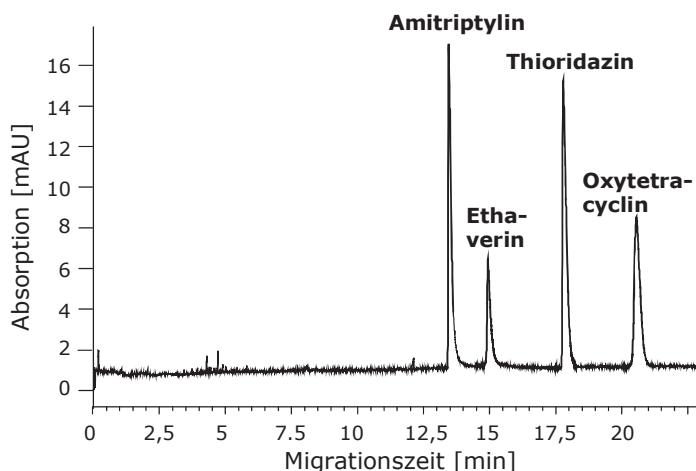


Abb. 15.2 Pharmaka-Trennung mittels Kapillarelektrophorese

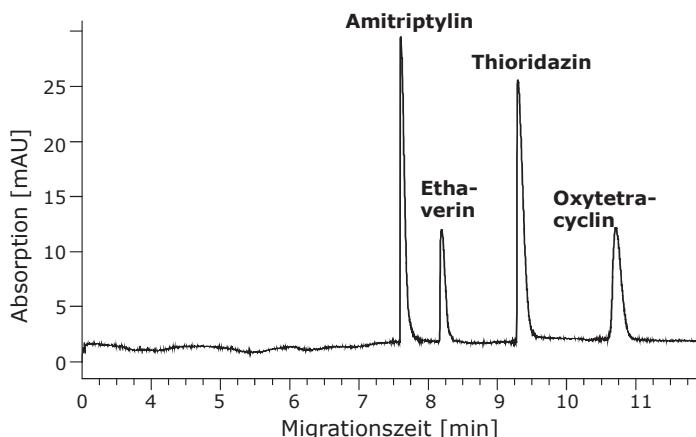


Abb. 15.3 Pharmaka-Trennung mittels CE (Spannung: 30 kV)

15.2 Drogen-Analytik

15.2.1 Legale versus Illegale Drogen

Drogen im engeren Sinne sind alle Substanzen, die durch ihre Wirkung auf das ZNS einen Erregungs-, Rausch- bzw. ähnlichen Zustand herbeiführen können.

Dieser Zustand äußert sich z.B. durch gehobene Stimmung, körperliches Wohlfühl oder Halluzinationen. Der Begriff Drogen steht für Sucht- oder Rauschmittel; in der Pharmazie sind „Drogen“ Wirkstoffe bzw. physiologisch wirksame Substanzen. Man unterscheidet zwischen „legalen“ und „illegalen“ Drogen.

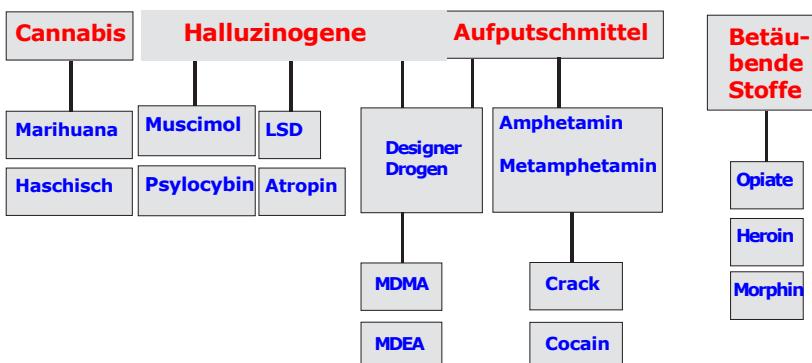


Abb. 15.4 Illegale Drogen (Schwarz-Markt)

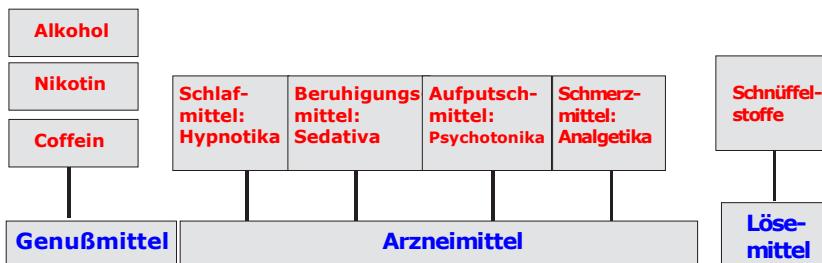


Abb. 15.5 Legale Drogen ("Weis-Markt")

15.2.2 Einführung in die Drogenanalytik

Mit Hilfe immunologischer Methoden (Enzymimmunoassays, EIA) können viele Drogen schnell, sicher und preiswert nachgewiesen werden. Diese Art von Screening oder Vortests sind sehr praktikabel und ergeben erste Ergebnisse darüber, ob Drogen überhaupt konsumiert worden sind und um welche Drogen es sich ggf. handelt. Instrumentelle Methoden wie die GC-MS oder LC-MS dienen dann der exakten Quantifizierung der einzelnen Drogen bzw. der Bestätigungsanalyse.

Als Probematerialien dienen Urin, Blut, Speichel und Haare. Urin ist einfacher zu gewinnen als Blut (Serum, Plasma). Außerdem ist die Entnahme von Blut von einem Arzt durchzuführen. Weiterhin erreichen Drogen und deren Metaboliten im Urin höhere Konzentrationen und ein längeres Nachweisvermögen im Vergleich zu Blut. Auch ist die Matrix Urin einfacher zu handhaben als Serum oder Plasma.

In Abbildung 15.6 ist die Nachweisbarkeit ausgewählter Drogen im Blut und im Urin in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Cocain ist im Blut ca. 6 Stunden als stabile Verbindung analysierbar und im Urin etwa 4 bis 12 Stunden. Besonders wichtig für einen längeren (indirekten) Nachweis des Cocains ist der Metabolit Benzoylecgonin, der im Urin noch nach wenigen Tagen erfasst werden kann. Auch die anderen Beispiele zeigen, dass im Urin die Drogen länger bestimmt werden können als im Blut.

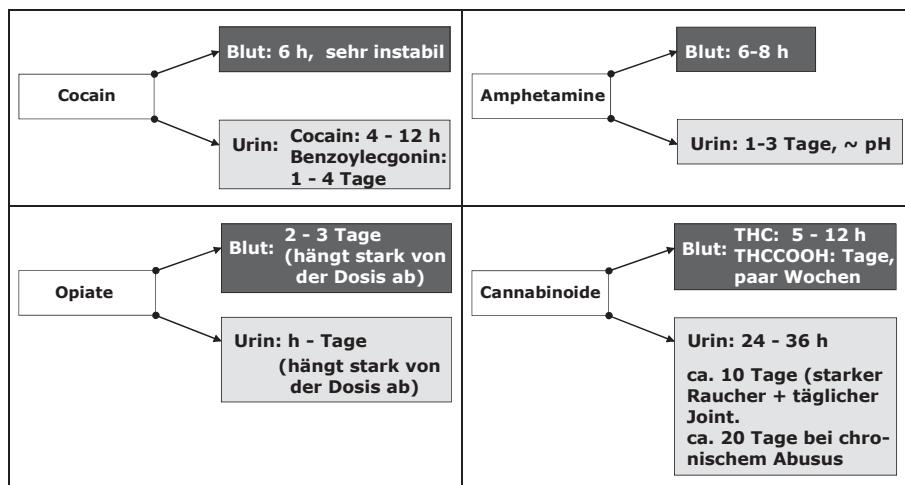


Abb. 15.6 Zeitabhängige Nachweisbarkeit von Drogen im Blut und Urin

Während einzelne Drogen vor allem mit immunologischen Methoden, die sich durch hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnen, routinemäßig in den Klinischen Laboratorien bzw. innerhalb der Rechtsmedizin erfasst werden, dringen (kostenintensive) instrumentelle Methoden (Kopplungstechniken LC-MS, GC-MS) immer stärker in dieses Gebiet bzw. in diesen „Markt“ ein.

Zur simultanen Bestimmung von Drogen und deren Metaboliten bieten sich demzufolge auch hier chromatographische Trennmethoden an, die sich durch hohe Empfindlichkeit, sehr gute Trenneffizienz und wichtige Strukturinformationen auszeichnen. So kann die HPLC mit einem Dioden-Array-Detektor neben den Retentionsdaten der Drogen-Species auch gleichzeitig UV/VIS-Spektren aufzeichnen. Durch Abgleich dieser Spektren mit den entsprechenden in einer Datenbank gespeicherten Spektren sind Identifizierungen von Drogen möglich. Vor allem durch Kopplungen der LC oder GC mit der Massenspektrometrie wird der Informationsgehalt über die Strukturen der Drogen durch Auswertung von Molekül- und Fragmentionen erheblich gesteigert.

15.2.3 HPLC-Analytik von Drogen

Die Hochleistungsflüssigchromatographie wird für Drogen, die in einer Flüssigkeit (Eluent, mobile Phase) gut löslich sind, eingesetzt. Analysiert werden u.a. Designerdrogen (Amphetamine, Ecstasy bzw. MDMA: 3,4-Methylendioxy-N-methyl-amphetamine), (LSD Lysergsäurediethylamid), Coffein oder Heroin und seine Begleitkomponenten eingesetzt.

Entscheidend für die Strategiewahl zur Probenaufbereitung ist die Matrix, aus der die Droge/der Wirkstoff isoliert werden soll. Meist sind die Untersuchungsobjekte auch hier Urin oder Serum. Sowohl klassische Extraktionsmethoden (LLE), verschiedene Varianten der Festphasenextraktion (SPE) und miniaturisierte Extraktionsvarianten gehören zum jeweiligen Aufarbeitungsprotokoll der Drogen.

Einfacher zu analysieren sind Wirkstoffgemische in Pulverform. Diese werden z.B. in Acetonitril aufgenommen und im Ultraschallbad längere Zeit (ca. 30 Minuten) vollständig aufgelöst. Erforderliche Probeverdünnungen werden mit der mobilen Phase bzw. mit Anteilen dieses Eluenten (saurer Phosphatpuffer, pH-Wert liegt um 3) vorgenommen.

In Abbildung 15.7 und 15.8 sind zwei Beispiele aus der Drogenanalytik (Heroin-Probe, Opium-Probe) mittels HPLC aufgeführt. Die Trennung erfolgte an RP-Phasen mittels Gradientenelution (A: Acetonitril; B: 15 mM Phosphatpuffer, pH = 3,5). Zur Detektion diente eine DAD, der die Elutionskurven bei einer Wellenlänge von 205 nm registrierte.

Auch LC-MS-MS-Kopplungen sind fester Bestandteil der Drogenanalytik.

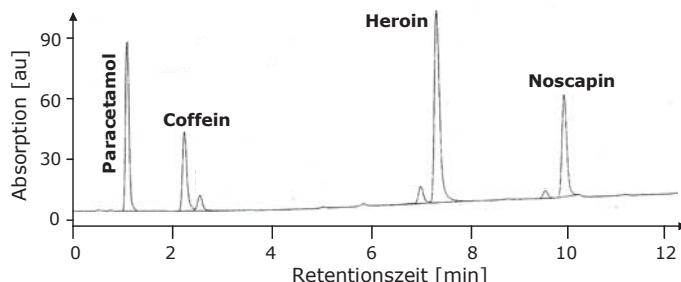


Abb. 15.7 HPLC von Stoffgruppen: Heroin-Probe

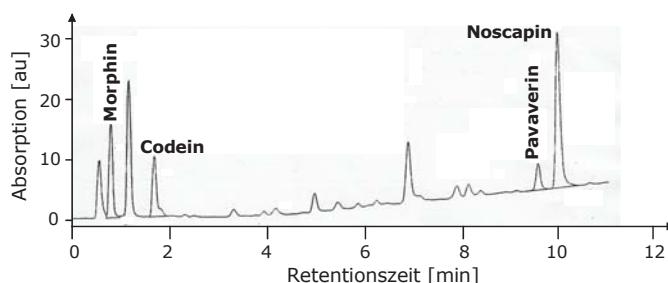


Abb. 15.8 HPLC von Stoffgruppen: Opium-Probe

15.2.4 Bestimmung von Cocain (Haar-Analyse)

Cocain wird oral, intranasal (Schnupfen), intravenös oder durch Rauchen (inhaltiv) aufgenommen. Die gewählte Applikationsform bestimmt die Schnelligkeit der Wirkung. Durch intravenöse Injektion gelangt die gesamte Dosis sehr schnell in den Blutkreislauf und auch gerauchtes Cocain wird rasch resorbiert und bewirkt in wenigen Sekunden eine Rauschanflutung. Der relativ unpolare Charakter der Substanz ist der Grund, weshalb sie die Blut-Hirn-Schranke schnell passiert und ihre Wirkung im Gehirn entfaltet.

Der Mechanismus der Cocain-Wirkung beruht auf der Blockade der Wiederaufnahme der Neurotransmitter Noradrenalin und Dopamin an den neuronalen Synapsen. Dadurch kommt es zur Anhäufung von Neurotransmittern im synaptischen Spalt, die mit einer übermäßigen Erregung der postsynaptischen Rezeptoren verbunden ist. Noradrenalin und Dopamin können die Nervenzellen ständig reizen. Die gewünschte Wirkung von Cocain besteht in einer starken Euphorie (Hochgefühl), sie ist anregend und wirkt gegen Müdigkeit und Hunger. Die Kontaktfreudigkeit wird erhöht und die Konzentrationsfähigkeit verübergend gestärkt.

Nach dem Rausch braucht das Gehirn einige Tage, um die Neurotransmitter wieder abzubauen – Depressionen, Müdigkeit und Apathie sind das Resultat.

Wie in Abbildung 15.6 gezeigt, kann Cocain nur bis zu 6 Stunden im Blut und bis zu 12 Stunden im Urin nachgewiesen werden; die Metaboliten länger. Die Metabolisierung von Cocain ist in Abbildung 15.9 dargestellt. Cocain wird im Plasma und in der Leber durch Cholinesterasen zu dem wasserlöslichen Ecgoninmethylester und durch eine nichtenzymatische Hydrolyse zu Benzoyleconin metabolisiert. Die Metaboliten können dann noch wenige Tage nach dem Cocainkonsum im Urin erfasst werden. Dieser Umstand ist nun für die Analytik von besonderer Wichtigkeit. Mit einer GC-MS-Kopplung sind neben dem Cocain auch die Stoffwechselprodukte Benzoyleconin und Methylecgonin nachweisbar. Durch die Aufnahme eines Kapillargaschromatogramms (TIC, Totalionisationsstrom, gegen die Retentionszeit) können Cocain und seine Metaboliten simultan erfasst werden. Bei Elektronenstoßionisation (*electron impact*) werden entsprechende Fragmentionen im Massenspektrum detektiert.

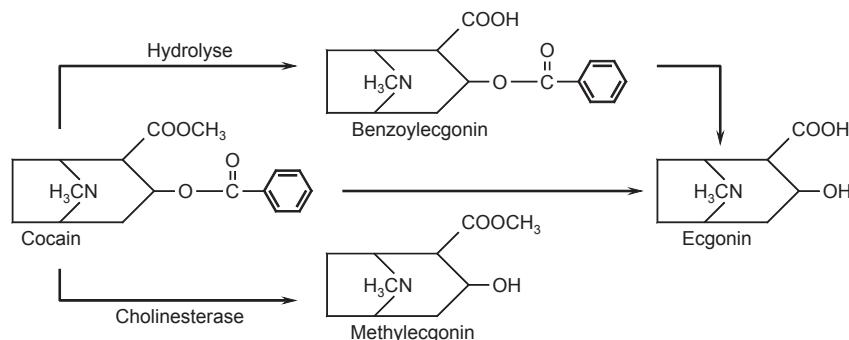


Abb. 15.9 Metabolisierung von Cocain

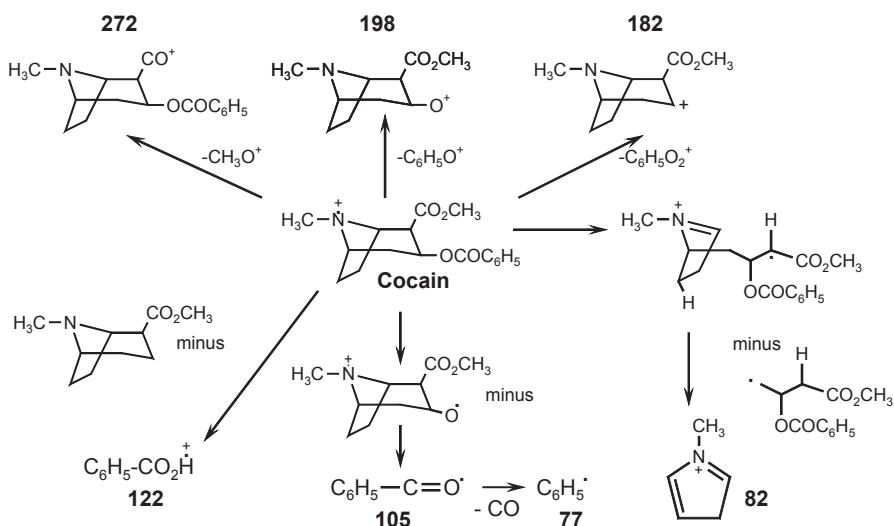


Abb. 15.10 Ausgewählte Fragmentierungen des Cocains

In Abbildung 15.10 sind ausgewählte Möglichkeiten der Fragmentierung von Cocain und in Abbildung 15.11 das entsprechende Massenspektrum dieser Droge dargestellt. Die meisten Ionen im Massenspektrum des Cocains entstehen durch α -Spaltung und Folgeraktionen (s. Kapitel 11). Ausgehend vom Methoxycarbonyl-Radikalkation (Radikalstelle und positive Ladung am Carbonyl-O des Methylesters) führt die α -Spaltung eines Methoxy-Radikals zum Fragmention 272. Das bedeutet eine Differenz zur Molmasse des Cocains (303) von 31 und resultiert aus der Abspaltung der OCH_3 -Gruppe. Somit ist das ein konkreter Hinweis auf einen Methylester.

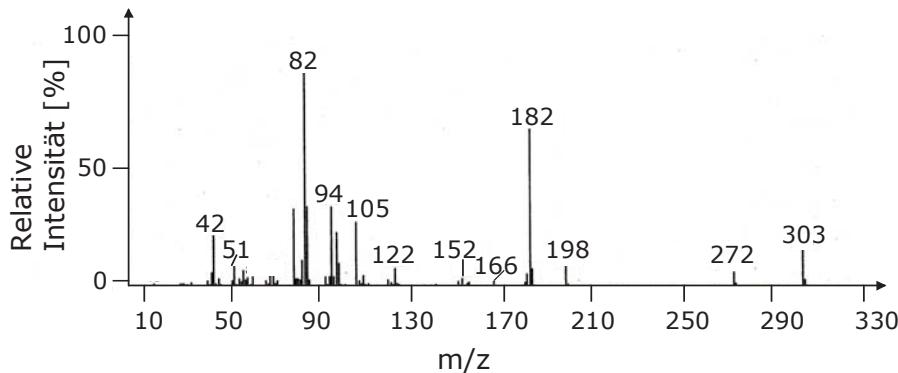


Abb. 15.11 Massenspektrum von Cocain

Befinden sich Radikalstelle und positive Ladung am Carbonyl-O-Atom der Benzoyloxy-Gruppe, so entsteht durch α -Spaltung ein Benzoyl-Kation der Masse 105. Dieses spaltet CO (Kohlenmonoxid) ab und es entsteht ein Phenyl-Kation mit der Masse 77. Diese Fragmentierung charakterisiert eine Benzoylgruppe. Liegen positive Ladung und Radikalstelle am Ring-N-Atom, so öffnet die α -Spaltung den Tropan-Bicyclus. Eine anschließende Wasserstoff-Verschiebung führt zum Ion mit der Masse 82. Das kennzeichnet den Tropanring.

Die Ionen der Massen 198 und 182 entstehen durch homolytische Spaltung der C-O-Bindungen des Benzoësäureesters.

Eine Besonderheit ist die Masse 122, die einem Radikal-Kation entspricht. Es wird durch Abspaltung eines bicyclischen Alkens gebildet, und zwar als Folge einer Wasserstoff-Verschiebung über einen sechsgliedrigen Übergangszustand (siehe McLafferty-Umlagerung in Kapitel 11.6).

Besonderes Interesse besitzt der Nachweis von Cocain und seiner Metabolite in Haaren. Der Vorteil ist, dass nicht wie im Falle von Blut- oder Urinuntersuchungen nur „Momentaufnahmen“ des Drogenkonsums gemacht werden können, sondern dass der Cocainnachweis auch über mehrere Monate hinweg möglich wird.

Menschliche Haare wachsen im Monat ca. 1 cm und lagern Drogen und Schadstoffe ein. Bei einer Haarlänge von 12 cm kann also der Konsum/Nichtkonsum von Cocain über ein ganzes Jahr hinweg – rückwirkend und praktisch Monat für Monat – analytisch festgestellt werden. Haare sind demzufolge ein sogenanntes „verschlüsseltes Gedächtnis“ des Menschen und spezialisierte Analytiker, die i.d.R. in Instituten für Rechtsmedizin tätig sind, können darin „stöbern“.

Für eine Analyse benötigt man ca. 30 mg Haare. Zur „Probenahme“ werden Haarbüschel mit einer Schnur zusammengebunden und dicht an der Kopfhaut abgeschnitten. Danach erfolgt das Zerkleinern in millimetergroße Stücke; zur Extraktion der Droge werden sie in einen neutralen Phosphatpuffer überführt. Dieser gewährleistet, dass die Estergruppen des Cocains erhalten bleiben.

Es werden deuterierte innere Standards für die nachzuweisende Droge und für die zu erwartenden Metaboliten hinzugefügt (Abbildung 15.12).

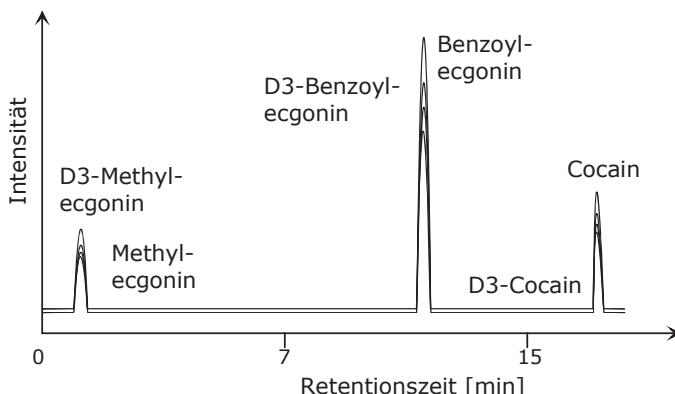


Abb. 15.12 Gaschromatogramm des Haar-Extraktes zur Cocain-Bestimmung

Der Extraktionsprozess, bei dem die Haare aufquellen und die Analyte dabei in Lösung gehen, dauert ca. 4 Stunden.

Die Standards dienen dazu, die Verluste an Cocain und seinen Metaboliten während der Probenaufarbeitung zu erfassen. Die Analysenergebnisse werden dadurch genauer und reproduzierbarer und die Wiederfindungsraten liegen in akzeptablen Bereichen.

Wie auch aus Abbildung 15.12 hervorgeht, besitzen Cocain und seinen Metabolite gegenüber den entsprechenden deuterierten Standards vergleichbare Retentionszeiten; sie unterscheiden sich aber in den Massenspektren von den nicht deuterierten Verbindungen auf Grund der zusätzlichen H-Atome.

15.2.5 Wissenswertes über Cocain

Cocain (dt. Kokain) ist ein starkes Stimulans und eine weit verbreitet konsumierte Rauschdroge mit hohem psychischem Abhängigkeitspotenzial. Strukturell gehört es zu den Tropan-Alkaloiden und es ist ein Derivat des Egonins. Die Blätter des Cocos-Strauches *Erythroxylum coca* enthalten das Cocain – die Hauptanbaugebiete liegen in Südamerika (Peru, Kolumbien, Bolivien).

Seine psychotropen Wirkungen kennen die Naturvölker schon seit Jahrtausenden. Die Inkas schrieben den Cocablättern eine Art „Göttliche Kraft“ zu.

Um 1750 kommt der Coca-Strauch auch nach Europa. Über 100 Jahre später (1860) isoliert A. Niemann den Wirkstoff und Sigmund Freud wendet Cocain zur Heilung von Depressionen an (1884). Im gleichen Jahr setzt Carl Koller das Cocain als Lokalanästhetikum in der Augenheilkunde ein.

Um 1900 wird die coffeinhaltige Coca Cola in den USA zusätzlich mit Cocain ($c\sim 250\text{mg/l}$) versetzt; Europa erfasst zu dieser Zeit eine regelrechte Cocainwelle. Auf Grund zahlreicher Cocain-Intoxikationen erfolgte das Absetzen des Cocainzusatzes in der Cola und auch in Europa ebbte nach Beginn des Ersten Weltkrieges der Cocain-Konsum wieder ab.

In den 1980-er Jahren wurde Cocain wieder populär – vor allem in Kreisen von Musikern, Künstlern, Sportlern, Politikern und Bankern.

Ein „Fast-Fußball-Bundestrainer“ stolperte über das „Nichtwahrnehmewollen“, dass Cocain längere Zeit in den Haaren nachweisbar ist – der Test war positiv und der „abstreitende“ Konsument überführt.

Sogar gut situierten Saubermannern wurde Cocainkonsum nachgewiesen; z.T. in Verbindung mit Prostituierten. Solch ein Mann ist heute weitestgehend „friedsam“. Auch bekannte Musiker „weckten“ das Interesse der Öffentlichkeit.

Man unterscheidet zwischen dem billigen „Crack“, das durch Versetzen mit Backpulver gewonnen wird, und „Koks“. Dieses Cocain ist das teuere Präparat, das durch eine Lösungsmittlextraktion mit Ether isoliert wird.

Cocain kann oral, intranasal (Schnupfen), intravenös oder durch Rauchen aufgenommen werden. Durch die beiden letzten Applikationsformen erfolgt eine sehr schnelle Wirkung, da einerseits die gesamte Dosis in den Blutkreislauf gelangt und andererseits inhaliertes Cocain sehr rasch resorbiert wird und im Gehirn anflutet.

15.3 Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine/Dibenzofurane

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF) sind zwei Gruppen von chemisch ähnlich aufgebauten chlorierten organischen Verbindungen (Abbildung 15.13 und 15.14). Sie gehören zu den sauerstoffhaltigen Derivaten von halogenierten Kohlenwasserstoffen.

Sie werden meist in der Literatur und umgangssprachlich als „Dioxine“ bezeichnet. Auf Grund der vielfältigen Substitutionsmöglichkeiten mit Chlor existieren 210 Stammverwandte, die auch als Kongenere bezeichnet werden. Die Gruppe der Polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine enthält 75 Kongenere und von den Dibenzofuranen sind 135 Verbindungen bekannt.

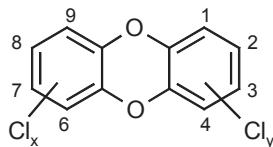


Abb. 15.13 PCDD

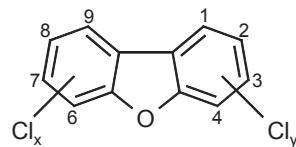


Abb. 15.14 PCDF

15.3.1 Vorkommen, Eigenschaften

Dioxine gehören nicht zu den Substanzen, die in der Natur vorkommen. Sie werden auch nicht industriell hergestellt und besitzen auch keinerlei technische Anwendungsgebiete. Sie entstehen bei (unvollständigen) Verbrennungsprozessen von organischen (aromatischen) Verbindungen und in Anwesenheit von Chlorverbindungen. Dazu gehören Müllverbrennungsanlagen, Bleichprozesse mit Chlor bei der Papierherstellung oder die Produktion von Pflanzenschutzmitteln.

Auch durch Lebensmittel-Skandale (mit Dioxinen verseuchtes Tierfutter oder kontaminierte Hühnereier, Yusho-Krankheit: mit polychlorierten Dibenzofuranen belastetes Reisöl), das Agent Orange (Entlaubungsmittel im Vietnamkrieg) oder Chemieunfälle sind Dioxine bekannt geworden.

Das sogenannte Seveso-Unglück ereignete sich 1976 in Italien (Seveso). Innerhalb der Produktion von 2,4,5-Trichlorphenol aus dem Ausgangsstoff 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol durch Zugabe von Natriumhydroxid kann bei hohen Temperaturen das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin („Seveso-Dioxin“) entstehen (Abbildung 15.15).

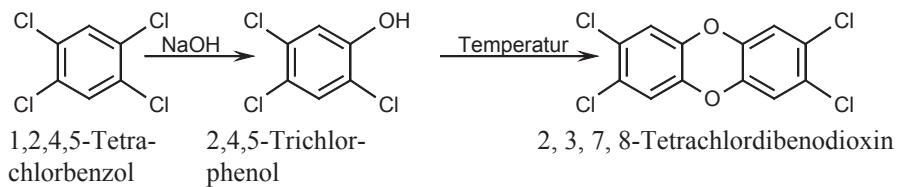


Abb. 15.15 Bildung des Seveso-Dioxins

Beim Seveso-Unglück kam es bei dieser Reaktion zu einem Druck- und Temperaturanstieg, der letztendlich eine Explosion der Produktionsanlage verursachte. Dabei wurde das Seveso-Dioxin in größeren Mengen freigesetzt. Natur und Tiere wurden dramatisch geschädigt, Menschen erkrankten u.a. an Chlor-Akne.

Dioxine sind superhydrophob und lagern sich als lipophile Substanzen bevorzugt in Fetten (z.B. in der Muttermilch) ein. Auf Grund der Chlorsubstitutionen sind sie sehr stabil. Diese Persistenz nimmt mit steigendem Chlorgehalt im Molekül zu. Dioxine sind auch ubiquitär.

Die Toxizitäten der einzelnen Species sind z.T. extrem unterschiedlich (s. Kapitel 15.3.4), weshalb der analytische Nachweis einzelner Dioxine (s. Kapitel 15.3.3) für die Bewertung einer Gefährdung essentiell ist.

15.3.2 Problematik der Dioxin-Bestimmung

Dioxine kommen meist nur in sehr geringen Konzentrationen in umweltrelevanten und biologischen Proben vor. Sie müssen deshalb angereichert werden und erfordern hochempfindliche instrumentelle Analysenmethoden für ihre qualitative und quantitative Bestimmung. Diese Aufgaben übernehmen i.d.R. hochspezialisierte Labore für Dioxin-Analytik.

Das Verständnis für eine Spurenanalytik erfordert gesonderte Betrachtungen über die Kleinheit der zu bestimmenden Konzentrationen in einer Probe. In Abbildung 15.16 ist dies anschaulich dargestellt.

Die Größe von 1 mm^2 eines Stecknadelkopfes beträgt 1% bezogen auf die Fläche eines Daumennagels mit einer Fläche von 1 cm^2 . Im Vergleich zum Teelicht (10 cm^2) ist das 1 Promille (1 Teil pro Tausend). Es folgen die Angaben ppm (*parts per million* oder 1 Teil pro Million, $c = 1\text{mg/kg}$; ppb: *parts per billion* oder ein Teil pro Milliarde, $c = 1\mu\text{g/kg}$). Oder bildlich betrachtet – der Stecknadelkopf in 1 m^2 bzw. 1000 m^2 .

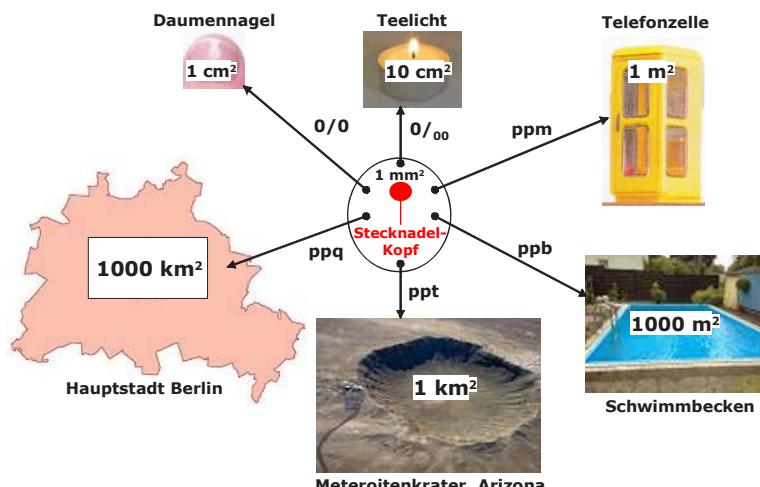


Abb. 15.16 Konzentrationsmaße

Noch kleiner sind die Konzentrationsmaße für die Dioxinanalytik – 1 ppt (*parts per trillion*, 1 Teil pro Billion, $c = 1\text{ng/kg}$) oder 1 ppq (*part per quadrillion*, 1 Teil pro Billiarde, $c = 1\text{pg/kg}$).

Handelt es sich also z.B. um 1 ng Dioxin pro 1 kg Fett (im Futtermittel) bzw. um 1 pg Dioxin pro 1 g Fett, dann bedeutet das, dass sich der Stecknadelkopf in einem Meteoritenkrater der Größe von 1 km² befindet!

Derartig kleine Dioxinmengen können nach dem heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand keine toxischen Wirkungen induzieren. Im Fall eines Fundes von 3 pg Dioxin in 1 g Fett kommt hinzu, dass es nur zu 10% dem Futtermittel zugesetzt wurde (also 0,3 pg). Außerdem ist zu beachten, dass der Weg des Dioxins über das Tier bis zum Menschen weitere Verluste der Substanz erfährt.

15.3.3 Aufarbeitung und GC-MS-Analytik von Dioxinen

Die Dioxin-Analytik ist i.d.R. hochspezialisierten Laboren vorbehalten. Neben einer hochauflösenden Kapillargaschromatographie ist vor allem das erforderliche hochauflösende Massenspektrometer der dominierende Kostenfaktor. Die Probenvorbereitung, das Arbeiten mit inneren Standards und die extrem hohen Reinheitsanforderungen an Analysengefäße und -materialien, an Chemikalien und Laborräume erlauben keine routinemäßigen „Nachahmungen“ im üblichen Sinne.

Dieses Kapitel soll trotzdem einen ersten Einblick in die Dioxin-Analytik vermitteln. Grundlage dafür sind entsprechende Arbeitsvorschriften. Eine gute Darstellung der GC-MS von Dioxinen erfolgte durch R. Salzer, S. Thiele, A. Zuern: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/dioxine/dioxinanalytik.vlu.html>.

In Abbildung 15.17 ist ein Flusschema zur Dioxin-Analytik vom Prinzip her dargestellt. Für jede verschiedene umweltrelevante oder biologische Probenahme sind gesonderte Methoden und Vorgehensweisen in entsprechenden DIN-Vorschriften beschrieben. So ist es sehr unterschiedlich, ob Dioxine in Abgasen (siehe DIN EN 1948-1) oder in Matrices der Futter- und Lebensmittelindustrie bestimmt werden sollen. Wie die Probenahme hängt auch die Probenreinigung (Extraktion, Einengen, Säulenchromatographie) von der Art der Probenmatrices ab. Diese muss vor der Dioxinbestimmung entfernt werden.

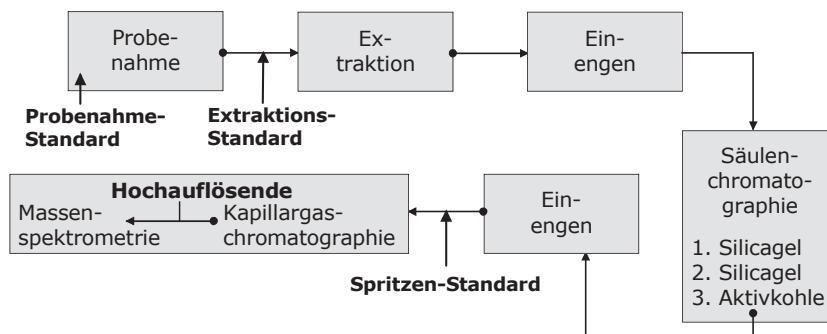


Abb. 15.17 Ablaufschema zur Dioxinanalytik

Dabei können Substanzverluste eintreten, da Dioxine an aktiven Stellen der Geräte und Materialien (z.B. Glas) sorptiv zurückgehalten werden können und damit in der Gesamtkonzentration nicht enthalten sind. Bei weiterer Verwendung der Apparaturen können hingegen die Dioxine in die neue Probe verschleppt werden und einen höheren Gesamtgehalt vortäuschen.

Um Verluste, Verschleppungen und andere Effekte zu minimieren, wird mit inneren Standards gearbeitet. Dazu werden $^{13}\text{C}_{12}$ -markierte Dioxine verwendet, von denen auf Grund ihrer vergleichbaren physikalisch-chemischen Eigenschaften im Vergleich zu unmarkierten Species ähnliche Wiederfindungsraten zu erwarten sind. Andererseits unterscheiden sie sich in ihren Massezahlen ($^{12}\text{C}_{12}$ versus $^{13}\text{C}_{12}$) zwar nur sehr gering, können aber einzeln bzw. nebeneinander mit einem hochauflösenden Massenspektrometer ausgewertet bzw. quantifiziert werden.

Das Zusetzen von $^{13}\text{C}_{12}$ -markierten Dioxine erfolgt (s. Abb. 15.17) vor der Probenahme (Probenahmestandards), vor der Extraktion (Extraktionsstandards) und unmittelbar vor der GC-Injektion (Spritzenstandards). Bei den Spritzenstandards geht man davon aus, dass sie auf das analytische System ohne jeglichen Verlust übertragen werden und dass sie die Bestimmung der Wiederfindungen der in einem früheren Verfahrensschritt zugesetzten Kongenere ermöglichen.

Wiederfindungsraten zwischen 50 und 130 % sind einzuhalten. Diese große Spanne verdeutlicht aber auch die enormen Einflüsse durch Substanzverlust, Verschleppung oder Kontaminationen.

Um die einzelnen Kongenere der Dioxine nach Probenahme und Probenvorbehandlung mit ausreichender Sensitivität und Selektivität bestimmen zu können, ist die hochauflösende Kapillar-GC-MS-Kopplung essentiell. Hochauflösendes Massenspektrometer mit Auflösungen größer 10 000 sind wie erwähnt finanziell und personell nur in wenigen Speziallaboren möglich.

Am Beispiel des Seveso-Dioxins (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin) soll die analytische Herangehensweise in der Dioxin-Analytik demonstriert werden. Durch die Aufnahme des Chromatogramms (Intensität gegen die Retentionszeit) wird der Dioxinpeak ermittelt – z.B. nach 10 Minuten. Zur Trennung dienen Fused-Silica-Kapillarsäulen (Rtx 2330) mit einer Länge von 60 m und einem Innen-durchmesser von 250 μm . Die Filmdicke beträgt 0,1 mm. Die Injektion ($V = 2 \mu\text{l}$) erfolgt splitlos bei einer Injektortemperatur von 270 °C. Als Trägergas dient Helium und es wird mit einem Temperaturprogramm (70 °C 1 min halten, mit 25 °C/min auf 200 °C heizen, dann mit 3 °C/min auf 275 °C heizen, 275 °C 4 min halten) gearbeitet.

Die Ionisation der Dioxin-Moleküle erfolgt durch Elektronenstoß (13 eV, 0,5 mA). Es kann im SIM-Modus bei der molekularen Masse des Dioxins von 321,97 detektiert werden. Hinter dem Peak verbirgt sich die Strukturinformation für 2,3,7,8-TCDD in Form des Massenspektrums (Abbildung 15.18).

Für die Auswertung dient nicht das vollständige Massenspektrum, sondern nur der Bereich um den Molpeak (molekulare Masse). Die Identifikation erfolgt über die relative Häufigkeit der Isotopenverteilung des Chlors.

Deshalb wird immer ein interner Standard zugesetzt, der dieselbe Struktur wie das native Dioxin hat, aber hier sind alle C-Atome durch ^{13}C ersetzt.

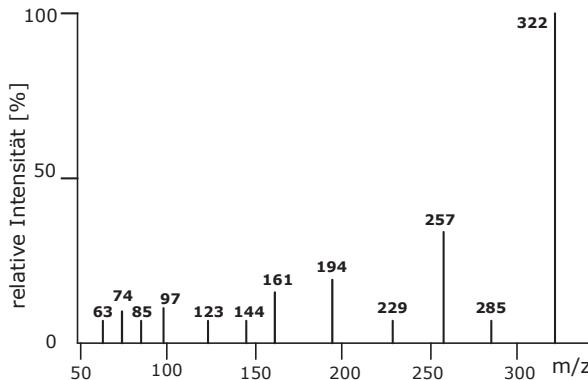


Abb. 15.18 Massenspektrum von 2,3,7,8-TCDD (schematisch)

Wie bereits beschrieben, erfolgt die Zugabe des Standards vor der Probenvorbereitung und durchläuft somit alle Aufarbeitungsschritte wie die Probenbestandteile auch (Extraktionsstandard). Es ergeben sich zur Originalmolmasse Erhöhungen um 12. Dadurch sind beide Verbindungen gut im Massenspektrum zu unterscheiden (Abbildung 15.19). Üblich ist, von jedem Dioxin 2 Bruchstücke im Massenspektrometer zu registrieren und ihre Massen zur Quantifizierung heranzuziehen (vergleiche nativ: $^{12}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD: 319,8965 und 321,8936; markiert: $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD: 331,9366 und 333,9336 gmol^{-1}).

Die Bruchstücke werden als integrale Peakflächen für die Kalibrierung genutzt. Das Verhältnis der Flächen A vom nativen TCDD zum C_{13} -markierten TCDD und der dazugehörigen Konzentrationen werden zur Berechnung des Responsefaktors (Anstieg der Kalibriergeraden) verwendet. Mit dem Responsefaktor kann dann aus einem gemessenen Flächenverhältnis $A-\text{C}_{12}/AC_{13}$ eines Peaks der Probe die vorhandene Masse m errechnet werden.

Neben der hochauflösenden GC-MS-Kopplung sind absolute Sauberkeit aller Geräte und Chemikalien, Reinraumbedingungen/Schleusen und ein erfahrener und sehr gut qualifiziertes Personal erforderlich.

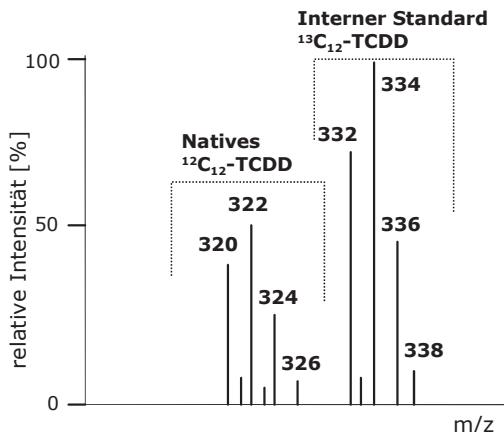


Abb. 15.19 Massenspektrum $^{12}\text{C}_{12}$ -TCDD versus $^{13}\text{C}_{12}$ -TCDD (Ausschnitt)

15.3.4 Toxizität von Dioxinen

Die Komplexität und der hohe Schwierigkeitsgrad, einzelne Dioxine in kleinsten Mengen (Picogramm-Bereich) und in sehr komplexen Matrices (Fett, Futtermittel, Eier) qualitativ und quantitativ zu bestimmen, ist die eine problematische Seite dieser Spurenanalytik. Die andere Seite ist, die unterschiedlichsten Toxizitäten der einzelnen Dioxin-Kongenere zu ermitteln und zu bewerten.

Eine gängige Möglichkeit ist das Heranziehen der LD₅₀ (Letale Dosis) für einzelne Dioxine wie z.B. das 2,3,7,8-TCDD. Diese hängt bereits sehr stark von den eingesetzten Tierspecies ab. So beträgt die LD₅₀ beim Meerschwein 1 µg/kg nach oraler Applikation von 2,3,7,8-TCDD. Für die Ratte sind aber immerhin 20 µg/kg und beim Kaninchen sogar 100 µg/kg notwendig, damit 50% der Versuchstiere sterben (LD₅₀).

Andererseits existieren zwischen den Kongeneren der Polychlorierten Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane untereinander ganz erhebliche Unterschiede in den Toxizitäten (Abbildung 15.20). Um diese Unterschiede zu egalisieren und zur besseren Abschätzung wurde das Konzept der Toxizitätsäquivalente (TEQ) eingeführt. Die Toxizität des 2,3,7,8-TCDD, das giftigste Kongener der polychlorierten Dibenzodioxine, wird dabei definitionsgemäß gleich 1 gesetzt. Die übrigen Dioxin- und Furan-Species erhalten Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) zwischen 0,0001 und 1. Ein Kongener mit einem Toxizitätsäquivalent von 0,5 ist demzufolge nur halb so giftig wie das 2,3,7,8-TCDD.

Als akute Toxizitäten werden Reizzungen im Atemtrakt, Störungen des Immunsystems oder auch unspezifische Symptome wie Müdigkeit und Schwäche beobachtet. Das charakteristische Merkmal einer chronischen Toxizität bei Dioxinvergiftungen ist die Chlor-Akne. Akne ist die Bezeichnung für Erkrankungen des Talgdrüsenaapparates mit entzündlichen Pusteln. Der ehemalige ukrainische Präsident Wiktor Juschtschenko wurde 2004 Oper eines Dioxinattentats. Obwohl die Konzentration in seinem Blut ca. 50 000-mal höher im Vergleich zum Normalwert war, überlebte er. Auch die starke Chlor-Akne im Gesicht bildete sich zurück.

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, Seveso-Dioxin		TEF = 1,0
50% Seveso-Dioxin-Toxizität:	1,2,3,7,8-Pentachlordibenzodioxin	TEF = 0,5
10%	1,2,3,4,7,8-Hexachlordibenzodioxin	TEF = 0,1
10%	1,2,3,6,7,8-Hexachlordibenzodioxin	TEF = 0,1
10%	1,2,3,7,8,9-Hexachlordibenzodioxin	TEF = 0,1
1%	1,2,3,4,7,8,9-Heptachlordibenzodioxin	TEF = 0,01
0,1%	Octachlordibenzodioxin	TEF = 0,001

Abb. 15.20 TEF-Werte der Dioxine im Vergleich zum 2,3,7,8-TCDD

15.4 Aminosäureanalytik mit Flüssigchromatographie

Die Bestimmung der einzelnen Aminosäuren in Proteinen/Enzymen liefert im Vergleich zu den Methoden der Proteinbestimmung mehr Informationen. Die Aminosäurezusammensetzung ergibt ein charakteristisches Profil, das zur Identifizierung eines Proteins mit Hilfe einer Datenbank bereits ausreichen kann.

Relativ aufwendig ist die Freisetzung der einzelnen Aminosäuren aus einem Protein. Dies kann durch chemische oder enzymatische Hydrolyse erfolgen. Daran schließt sich die Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der einzelnen Species an. Stein und Moor gelang das erstmals 1948 und 1972 erhielten sie dafür den Nobelpreis für Chemie. Sie verwendeten zur Aminosäuretrennung Stärkesäulen sowie Lithium- und Natriumcitratpuffer als Eluenten. Die Detektion erfolgte in einer Nachsäulenreaktion mit Ninhydrin. Eine Trennung dauerte damals noch mehrere Tage; 1958 nach Verbesserungen immer noch 24 Stunden!

Die Freisetzung der Aminosäuren aus einem Protein kann innerhalb von 24 Stunden mit 6 N Salzsäure bei einer Temperatur von 110 °C und unter Ausschluss von Sauerstoff erfolgen (säure Hydrolyse). Die alkalische Hydrolyse (4 M Lithium-, Barium- oder Natriumhydroxid, 70 Stunden, Temperatur: 70 °C) und die enzymatische Hydrolyse (Einsatz mehrerer Endo- und Exopeptidasen nacheinander) werden nur selten angewandt.

Die Bestimmung von freien Aminosäuren ist besonders wichtig für die Charakterisierung physiologischer Proben (Urin, Serum, Plasma) innerhalb der klinischen Chemie. Damit können Erkrankungen (Phenylketonurie) bzw. Störungen im Aminosäurestoffwechsel erkannt werden. Auch in der Lebensmittelindustrie und biologischen Forschung hat die Aminosäureanalytik große Bedeutung.

15.4.1 Problematik der Aminosäureanalytik

Die Problematik der Analytik von Aminosäuren beginnt bereits mit der Aufarbeitung (Hydrolyse, s.o.) der Proben. Auch die Komplexität biologischer Proben (Salze, Fette, Proteine, freie Aminosäuren u.a.) erfordern Probenvorbereitungstechniken wie z.B. Präzipitation, Filtration, Zentrifugation. Hinzu kommt, dass in physiologischen Flüssigkeiten nicht nur die protinogenen Aminosäuren aufzutrennen sind, sondern ca. 30 weitere (exotische) Aminosäuren.

In diesem Zusammenhang steht somit ein weiteres Problem, das aus der großen strukturellen Vielfalt der Species resultiert. Die Aminosäuren können sauer oder basisch sein oder sie verfügen über unpolare Substituenten (Alkyl-, Phenylreste) im Molekül. Schwefelhaltige Aminosäuren enthalten Thiolgruppen. Somit ergeben sich große Polaritätsunterschiede zwischen den Species – vom relativ unpolaren über den mittelpolaren bis zum signifikant polaren Charakter. Dies erfordert für ihre flüssigchromatographische Trennung, dass entweder verschiedene Ionenaustauscher (Kationen-/Anionenaustauscher) in Kombination eingesetzt werden oder dass die Aminosäuren in relativ einheitliche (unpolare) Species überführt werden. Dadurch resultieren die Techniken *post column derivatisation* und *pre column derivatisation*.

15.4.2 Post column derivatisation

Bereits Stein und Moore verwendeten Ninhydrin zur Derivatisierung von Aminosäuren nach der Trennsäule. Heutzutage werden voll automatisierte Aminosäureanalysatoren (z.B. Firma Sykam) mit optimierten Trennsystemen routinemäßig eingesetzt, die ca. 50 Aminosäuren in ca. 1 Stunde auftrennen können.

In Abbildung 15.21 ist der prinzipielle Aufbau eines Analysators, der im Wesentlichen dem eines Flüssigchromatographen entspricht, dargestellt. Underivatisierte Aminosäuren werden über verschiedene Ionenaustauscher-Säulen getrennt. Dafür sind mehrere unterschiedliche Puffer-Lösungen notwendig, die auch in einer Mischkammer zusammengeführt werden können. So kommen z.B. saure Citratpuffer ($\text{pH}=2$) und Stufengradienten mit steigendem pH-Wert und ansteigender Ionenstärke als Eluenten zum Einsatz. Im Equipment werden mehrere Hochleistungspumpen verwendet, die optimale Gradienten-Formen für Basislimitrentrennungen der Aminosäuren erzeugen können. Die Probenaufgabe erfolgt automatisch mittels Probengeber.

Nach Passieren der Anordnung verschiedener Ionenaustauscher-Säulen werden die Analyte zu einem T-Stück transportiert. Dort treffen die Aminosäuren mit dem Ninhydrin zusammen, das mittels externer Dosierpumpe kontinuierlich und möglichst pulsfrei gefördert wird. Die vereinigten Flüssigkeitsströme gelangen kurz danach in einen Reaktor, der temperiert werden kann. Innerhalb eines sogenannten Coils findet die Derivatisierung der Aminosäuren mit Ninhydrin statt.

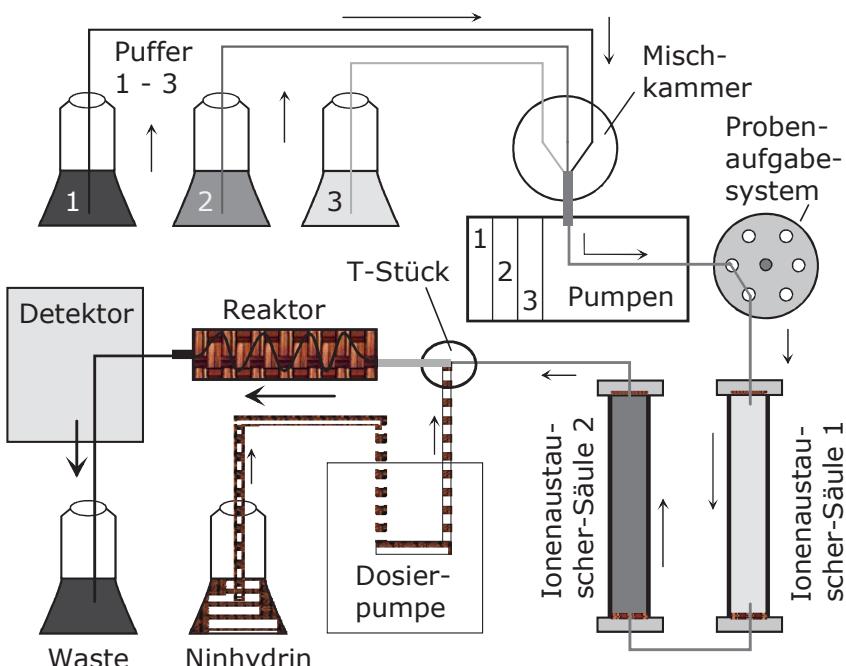
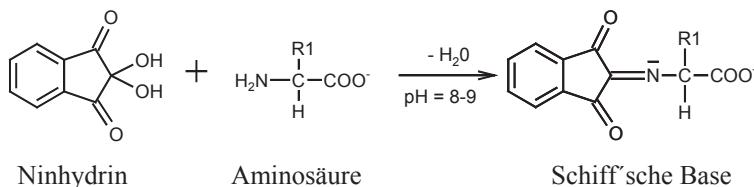


Abb. 15.21 Schematischer Aufbau eines Aminosäureanalysators (vereinfacht)

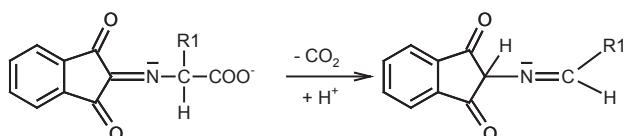
15.4.2.1 Derivatisierung mit Ninhydrin

Die einzelnen Reaktionen sind in Abbildung 15.22 (a-d) zusammengefasst. Ninhydrin reagiert mit der Aminogruppe von Aminosäuren im basischen Milieu unter Abspaltung von Wasser zu einer Schiff'schen Base (Imin). Nach Decarboxylierung der Carboxygruppe der Aminosäure und nachfolgender Abspaltung des Amino-Restes entsteht das Amino-Ninhydrin. Dieses dimerisiert mit Ninhydrin zu einem violetten Farbstoff (Ruhemanns Purpur).

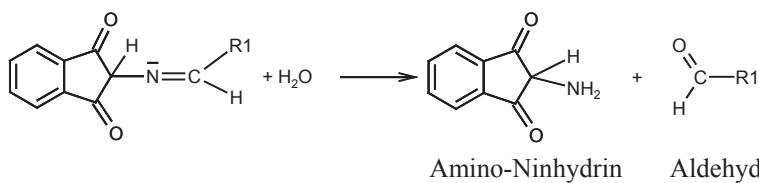
a) Bildung der Schiff'schen Base



b) Decarboxylierung am Aminosäurerest



c) Hydrolyse des decarboxylierten Produktes



d) Reaktion des Amino-Ninhydrins mit einem zweiten Ninhydrinmolekül

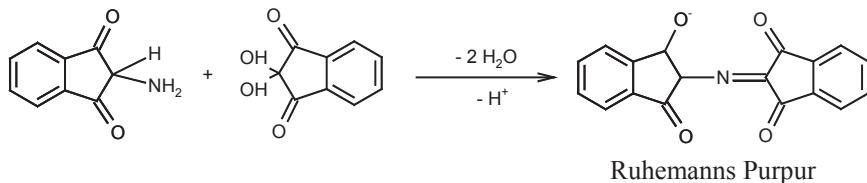


Abb. 15.22 Derivatisierung von Aminosäuren mit Ninhydrin (a-d)

Die intensiv-violette Farbe kann durch Mesomerie unter der Beteiligung einer Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Systems konjugierter Doppelbindungen erklärt werden.

Die Intensität der Farbe ist der Konzentration des Farbstoffes und somit der Konzentration einer zu analysierenden Aminosäure proportional. Primäre Aminosäuren werden photometrisch bei 570 nm vermessen. Bei der Reaktion mit sekundären Aminosäuren, wie Prolin oder Hydroxyprolin, entsteht ein gelber Farbkomplex, der bei 405 nm detektiert wird.

Die Nachweisgrenze für mit Ninhydrin derivatisierte Aminosäuren liegt bei 50 Picomol (pmol).

15.4.2.2 Derivatisierung mit Fluorescamin

Das Reagens Fluorescamin besitzt keine Eigenfluoreszenz. Erst nach seiner Reaktion mit einer primären Aminosäure entstehen Fluoreszenzderivate (Abbildung 15.23), die mit einer Wellenlänge von 330 nm angeregt (λ_{ex}) werden. Das emittierende Fluoreszenzlicht (λ_{em}) erscheint im langwelligeren Bereich bei 475 nm. Im Vergleich zur Ninhydrinderivatisierung können diese Derivate mittels Fluoreszenz sensitiver detektiert werden. Sie sind aber in wässriger Lösung nur wenig stabil, weshalb diese Methodik nur wenig angewandt wird.

Weitere Derivate für die Fluoreszenzdetektion entstehen, wenn primäre Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) umgesetzt werden. Dieses Reagens kann in der Aminosäureanalytik sowohl für Nachsäulen- als auch Vorsäulenreaktionen eingesetzt werden.

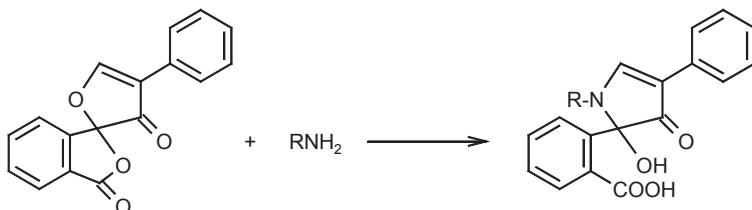


Abb. 15.23 Derivatisierung von Aminosäuren mit Fluorescamin

15.4.3 Pre colum derivatisation

Vorsäulenderivatisierungen haben zum Ziel, die Unterschiede der Aminosäuren in ihren Polaritäten weitestgehend zu egalisieren. Erfolgt die Umwandlung zu unpolaren Produkten, so kann die robuste Reversed-Phase-Chromatographie zur Trennung eingesetzt werden. Werden darüber hinaus stabile Fluoreszenzderivate gebildet, sind auch sehr niedrige Nachweisgrenzen möglich.

Ein ideales Derivatisierungsreagens sollte zu einer quantitativen und reproduzierbaren Reaktion führen und nur ein einziges stabiles Derivat von jeder Aminosäure bilden. Mögliche Nebenprodukte sind zu vermeiden bzw. sollten die chromatographische Trennung und die Detektion nicht stören.

15.4.3.1 Ortho-Phthaldialdehyd (OPA)

OPA wird jedoch häufiger in der Derivatisierung von Aminosäuren vor der Säule eingesetzt. Die Derivate erhalten eine gewisse (einheitliche) Unpolarität und können dadurch sehr gut mittels RP-HPLC getrennt werden.

Mit OPA reagieren jedoch nur primäre Aminosäuren. Die Reaktion (Abbildung 15.24) erfolgt mit einem Thiol (Mercaptoethanol) zum 1-alkylthio-2-alkyl-substituierten Isoindol im alkalischen Bereich bei Raumtemperatur.

Vorteilhaft sind die kurze Reaktionszeit von 1–2 min sowie die sehr empfindliche Detektion mittels Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Die Nachweisgrenze liegt zwischen 10 pmol und 200 fmol.

Auch die UV-Registrierung der Derivate bei 230 nm wird praktiziert. Sekundäre Aminosäuren müssen durch Oxidation mit Natriumhypochlorit (NaClO) erst in primäre Aminosäuren umgewandelt werden.

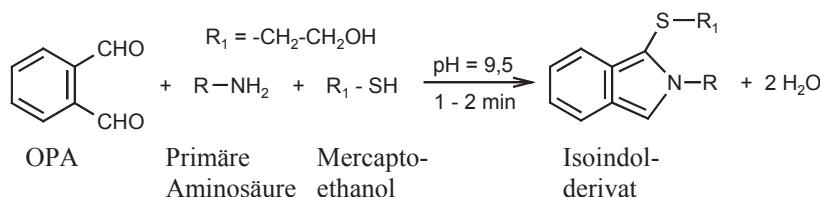


Abb. 15.24 Derivatisierung von primären Aminosäuren mit OPA

16.4.3.2 Phenylisothiocyanat (PITC)

PITC ist ein Derivatisierungsreagenz, das auch beim Abbau von Aminosäuren nach Edman eingesetzt wird (s. Kapitel 2.1.2.3). Die andere Bezeichnung „Phenylsenföl“ ist auf die Verwandtschaft mit Allylisothiocyanat – dem Geschmacksträger des Senfs – zurückzuführen.

PITC reagiert sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminosäuren. Die gebildeten Phenylthiocarbamoyl-Derivate (PTC-Aminosäuren, siehe auch Abbildung 15.25) sind stabil und es entstehen keine störenden Nebenprodukte. Bei einer Detektion im UV-Bereich sind ca. 1 pmol noch nachweisbar.

Im Vergleich zu *ortho*-Phthaldialdehyd sind die Reaktionszeiten deutlich höher (ca. 20 Minuten).

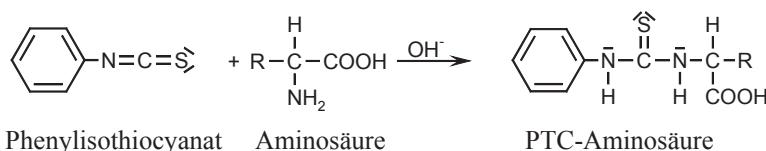


Abb. 15.25 Derivatisierung von Aminosäuren mit PITC

15.4.3.3 Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC)

FMOC spielt u.a. in der Festphasen-Peptid-Synthese als „Schutzgruppe“ für Amine/Aminosäuren eine wichtige Rolle. Es dient in der Aminosäureanalytik zum Nachweis von primären und sekundären Aminosäuren; allerdings unter sauren Bedingungen (Abbildung 15.26).

Die entstandenen FMOC-Aminosäure-Derivate sind stabile und können mittels UV-Detektion ($\lambda = 260$ nm) oder Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 305$ nm) registriert werden. Bis zu 50 fmol sind noch nachweisbar.

Ein Nachteil ist, dass auf Grund möglicher Co-Elutionen mit Aminosäuren das Derivatisierungsreagens entfernt werden muss.

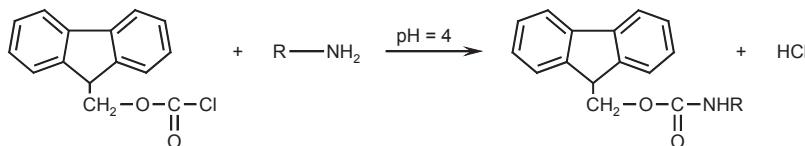


Abb. 15.26 Derivatisierung von Aminosäuren mit FMOC

15.4.3.4 Dabsylchlorid

Dabsylchlorid (4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid, DABS-Cl) dient der Derivatisierung von primären und sekundären Aminosäuren (Abbildung 15.27). Die Umsetzung erfolgt bei einer Temperatur von 70 °C und einem pH-Wert von 9 innerhalb von ca. 10 bis 15 min. Die Dabsyl-Cl-Derivate bleiben über einige Wochen hinweg stabil. Sie absorbieren im sichtbaren Spektralbereich bei 436 nm. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 1 pmol.

Von Nachteil ist, dass exakt der vierfache Überschuss an Reagens bezogen auf die zu derivatisierenden Aminosäuren erforderlich ist.

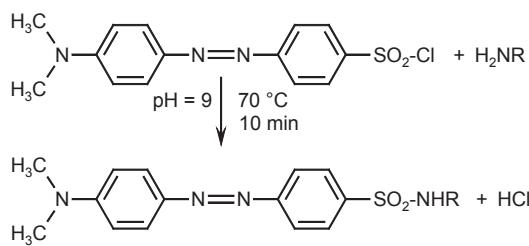


Abb. 15.27 Derivatisierung von Aminosäuren mit DABS-Cl

15.4.3.5 Dansylchlorid

Dansylchlorid, 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid, wird als Reagens für primäre aliphatische und aromatische Aminogruppen eingesetzt und ist somit auch für die Aminosäureanalytik geeignet.

Dansylchlorid bildet mit Aminosäuren stabile Sulfonamide, die blau bzw. blaugrün fluoreszieren. Auf Grund der sehr langen Reaktionszeit (s. Abbildung 15.28) ist die Anwendung eher selten.

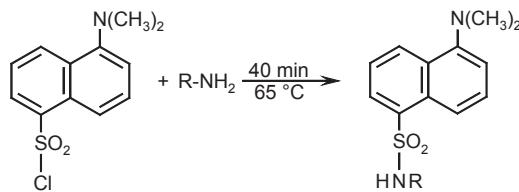


Abb. 15.28 Derivatisierung von Aminosäuren mit Dansylchlorid

15.4.4 Chromatogramme von Aminosäure-Trennungen

Eine relativ einfache Aminosäuretrennung (ASP, GLU, ASN, SER, GLN, HIS, THR, ALA, TYR, TAU, ARG, VAL, MET, ILE, TRP, LEU, PHE, LYS) erfolgt nach Vorsäulen-Derivatisierung der Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd an RP-18-Säulen, mit einem Acetonitril-Gradienten und mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion, die wir bereits in den 1980-er Jahren durchgeführt haben (Abb. 15.29). Die sekundäre Aminosäure Prolin kann hier nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 15.4.3.1).

Neue Applikationen zur Analyse von Aminosäuren beinhaltet die Application Note 009 von GROM Analytik+HPLC (www.grom.de).

Nähtere Informationen zu Aminosäure-Analysatoren mit Nachsäulenderivatisierung sind bei Sykam Chromatographie (www.sykam.de) abrufbar.

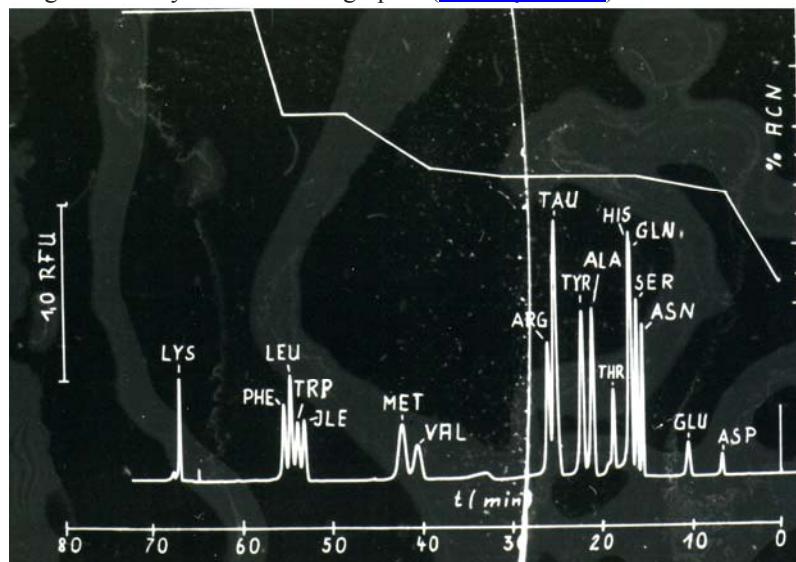


Abb. 15.29 Pre column derivatisation mit OPA

15.5 Metallothioneine, Thiolspecies in Zellen

Die Strukturen von Glutathion, Phytochelatinen und Metallothioneinen wurden bereits im Abschnitt 2.1.4 dargestellt und einführend diskutiert. Phytochelatine kommen meist in Pflanzen sowie in einigen Pilzen vor, während Metallothioneine der Klassen I und II Bestandteile fast aller menschlichen und tierischen Zellen sowie von einigen Pilzen sind. Das Auftreten und die Reaktionen des Glutathions, der Phytochelatine bzw. Metallothioneine sowie ihre quantitativen und strukturellen Veränderungen sind eng mit toxischen und auch „antitoxischen“ Prozessen verbunden. Dabei spielen die SH-Gruppen in diesen Polypeptiden und die Präsenz von Metallen eine entscheidende Rolle. Während z.B. Zink oder Kupfer als Mikronährstoffe für Entwicklungs- und Wachstumsprozesse („antitoxische Prozesse“) essentiell sind, wirken Schwermetalle wie Cadmium, Quecksilber oder Blei schon in geringen Dosen auf Zellen und Organismen *toxisch*, was zu schweren Erkrankungen und zum Tod führen kann.

Sowohl Pflanzen als auch Tiere und der Mensch haben gegen diese Intoxikationen Toleranzmechanismen entwickelt, durch die vor allem die giftigen Schwermetalle komplexiert (Detoxifikation) und unschädlich gemacht werden können („antitoxische Prozesse“). Auf Pflanzen wirken Schwermetallionen wie Cd^{2+} , Hg^{2+} oder Pb^{2+} in höheren Konzentrationen toxisch. Die Pflanzen schützen sich vor diesen Intoxikationen, in dem sie verstärkt aus Glutathionmolekülen Phytochelatine bilden. Die Thiolgruppen dieser Peptide komplexieren die Metalle und tragen somit zur Entgiftung und zum Überleben der Pflanzen bei.

Demgegenüber werden bei Menschen und Tieren, wenn sie Schwermetall-dämpfe (Cd , Cu) einatmen, akute Lungenentzündungen und -schädigungen hervorgerufen. Die Lungenzellen verfügen auch hier über Schutzmechanismen, in dem sie schwermetallbindende Metallothioneine synthetisieren. Diese bilden Metall-Peptid-Komplexe, die nachfolgend über andere Organe (Leber, Niere) ausgeschieden werden, so dass auch hier eine Entgiftung, verbunden mit der Verminderung der Lungentoxizität, resultiert.

15.5.1 Metallothioneine

Metallothionein (MT) wurde bereits vor über 50 Jahren von Margoshes und Vallée [1] entdeckt, als sie in der Pferdeniere nach Substanzen suchten, die mit dem hohen Cadmiumgehalt in Verbindung stehen. Bis heute sind die zahlreich gefundenen Metallothioneine [1-10] die einzigen bekannten biologischen Substanzen, die dieses Metall enthalten.

Metallothioneine der Klasse I sind in ihrer Primärstruktur den aus Pferdeniere isolierten Polypeptiden sehr ähnlich, während in der Klasse II die Polypeptide davon abweichende Strukturen aufweisen. Die MT der Klasse I sind charakteristisch z.B. für Mensch, Taube oder Forelle, während in der Hefe oder im Seeigel Metallothioneine der Klasse II zu finden sind.

Metallothioneine aus tierischen Geweben enthalten meist zwei Isoproteinfomren (MT-1 und MT-2), die im neutralen pH-Bereich nur geringfügig in ihren negativen Ladungszuständen differieren. Sie unterscheiden sich im isoelektrischen Punkt und in ihrer Aminosäuresequenz. Die MT-2-Form besitzt eine sehr homogene Zusammensetzung, während in der „Subklasse“ MT-1 mehrere Isometallothioneine vorhanden sind. Mit Hilfe effizienter chromatographischer Methoden (Reversed-Phase-HPLC) können diese Isoproteine, die man in der Reihenfolge MT-1a, MT-1b, MT-1c, MT-2a etc. bezeichnet, aufgetrennt und nachgewiesen werden [11-14].

Bisher wurden zwei weitere Metallthioneine entdeckt. MT-III ist ein für das Gehirn spezifisches Protein. Es ist nicht induzierbar, inhibiert das neuronale Wachstum und steht demzufolge mit der Alzheimer-Krankheit im Zusammenhang. MT-IV soll eine wichtige Rolle innerhalb der Zinkhomoöstase spielen.

Als charakteristische Merkmale für Metallothioneine gelten vor allem ein niedriges Molekulargewicht von weniger als 10 kDa (ca. 6 000 bis 7 000 Da), ein hoher Metallgehalt und das Fehlen der biologischen Aktivität. Ungewöhnlich ist auch die Zusammensetzung der ca. 60–62 Aminosäuren. Davon sind etwa 33% schwefelhaltige Aminosäuren (Cystein), die jedoch in der reduzierten Form auftreten und keine Disulfidbrücken im Molekül ausbilden. Aromatische Aminosäuren sind überhaupt nicht vorhanden. Es existieren auch Metallothioneine mit längeren Ketten von 72 bzw. 74 Aminosäureresten, die in Schnecken oder Würmern gefunden wurden. Kürzere Ketten mit ca. 25 Aminosäuren sind charakteristisch für die Metallothioneine aus Insekten und bestimmten Pilzen.

Metallothioneine tierischer Zellen enthalten im normalen physiologischen Zustand einen hohen Zinkgehalt, wenig Kupfer und gelegentlich Cadmium. Diese Metalle können in In-vitro-Experimenten durch Nickel, Kobalt oder Silber verdrängt werden. Bei In-vivo-Versuchen werden vor allem Cadmium und Quecksilber an Metallothioneine gebunden. Metalle können einerseits als Mikronährstoffe für die meisten lebenden Organismen essentiell sein, andererseits sind diese Schwermetalle nicht essentiell und können in höheren Konzentrationen toxisch wirken. Die Metallothioneine selbst besitzen für Metalle eine Speicherfunktion, tragen zur Detoxifikation von Schwermetallen bei und sind an metallregulierenden Prozessen wie der Homoöstase beteiligt. Die metallfreie Form der Metallothioneine wird als Apoprotein bzw. als Apometallothionein oder Thionein bezeichnet. Durch Cadmium induziertes Metallothionein bildet in den Zellen Komplexe (Cd-MT), die auch nierentoxisch wirken können.

Auf Grund der Anwesenheit von Schwermetallen erfolgt in tierischen und menschlichen Organen, Geweben bzw. Zellen eine starke Induktion von metall-bindenden Polypeptiden, die als Schutz vor diesen Intoxikationen dienen. Außerdem wirken auch andere chemische Verbindungen und Faktoren wie Hormone, Endotoxin, Interleukin I, α -Interferon oder Tetrachlorkohlenstoff sowie verschiedene Stressbedingungen für die Synthese weiterer Metallothioneine induzierend.

Insbesondere in der Leber und Niere, aber auch in anderen Organen wie Lunge, Magen, Bauchspeicheldrüse, Gehirn, Hoden oder Milz sind Metallothioneine in höheren Konzentrationen enthalten. Die einzelnen Metalle wirken als Induktoren organspezifisch. Beispielsweise wird durch Cadmium der Metallothioneingehalt in der Niere und in der Leber erhöht. Zink bewirkt andererseits eine MT-Zunahme in der Bauchspeicheldrüse, während Cadmium sowohl in der Niere als auch in der Leber diese Polypeptidsynthese befördert.

In Laborversuchen mit Ratten und Kaninchen können mit Hilfe der intensiven Induktoren Cadmium oder Zink Ausbeuten an Metallothioneinen bis zu 10 mg pro 1 g Gewebemasse erzielt werden. Präparative bzw. mikropräparative Isolierungs-techniken bieten sich deshalb für die Gewinnung von Metallothioneinen aus derartigen biologischen Matrices für weitere strukturelle Charakterisierungen an.

Zur Aufarbeitung und Vorrreinigung des biologischen Materials dient meist ein umfangreiches Arsenal an präanalytischen Methoden wie Homogenisation, Lösungsmittelfällung, Ultrazentrifugation oder Lyophilisation. Die chromatographische Hauptreinigung erfolgt meist durch Ionenaustrauschchromatographie und Gelfiltration sowie mittels kovalenter Chromatographie. Zur Bestimmung von Individuen dient die Reversed-Phase-Chromatographie, wie am Beispiel der Auf-trennung von Isometallothioneinen bereits erwähnt wurde.

15.5.2 Phytochelatine

Während die Isolierung und Charakterisierung der Metallothioneine aus den verschiedensten tierischen Organismen bereits in den 1960-er und 1970-er Jahren im großen Umfang erfolgte, wurden die Metallothioneine der Klasse III [15-19] bzw. die Phytochelatine (vgl. die unterschiedlichen Bezeichnungen in Abschnitt 2.1.4 und [20-22]) in verschiedenen Pflanzen, auch nicht schwermetalltoleranten, später entdeckt und erst Mitte der 1980-er Jahre identifiziert. Zuvor gab es nur Hinweise darauf, dass zwischen den für Tiere beschriebenen Metallothioneinen und den noch nicht eindeutig charakterisierten Metallothioneinen (Phytochelatinen) aus Pflanzen erhebliche Unterschiede bestehen müssen. Es wurde darüber berichtet, dass in Zellkulturen höherer Pflanzen, die mit Cadmiumionen versetzt wurden, metallothionein-ähnliche Proteine mit Molekulargewichten um 10 kDa entstehen. Vermutlich waren die chromatographischen Trennmethoden noch nicht weit ge-nug optimiert, um dieser Zeit die homologen Phytochelatine zu identifizieren.

Erste Identifizierungen von cadmiumbindenden Peptiden (Cd-BP's) gelangen Murasugi et al. 1981 [15] und Kondo et al. 1983 [16], die die Verbindungen als Cadystine bezeichneten. Sie verwendeten einen Hefestamm (*Schizosaccharomyces pombe*), in dessen Zellen nach Zugabe von höheren CdCl₂-Konzentrationen (etwa 1 mM) die cadmiumbindenden Peptide synthetisiert wurden.

Den eigentliche Durchbruch bei der Charakterisierung dieser Peptide schafften Grill et al. 1985 [17], die mit Cadmium behandelte pflanzliche Zellsuspensions-kulturen (*Rauvolfia serpentina*) verwendeten.

Derartige Fermentationsmedien (Abschnitt 15.9) bieten gegenüber den intakten Pflanzen verschiedene Vorteile wie höhere Stoffwechselaktivität, gleichmäßige Kontamination der Zellen mit Cadmiumionen, jahreszeitlich unabhängige Versuchsbedingungen, keine interferierenden Mikroorganismen oder Kultivierungsmöglichkeiten in fast beliebigen Mengen. Sie isolierten zuerst eine Peptidfraktion (M_r : ca. 3 500 Da) mit hohem Cadmium- und Thiolgehalt. Während der HPLC-Analyse an Reversed-Phase-Säulen unter sauren Elutionsbedingungen (Abschnitt 15.5.5.2) wurden mehrere Peptidpeaks registriert. Nach der Reinigung dieser Substanzen erfolgte mittels Aminosäureanalyse der Nachweis von lediglich drei Aminosäuren (L-Cystein, L-Glutaminsäure und Glycin). Daraus wurde die Grundstruktur $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$ für diese Peptidklasse „Phytochelatine“ abgeleitet, die später von Steffens et al. [18] auch mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt wurde.

Die Phytochelatine werden aus dem Tripeptid Glutathion synthetisiert (Abbildung 15.30). Schwermetallionen wie Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} oder Ag^+ aktivieren das Enzym Phytochelatin-Synthase, welches die Übertragung der Aminogruppe des Glutamats auf die Carboxylgruppe des Cysteins eines zweiten Glutathion-moleküls bewirkt. Dabei wird das Glycin abgespalten.

Durch ständige Wiederholungen dieser Biosynthese werden langkettige Phytochelatine gebildet, die bis zu 11 (Glu-Cys)-Reste enthalten können.

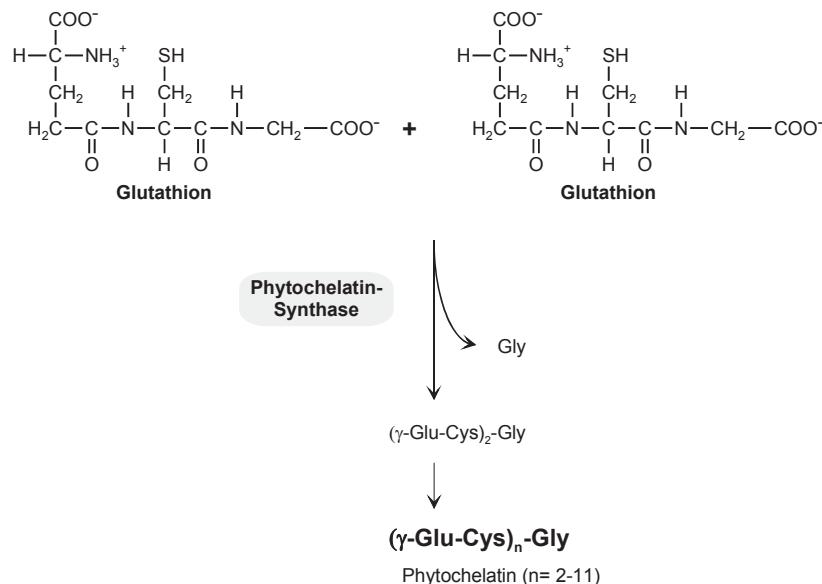


Abb. 15.30 Biosynthese von Phytochelatinen

15.5.3 Glutathion und Thiolspecies

Das schwefelhaltige Tripeptid Glutathion [23, 24] kommt in höheren Konzentrationen (millimolar) in nahezu allen Zellen und Organismen vor. Es steht im Zusammenhang mit zahlreichen biologischen Funktionen und biochemischen Prozessen. Dazu gehören Schutzfunktionen der Zellen vor Oxidation durch Sauerstoffradikale oder Peroxide, Schutz vor Xenobiotika oder radioaktiver Strahlung, Beeinflussung von Entwicklungs- und Alterungsprozessen sowie von Enzymmechanismen und Transportprozessen, immunologische Phänomene, Regulierung der Protein- und DNA-Biosynthese oder Reparaturvorgänge bei DNA-Schäden. Auch innerhalb bestimmter Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Alzheimer, Zirrhose oder Leberschäden spielt Glutathion eine wichtige Rolle.

Durch die Anwesenheit der Thiolgruppe werden Chelatisierungen von Schwermetallen, Additionsreaktionen elektrophiler Verbindungen bei der Thioetherbildung (Glutathion-S-Konjugation), Reaktionen mit freien Radikalen und Red-Ox-Reaktionen ausgelöst.

Eine dieser besonders bedeutsamen Reaktionen des Glutathions ist die Reduktion von Hydroperoxiden (ROOH , H_2O_2), die als schädliche Nebenprodukte der anaeroben Lebensweise bekannt sind, mit Hilfe der Glutathionperoxidase. Die breite Substratspezifität der GSH-Peroxidase ermöglicht die Reduktion fast aller organischer Hydroperoxide.



Reduziertes Glutathion (GSH), das als Antioxidans wirkt und die oxidierte Form, das Glutathiondisulfid (GSSG), stehen in der Zelle im Gleichgewicht. Im intakten Zustand der Zellen beträgt das Verhältnis zwischen GSH und GSSG ca. 500 : 1. Erfolgt eine Verschiebung zugunsten des GSSG (Prooxidans), wird dies als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Dieser Abfall des GSH-Levels und der damit induzierte Anstieg der GSSG-Konzentration signalisieren in der Regel Schädigungen und eine erhöhte Toxizität in Zellen, Geweben und Organen. Oxidiertes Glutathion muss demzufolge ständig aus der Zelle ausgeschieden werden. Erniedrigte GSH-Konzentrationen stehen meist mit der Pathogenese zahlreicher spezifischer Krankheiten (Diabetes, AIDS, Krebs) in Verbindung.

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit des Glutathion besteht darin, mit freien Radikalen (X^\bullet : OH^\bullet , $\text{O}_2^{-\bullet}$, RO^\bullet) direkt zu reagieren. Diese werden durch die gebildeten Thiyilradikale (GS^\bullet) „entschärft“ [23], so dass Zell- und Gewebeschädigungen verringert werden. Die GS^\bullet -Radikale reagieren weiter zum Glutathiondisulfid und anderen Verbindungen.



Die nucleophile SH-Gruppe des GSH kann leicht mit elektrophilen C-Atomen z.B. von Xenobiotika und anderer Umweltoxen reagieren. Dabei werden Thioetherbindungen zwischen dem C-Atom dieser Substanzen und den Sulfhydrylgruppen des Glutathions geknüpft. Dies wird auch als Glutathion-S-Konjugation bezeichnet. Derartige Konjugate werden bis zur Mercaptursäure abgebaut und

ausgeschieden. Die Konzentration dieser Säure kann im Urin bestimmt werden und stellt ein Maß für die Belastung des Menschen mit elektrophilen Substanzen dar, die von Chemikalien, Lösungsmitteln und anderen Umweltnoxen herrühren.

Wie im Falle der Metallothioneine werden Schwermetalle durch die SH-Gruppen des Glutathions chelatisiert. Dies gilt für tierische Zellen und Organe, von denen entsprechend detaillierte Metall-GSH-Modelle bereits existieren, während in Pflanzen eine derartige Komplexierung noch nicht beobachtet wurde.

Auch andere Thiole wie Cystein und Homocystein werden in niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu GSH in den meisten Zellen und Geweben gefunden und sind an verschiedenen zellulären Funktionen wie Proteinsynthese, Detoxifikation oder Metabolisierung beteiligt. Veränderte Gehalte an Cystein werden mit verschiedenen pathologischen Veränderungen wie Alzheimer oder Parkinson in Verbindung gebracht. Änderungen der Homocystein-Konzentration stehen demgegenüber mit Folsäure- oder Vitamin-B12-Mangel im Zusammenhang.

Das Glutathion dient weiterhin als Ausgangsverbindung für die Biosynthese von Phytochelatinen in Pflanzen. Die Synthese des Glutathions selbst erfolgt mit der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein. Zuerst wird mit Hilfe einer γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase unter ATP-Verbrauch eine Amidbindung zwischen der γ -Carboxygruppe des Glutamats und der Aminogruppe des Cysteins geknüpft (Abbildung 15.31).

In einem 2. Schritt entsteht mittels Glutathion-Synthetase zwischen der Carboxylgruppe des Cysteins und der Aminogruppe des Glycins eine Peptidbindung.

Die qualitativen und quantitativen Bestimmungen von thiolhaltigen Peptiden wie Phytochelatine und Glutathion-Species (Thiole + Disulfide) in biologischen Matrices erfordern effiziente, sensitive, selektive und schnelle analytische Methoden. Als besonders geeignet dafür erweisen sich flüssigchromatographische und z.T. kapillarelektronphoretische Methoden sowie ihre Kombinationen mit strukturanalytischen Methoden wie der Massenspektrometrie (LC-MS, CE-MS).

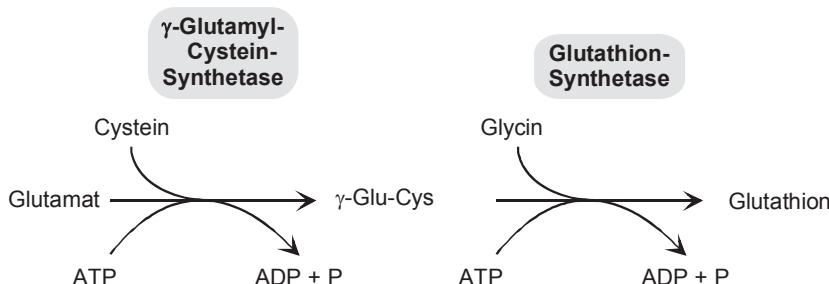


Abb. 15.31 Biosynthese von Glutathion

15.5.4 Derivatisierung und Detektion von Thiolspecies

Für die Analyse von thiolhaltigen Aminosäuren, kleinen Peptiden wie Glutathion und seinen Metaboliten existieren zahlreiche HPLC-Methoden. Auch die Kapillarelektrophorese wird zunehmend in der Thiolanalytik eingesetzt.

Besonders intensiv wird die simultane chromatographische Trennung und Quantifizierung von sehr geringen Mengen (ng- bis pg-Bereich) an reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) in biologischen Matrices bearbeitet [25-28], da ihre Veränderungen mit dem Phänomen „Oxidativer Stress“ und mit anderen biochemischen Reaktionen im Zusammenhang stehen.

Um eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, werden von den Thiolspecies mit entsprechenden Derivatisierungsreagenzien entweder vor der Trennsäule (*pre-column derivatisation*) oder danach (*post-column derivatisation*) intensiv fluoreszierende bzw. im UV/VIS-Bereich stark absorbierende Komplexe (Derivate) hergestellt.

Zur fluorimetrischen Detektion dienen u.a Monobrombiman (mBBr), *o*-Phthalaldehyd (OPA), 1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonylchlorid (Dansyl-Cl) sowie *N*-Ethylmaleinimid (NEM) oder *N*-(1-Pyrenyl)maleinimid (NPM).

Bei der Registrierung im UV/VIS-Bereich werden zur Derivatisierung das Ellman-Reagenz (5,5'-Dithiobi-[2-nitrobenzoësäure], DTNB), Sanger's Reagenz (2,4-Dinitro-1-fluorbenzen, DNFB) oder auch 1,1'-[Ethenyldienbis(sulfonyl)]bisbenzen (ESB) eingesetzt.

Sowohl *pre-* als auch *post-column derivatisation* sind etablierte Techniken für die HPLC- und z.T. auch für die CE-Analyse von Thiolspecies.

Derivatisierungen von Thiolen erfolgen vor der Trennsäule mit NEM [29-31], NPM [28], Dansyl-Cl [27], OPA [32, 34], mBBr [34, 35-37] sowie mit ESB [38] und DNFB [25, 26], während für die Nachsäulenreaktion auch OPA [33] oder das DNTB [39] Anwendung finden.

Besonders hohe Nachweisempfindlichkeiten für Thiole und Disulfide werden mit der elektrochemischen Detektion (ECD [40-42]) erzielt.

15.5.4.1 Ellman's-Reagenz

Thiole (Glutathion) können mit 5,5'-Dithiobi-[2-nitrobenzoësäure] (DTNB, NBSSNB) sowohl vor als auch nach der Trennsäule in stabile Disulfide umgewandelt werden.

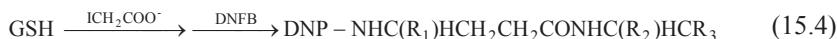


Das Thionitrobenzoat-Anion (NBS^-) absorbiert besonders intensiv im sichtbaren Bereich und hat bei 412 nm ein Absorptionsmaximum. Vor der Trennsäule hergestellte Thionitrobenzoat-Derivate von GSH, Cystein und γ -Glutamylcystein (γ -EC) können an Reversed-Phase-Materialien chromatographiert werden. Die Elution der Substanzen erfolgt mit einem Ameisensäure-Puffer ($\text{pH}=5$), der 10% Methanol enthält [39], oder durch einen Phosphatpuffer ($\text{pH}=3$) mit einem 15%igen MeOH-Anteil [43].

Die Derivatisierung der Thiole nach der Chromatographiesäule ist in der Thiolanalytik weit verbreitet und wird im Abschnitt 15.5.5.1 näher erläutert.

15.5.4.2 Sanger's Reagenz

Eine häufig verwendete Thiolderivatisierung vor der Säule ist das von Reed et al. entwickelte Verfahren [25]. Zuerst erfolgt die Bildung von S-Carboxymethyl-Derivaten aus den freien Thiolverbindungen und Iodessigsäure (ICH_2COOH bzw. IAA) und danach werden die Aminogruppen der Peptidmoleküle mit dem chromophoren Sanger's Reagenz (DNFB) zu den 2,4-Dinitrophenyl (DNP)-Derivaten umgesetzt.



Für ihre chromatographische Trennung dienen ein schwach basischer Anionenaustauscher (meist Aminphasen: Silicagele mit chemisch modifizierten Aminopropylgruppen, Abschnitt 4.3.2) und die Gradientenelution mit Methanol/Wasser und einem acetathaltigen Puffer. Die Detektion der DNP-Derivate von reduziertem und oxidiertem Glutathion erfolgt bei 355 nm.

15.5.4.3 Substituierte Maleinimide

Die Umsetzung der Thiolgruppe mit *N*-Ethylmaleinimid (NEM) ist gegenüber der Reaktion mit JAA effektiver und durch weniger Störreaktionen gekennzeichnet [29-31]. Insgesamt gehen *N*-substituierte Maleinimide relativ leicht nucleophile Additionsreaktionen mit Thiolen ein (Abbildung 15.32). Vorteilhaft für ihren empfindlichen Nachweis ist, wenn die Maleinimide wie im Falle des *N*-(1-Pyrenyl)maleinimides (NPM) mit chromophoren Gruppen bzw. fluoreszierenden Molekülen (Pyrenylrest) substituiert sind [28].

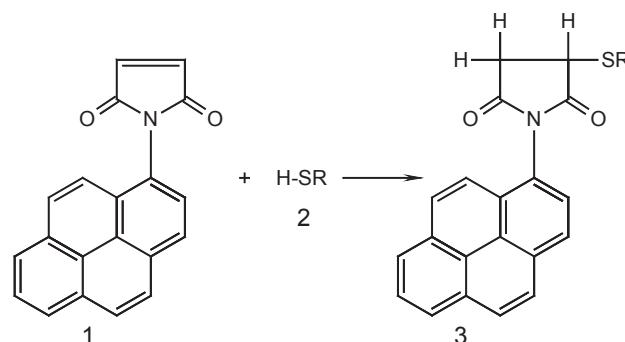


Abb. 15.32 Derivatisierung von Thiolen (2) mit *N*-Ethylmaleinimid, NPM (1), zu Thiol-NPM-Derivaten (3)

NPM-Derivate werden an Reversed-Phase-Säulen getrennt und mittels Fluoreszenzdetektion registriert. Die Elution der einzelnen Species erfolgt mit Acetonitril/Wasser-Gemischen, die geringe Mengen (0,1–0,2%) Essig- und Phosphorsäure enthalten.

Als weitere Derivatisierungsreagenzien für die HPLC-Analytik von Thiolen kamen auch *N*-(7-Dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)maleinimid und *N*-(9-acridinyl)maleinimid (NAM) zum Einsatz [44].

15.5.4.4 Monobrombiman

Die heterocyclischen Bimane (1,5-Diazabicyclo[3.3.0]octadiendione) gehen auf Arbeiten von Kosower et al. [45, 46] zurück.

Die Fluoreszenzausbeuten von Monobrombimanen (mBBr) selbst sind gering. Erst nach der Reaktion mit Thiolen entstehen stark fluoreszierende Verbindungen. Weniger stabil sind die Derivate, die durch die Umsetzung der Thiole mit Mono-bromtrimethylammoniumbiman (qBBr) erhalten werden.

Meist erfolgt die Elution mit einem Gradienten. Als mobile Phasen dienen Methanol und Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA), welches als Ionenpaarreagens (Abschnitt 4.3.4 „Ionenpaarchromatographie“) fungiert [36], saures Acetonitril mit Essig- und Perchlorsäure [37] oder Methanol mit Essigsäure [34, 35].

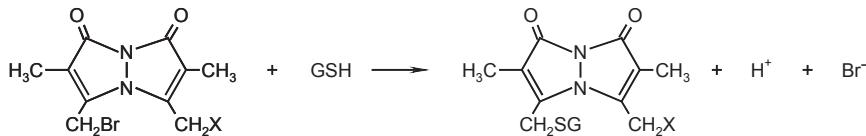


Abb. 15.33 Derivatisierung von GSH mit mBBr

15.5.4.5 o-Phthalaldehyd

Das Reagenz *o*-Phthalaldehyd reagiert mit primären Aminogruppen in Anwesenheit von Thiolen (2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol) zu intensiv fluoreszierenden Isoindolen. Diese Reaktion wird insbesondere in der Aminosäureanalytik als Vor- und Nachsäulendetektion angewandt. Sowohl die Thiol- als auch die Aminogruppe sind für diese Umsetzung erforderlich und daran beteiligt.

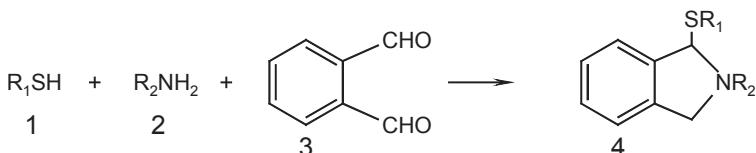


Abb. 15.34 OPA (3)-Derivatisierung in Anwesenheit eines Thiols (1) und einer Aminosäure (2) zum fluoreszierenden Isoindol (4)

Die Reaktion von *o*-Phthalaldehyd mit einer primären Aminogruppe und mit einem Thiol ergibt die Isoindole, die um 450 nm sehr intensiv fluoreszieren [32, 33]. Diese Verbindungen können an Reversed-Phase-Materialien mit Hilfe der Gradientenelution und Acetonitril/Wasser-Gemischen chromatographiert werden [32, 34]. Die OPA-Derivate sind nur kurze Zeit stabil und müssen unmittelbar nach ihrer Herstellung auf die Säule appliziert und chromatographiert werden.

Underivatisiert können Thiole bzw. Aminosäuren an stark basischen Anionenaustauschern getrennt werden. Zur Elution dienen Citratpuffer und die Gradiententechnik. Erst nach der Trennsäule erfolgt das Zumischen von *o*-Phthalaldehyd (meist mit Mercaptoethanol) zur Bildung der fluoreszierenden Isoindole [33].

Für die Derivatisierung von reduziertem Glutathion mit OPA ist kein weiteres nucleophiles Zusatzreagenz (2-Mercaptoethanol) erforderlich, da die Thiol- und primäre Aminogruppe im GSH-Molekül bereits vorhanden sind. Das Glutathion wird isokratisch an einer RP-Phase innerhalb weniger Minuten getrennt und nach der Säule mit OPA zu einem intensiv fluoreszierenden GSH-OPA-Addukt [47] umgesetzt. Die Elution erfolgt mit einem sauren Phosphatpuffer bestehend aus Acetonitril und einem langkettigen Dodecylsulphatsalz, das mit dem GSH auf der Säule Ionenpaare ausbildet.

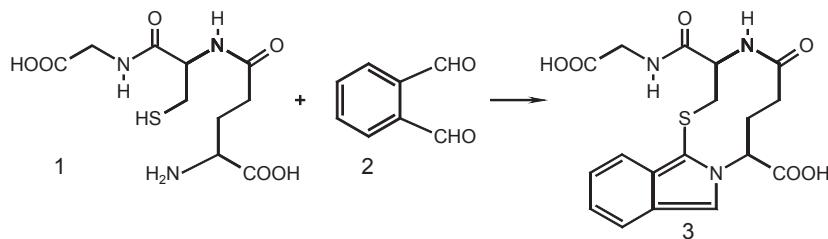


Abb. 15.35 Bildung eines GSH-OPA-Adduktes (3) aus GSH (1) mit OPA (2)

15.5.4.6 Elektrochemische Detektion

Elektrochemische Detektoren enthalten Elektroden, an denen Reduktions- bzw. Oxidationsreaktionen leicht ablaufen können. Die elektrochemische Detektion (ECD) von Thiolen und Disulfiden in biologischen Matrices [40-42] ist eine sehr empfindliche, aber auch gegenüber Probekontaminationen relativ störanfällige analytische Methode.

Im Falle des Glutathions liegt ein Thiolpeptid in reduzierter Form vor, während das korrespondierende Disulfid (GSSG) oxidiert ist. Thiole (GSH) können an Graphit- oder Glaskohlenelektroden (15.5) oder an Quecksilberelektroden (katalytisch) oxidiert werden (15.6), während die Reduktion der Disulfide mit Sulfit (Sulfitolysse) im alkalischen Medium (15.7) oder die Elektroreduktion (15.8) zu den entsprechenden Thiolanionen (RS^-) führen.





Die simultane Bestimmung beider Peptide (GSH, GSSG) erfolgt mit dem *dualen elektrochemischen Detektor* (DED) bestehend aus zwei in Serie geschalteten Au/Hg-Elektroden und den entsprechenden Referenzelektroden (Ag/AgCl). Nach der HPLC-Trennung passiert das Eluat zuerst die *upstream*-Elektrode, die gegenüber der Ag/AgCl-Elektrode ein Potential von -1,0 V besitzt und zur Reduktion der Disulfide in die entsprechenden Thiole dient. Beide Peptide werden als „Thiole“ an der zweiten *downstream*-Elektrode, die gegenüber ihrer Ag/AgCl-Elektrode auf +1,5 V eingestellt ist, katalytisch oxidiert (s.o.).

Eine weitere elektrochemische Bestimmung [41] basiert darauf, dass die SH-Gruppen mit den in einem ammoniakalischen Medium gelösten Silberionen stabile und undissozierbare Mercaptide (RSAg) bilden.



Die Reduktion der Disulfide erfolgt auch hier entweder durch Sulfitolyse (15.7) bzw. mittels Elektrodenreduktion (15.8).

15.5.5 HPLC von Thiolen und Disulfiden

Unabhängig von der gewählten Detektionsvariante kommen für Thiole und Disulfide meist Reversed-Phase-Materialien für die chromatographische Trennung zum Einsatz. Auch die Ionenpaarchromatographie (IPC) sowie Kationen- und Anionenaustauscher sind für selektive Trennungen von Thiolspecies geeignet. Mit der kovalenten Chromatographie ist eine besonders selektive Trennmethode verfügbar, da an dieser Trennphase nur Thiolpeptide und -proteine retardiert werden.

15.5.5.1 Kovalente Chromatographie

Die Grundlagen der kovalenten Chromatographie [48, 49] wurden bereits im Abschnitt 5.3.8 detailliert aufgezeigt. Die Bromcyanaktivierung des Trägermaterials (Sepharose), die Kopplung von Glutathion und die Reaktion mit 2,2'-Dipyridyldisulfid zur Herstellung der aktivierten Thiol-Sepharose, an die thiolhaltige Peptide und Proteine selektiv gebunden werden können, sind die entscheidenden Reaktionsschritte dieser Trenntechnik.

Für die experimentelle Durchführung kovalenter chromatographischer Trennungen von Thiolspecies dient die Anordnung in Abbildung 15.36. Der Puffer A (0,1 M Tris-HCl, pH-Wert = 7,7 + 0,1 M NaCl) wird von der Elutionsmittelpumpe ($F = 1,0 \text{ ml/min}$) zum T-Stück gefördert. Innerhalb der Trennsäule (125 · 4 mm i.D., PEEK-Material), die ca. 500 mg aktivierte Thiolsepharose 4B ($d_p = 45\text{--}165 \mu\text{m}$) enthält, „entscheidet“ sich, ob die Kapazität der stationären Phase für die kovalente Bindung von Glutathion ausreichend ist.

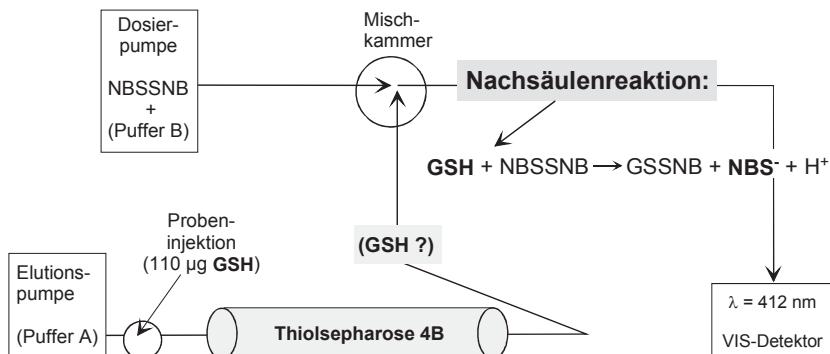


Abb. 15.36 Aufbau einer HPLC-Apparatur mit Nachsäulen detektion

Der Puffer B (12 mg Ellman's-Reagenz [5,5'-Dithio-bis[2-Nitrobenzoësäure] in 50 mM KH₂PO₄, pH=8,0) wird bei einer geringeren Flussrate (0,2 ml/min) mit Hilfe einer Dosierpumpe zum T-Stück gefördert.

Ist die Kapazität der Thiolsepharose erschöpft, findet eine Vermischung und Reaktion von SH-gruppenhaltigen Thiolen wie Glutathion mit dem Ellman's-Reagenz statt. Die gebildeten Komplexe (NBS⁻: Thionitrobenzoat-Anion) können danach im sichtbaren Bereich bei 412 nm sehr empfindlich (ppm-Bereich) registriert werden (Abbildung 15.39 und 15.40). Solange jedoch die applizierten thiolhaltigen Verbindungen kovalent auf dieser Säule gebunden bleiben, werden keine Absorptionen im sichtbaren Bereich detektiert.

Diese besondere Eigenschaft der Thiole, einerseits eine SH-gruppenspezifische Bindung mit der aktivierten Thiol-Sepharose einzugehen und andererseits sensitiv registrierbare Komplexe über ihre SH-Gruppen mit Ellman's-Reagenz auszubilden, wurde innerhalb der folgenden Experimente genutzt.

Auf die Trennsäule erfolgte das Applizieren von 110 µg Glutathion (je 20 µl 5,5 mg GSH/ml) pro Chromatographie-Lauf (Abbildung 15.36). Die resultierende „Durchbruchskurve“ (Abbildung 15.37) zeigt das Ergebnis dieser kovalenten Chromatographie. Nach dem ca. 700–800 µg GSH appliziert worden sind, erfolgt ein Anstieg der Extinktion. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass nicht mehr die Gesamtmenge des Glutathions kovalent gebunden werden kann. Ab 1200 µg GSH werden keine signifikanten Vergrößerungen des Detektorsignals registriert und es tritt eine gewisse „Sättigung“ der Thiolsepharose-Säule mit GSH ein.

Auch höher molekulare Metallothioneine zeigen ein vergleichbares Bindungsverhalten, weshalb die kovalente Chromatographie für präparative Reinigungen von SH-Gruppen-haltigen Substanzen aus biologischen Materialien besonders geeignet ist. Durch anschließende Elution der Chromatographiesäule mit einem niedermolekularen Thiol wie Dithiotreitol (RSH) erfolgt die Ablösung der kovalent gebundenen thiolhaltigen Proteine von der stationären Phase, die in den Ausgangszustand der Glutathion-Sepharose-Matrix zurück überführt wird (vgl. Abbildung 5.38 in Abschnitt 5.3.8).

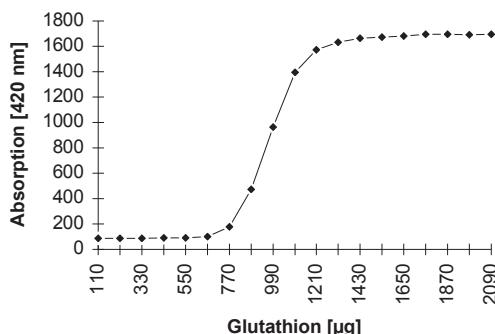


Abb. 15.37 Bindung von Glutathion an die aktivierte Thiol-Sepharose 4B

Das Ablösen unterschiedlich stark gebundener thiolhaltiger Proteine kann dabei durch Änderung der Konzentration oder der Art des Thiols erfolgen. Nach erneutem Aktivieren mit 2,2'-Dipyridyldisulfid ist das chromatographische Trägermaterial für eine weitere kovalente Trennung einsetzbar (s. Schema der *Sequentiellen Elution* in Abbildung 5.39).

Zur Registrierung des Desorptionsprozesses bzw. zur qualitativen und quantitativen Analyse der Metallothioneine muss eine andere Detektionsvariante verwendet werden, da die niedermolekularen Thiole im Eluenten mit Ellman's Reagenz selbst reagieren und alle anderen Chromatogramm-Peaks überdecken. Dies kann durch Nachsäulendetektion mit Reagentien wie Orthophthalaldehyd (OPA) und einem sehr empfindlichen Fluoreszenzdetektor realisiert werden.

Für eine schnelle und effiziente analytische Bestimmung von Glutathion, seiner Metabolite und anderer Thiolspecies ist jedoch die Reversed-Phase-Chromatografie auf Grund ihrer hohen Trennleistung meist die Methode der Wahl.

15.5.5.2 „Säure“ Reversed-Phase-HPLC

Zur chromatographischen Trennung der Thiolspecies Cystein, Cys-Gly, GSH und γ -EC (γ -Glutamyl-Cystein) dienen Reversed-Phase-Säulen, die mit sauren Eluenten wie Trifluoressigsäure (TFA) chromatographiert werden, weshalb hier die Bezeichnung „Säure“ RP-HPLC gewählt wird (Abbildung 4.15, Abschnitt 4.2.2.2). Je höher der TFA-Anteil, d.h., je niedriger der pH-Wert, desto größer ist die chromatographische Auflösung zwischen dem relativ schwer zu trennenden Peakpaar GSH und γ -EC (Abbildung 15.38). Es muss beachtet werden, dass bei pH-Werten < 2 die Hydrolyse des Silicagels innerhalb der Trennsäule beginnt, wodurch meist die stationäre Phase für weiterführende Trennungen unbrauchbar wird.

Ein TFA-Gehalt von 0,2% stellt einen optimalen Kompromiss zwischen ausreichender Auflösung ($R > 1,5$) dieses Peakpaars und der Langzeitstabilität (> 9 Monate) der Säule dar.

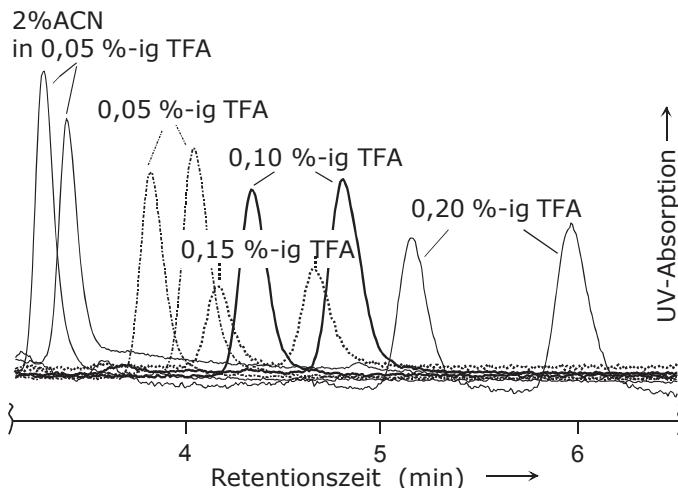


Abb. 15.38 Abhängigkeit der chromatographischen Auflösung vom TFA- und ACN-Gehalt des Eluenten (1. Peak: GSH, 2. Peak: γ -EC).

Die Chromatogramme zeigen sehr deutlich, dass kleinere TFA-Gehalte (0,1 ... 0,05%) und bereits geringe Anteile an organischen Lösungsmitteln (z.B. 2% ACN) zur deutlichen Verminderung der Peakauflösungen führen. Für die Erstellung dieser Chromatogramme mit reinen Modellsubstanzen war eine „einfache“ Detektion im nahen UV-Bereich bei 210 nm ausreichend, da die chromatographische Auflösung einer Säule in der Regel von ihrer Trennqualität und nicht von der gewählten Detektionsart abhängen.

Für die Analyse von SH-Gruppen-haltigen Substanzen, vor allem in biologischen Matrices, ist dagegen die Variante der Nachsäulendetektion mit DTNB vorzuziehen. Die RP-Säule erwies sich für die HPLC-Analyse der vier Thiolspezies als besonders selektiv, wie aus Abbildung 15.39 ersichtlich ist.

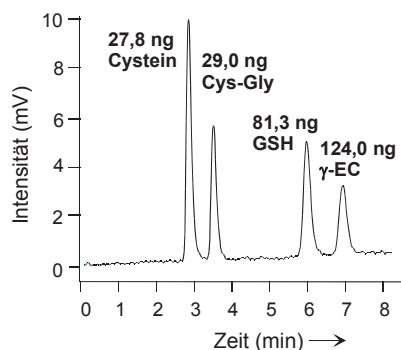


Abb. 15.39 RP-Trennung I der Thiole

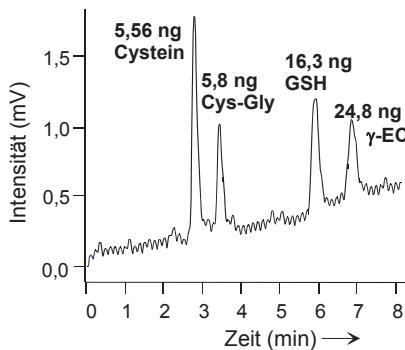


Abb. 15.40 RP-Trennung II , Thiole

Absolutmengen im Bereich von 50–100 ng werden mit Basislinientrennung chromatographiert. Bei einer 5-fach geringeren Konzentration ist eine Verstärkung des Grundlinienrauschens zu verzeichnen (Abbildung 15.40), ohne dass eine signifikante Verminderung der chromatographischen Auflösung eintritt.

Wenn die Probeschleife von 20 auf 100 µl vergrößert wird, sind Absolutmengen der Thiolspecies von ca. 0,2 bis 1,0 ng noch nachweisbar.

Durch weitere Variationen der Versuchsbedingungen (z.B. Optimierung der Konzentration vom Ellman's Reagenz, Einsatz kurzer HPLC-Säulen von 3 cm Länge mit Partikelgrößen um 2 oder 3 µm) können noch geringere Mengen an Glutathion und anderen Thiolspecies bestimmt werden.

15.5.5.3 Electrospray-MS von Glutathion und Metaboliten

Innerhalb weiterer Experimente mittels saurer RP-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass aus Glutathion (Abbildung 15.41) bereits nach einigen Tagen Cys-Gly in dieser Lösung gebildet wird (Abbildung 15.42). Als noch fehlende Komponente wurde die Glutaminsäure erwartet, die jedoch auf Grund der SH-spezifischen Detektion mit dem Ellman's Reagenz im HPLC-Chromatogramm nicht angezeigt wird.

Daraufhin wurde die Glutathionlösung zur Identifizierung noch fehlender Substanz(en) mittels Electrospray-Massenspektrometrie analysiert. Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgt mit einem VG-BIO-Q-Massenspektrometer (*Fisons Instruments*) bestehend aus einer Elektrospray-Ionenquelle und einem Triple-Quadrupolmassen-Analysator mit einem Massenbereich von 4 000.

Ein Volumen von 5 µl GSH-Lösung wird über eine Probeschleife (Rheodyne-Ventil) mit einem Lösungsmittelgemisch (ACN/Wasser 1 : 1 V/V + 1% Ameisensäure) bei einer Flussrate von 4 µl/min (Pumpe: HP 1050) in das Electrospray appliziert. Die Aufnahme des Massenspektrums erfolgt im Bereich von 500 bis 1 300 m/z innerhalb von 10 s, wobei Myoglobin (Pferdeherz) zur Kalibrierung dient.

Die Quasimolekülien $[M+H]^+$ bei 179,1 und 308,2 sind die charakteristischen Signale für die bereits bekannten Verbindungen Cys-Gly bzw. Glutathion.

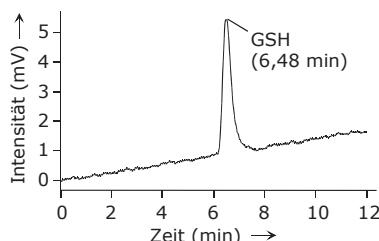


Abb. 15.41 Glutathion-Stammlösung

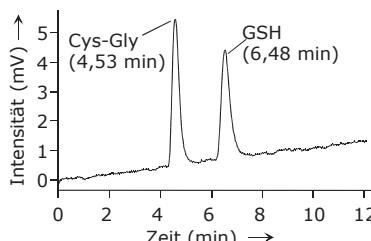


Abb. 15.42 GSH-Stammlösung nach 10 Tagen

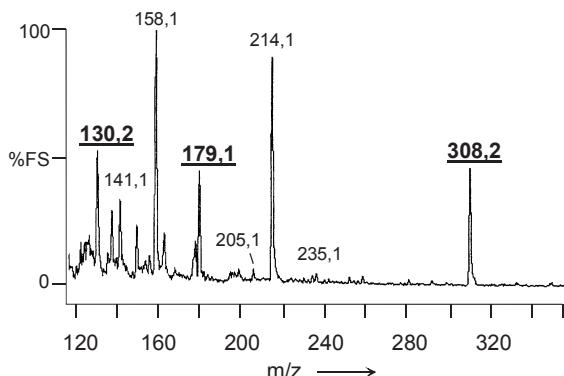


Abb. 15.43 Massenspektrum von einer Glutathionlösung

Das Signal bei 130,2 ist nicht der Glutaminsäure zuzuordnen, die ursprünglich in der zersetzen GSH-Lösung erwartet wurde, sondern identifiziert die relativ seltene Aminosäure *Pyroglutaminsäure*, die durch Cyclisierung entsteht.

15.5.5.4 Analyse biologischer Matrices

Die Bedeutung und die entwickelten Methoden zur simultanen Bestimmung von Thiolen und Disulfiden wurden bereits ausführlich herausgestellt. Neben den verschiedenen Derivatisierungsmöglichkeiten bietet die HPLC-DED-Technik (s. Abschnitt 15.5.4.6) ein geeignetes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von GSH und GSSG in natürlichen Matrices. Die HPLC-Trennungen (Abbildung 50.44, [50]) belegen die Leistungsfähigkeit. Als Standardsubstanzen wurden Cystein, GSH und GSSG mit guter Auflösung chromatographiert. Die minimal detektierbare Menge für die Thiolspecies liegt bei etwa 0,5 pmol.

Die Trennung erfolgt isokratisch an einer RP-Säule (Intersil ODS 2, 250 · 4,6 mm i.D.). Die mobile Phase besteht aus 93,25% (V/V) 0,1 M Monochloressigsäure, 5% Methanol, 1,75% DMF und 2,25 mM Heptansulfonsäure (pH-Wert: 2,8).

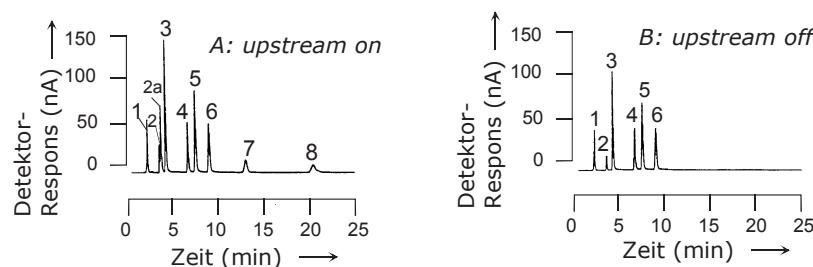


Abb. 50.44 HPLC-DED- von Thiolen und Disulfiden

1: Metaphosphorsäure, 2: Ergothionein, 2a : Cystin, 3: Cystein, 4: GSH, 5: Homocystein, 6: Cys-Gly, 7: GSSG, 8: Homocystein, HPLC: J. P. Richie Jr. [50].

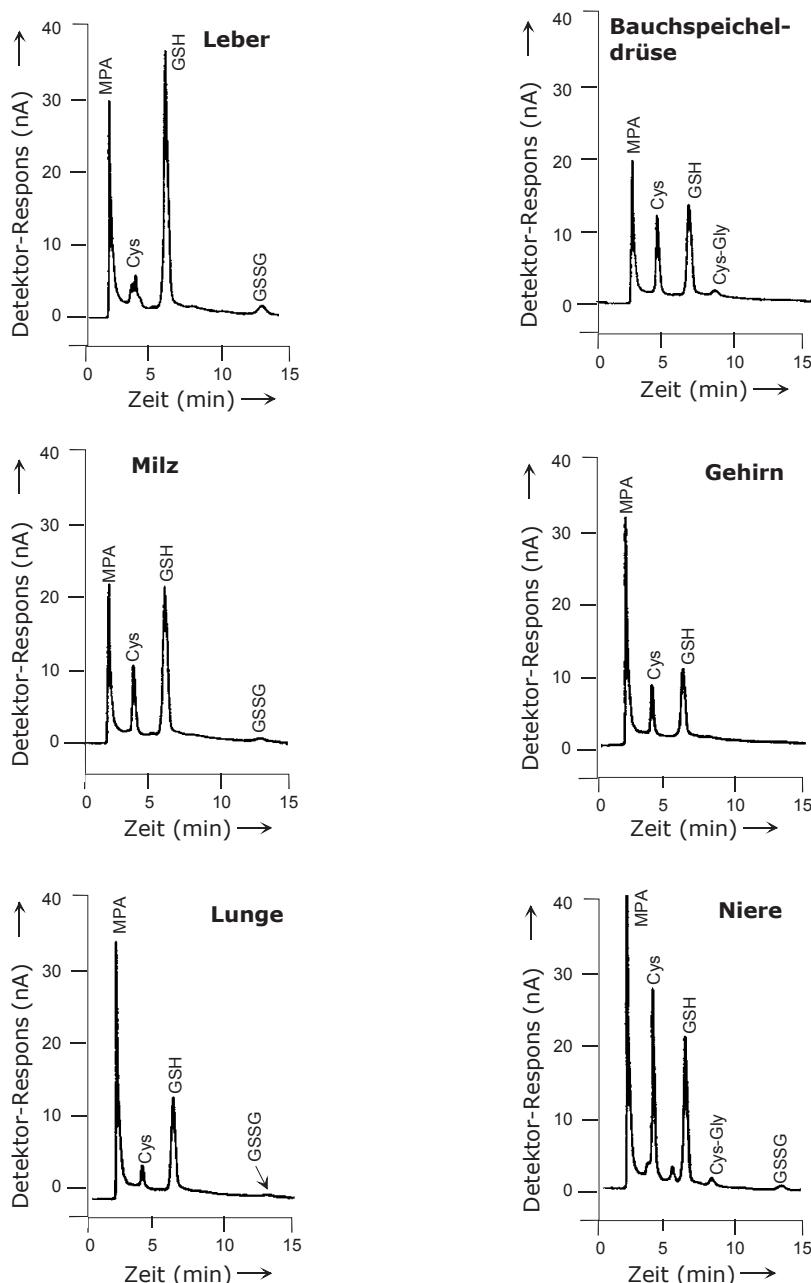


Abb. 15.45 Chromatogramme von Thiolspecies aus Rattenorganen

Analysenbedingungen wie in Abbildung 15.44. Beide Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von J. P. Richie Jr. [50].

Aus dem Vergleich der beiden Chromatogramme in Abbildungen 15.44 A und B geht hervor, dass während der Dualdetektion (DED) mit beiden Elektroden auch die Disulfide, die zuvor an der *upstream*-Elektrode in die korrespondierenden Thiole konvertiert wurden, angezeigt werden. Erst wenn diese Elektrode nicht in Betrieb ist (B: *upstream off*), wird das GSSG nicht registriert.

Die HPLC-DED-Methode wurde auch erfolgreich für die Thiol- und Disulfid-Analyse von Extrakten aus verschiedenen Tierorganen eingesetzt. Als Untersuchungsobjekte dienten 8 Monate alte Ratten, aus denen Magen, Leber, Bauchspeicheldrüse, Milz, Hoden, Gehirn, Lunge und Niere entnommen, aufgearbeitet und analysiert wurden.

Die Chromatogramme im Abbildung 15.45 veranschaulichen die unterschiedlichen Thiolprofile zwischen den einzelnen Organen. GSH ist in allen Proben vorhanden und stellt den überwiegenden Anteil der Thiolverbindungen (60–90%) dar. Der GSH-Level variiert von 1,8 µmol/g Gewebe im Gehirn bis 6,6 µmol/g in der Leber. Im Gegensatz dazu war das GSSG in einigen Organen (insbesondere Leber, Niere) nur sehr gering vorhanden bzw. nicht detektierbar.

Cystein ist auch Bestandteil aller Organe, vor allem in der Niere sowie in der Bauchspeicheldrüse und Milz. Vom Glutathion-Abkömmling Cys-Gly enthalten Bauchspeicheldrüse und Niere nur sehr kleine Mengen.

15.5.6 Kapillarelektrophorese von Thiolen und Disulfiden

Die Kapillarelektrophorese wird oft als ergänzende Methode zur HPLC eingesetzt. Dies betrifft auch die Analytik von reduziertem und oxidiertem Glutathion. Aus der Literatur sind verschiedene methodische Varianten bekannt [51–53]. An einer mit hydrophilen Gruppen modifizierten CE- Kapillare und mit einem 35 mM Natriumphosphat-Puffer ($\text{pH}=2,1$) erfolgt die CE-Trennung von GSSG und GSH in nur wenigen Minuten, wie in Abbildung 15.46 (A) dargestellt ist [51].

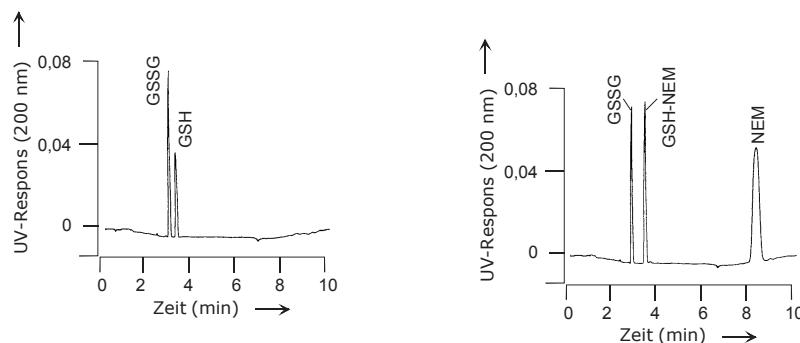


Abb. 15.46 CE-Trennung von underivatisierten GSH und GSSG (A). CE von GSSG und mit NEM (Überschuss) modifiziertem GSH-NEM-Addukt (B). CE-Bedingungen im Text. Mit freundlicher Genehmigung von V. Stocchi [51].

Die Detektion wird im nahen UV-Bereich bei 200 nm durchgeführt. Durch Derivatisierung der Sulfhydrylgruppe von Glutathion mit *N*-Ethylmaleinimid (Abschnitt 15.5.4.3) entsteht ein GSH-NEM-Addukt, das gegenüber möglicher Oxidationsreaktionen „blockiert“ ist. Dieses Addukt zeigt eine stärkere Absorption und besitzt gegenüber dem GSSG eine größere Auflösung (Abbildung 15.46 B). Das überschüssige NEM erscheint weit nach den Thiolspecies im Elektropherogramm und trägt nur wenig zur Vergrößerung der Analysenzeit bei.

Einige Applikationsbeispiele dieser CE-Methode sind in Abbildung 15.47 zusammengefasst. Als biologische Proben werden rote Blutzellen vom Menschen analysiert [51], die unterschiedlich lange Zeiten einer Lösung bestehend aus 0,1 mM Fe^{2+} -Ionen und 10 mM Ascorbinsäure ausgesetzt waren.

Während in den unbehandelten Kontrollzellen nur das GSH-NEM (Abbildung 15.47 A) registriert wird, sind in den Versuchszellen in Abhängigkeit von der Zeit (Abbildung 15.47 B und C: nach 30 bzw. 60 Minuten) signifikante Anstiege des GSSG-Levels und abfallende Peakgrößen von GSH-NEM zu verzeichnen.

Ursache der Verschiebungen des Verhältnisses zwischen der reduzierten Form (GSH) und dem oxidierten GSSG ist das Fe^{2+} /Ascorbinsäure-System, das durch die Produktion von freien Radikalen den Oxidationsprozess auslöst.

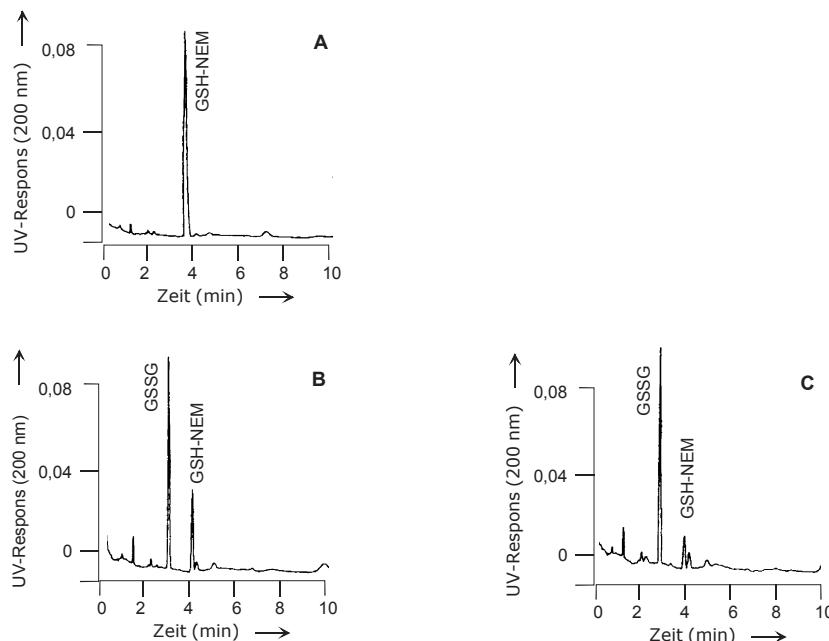


Abb. 15.47 CE-Analytik von GSH-NEM und GSSG in unbehandelten roten Blutzellen (A), in Blutzellen nach 30-minütigem (B) und 60-minütigem (C) Einwirken des Fe^{2+} /Ascorbinsäure-Systems zur Generierung von Radikalen, Kapillarelektrophoretische Bedingungen siehe Text. Mit freundlicher Genehmigung von V. Stocchi [51].

15.5.7 Kapillarelektrophorese von Phytochelatinen

Die Analyse von Metallothioneinen in biologischen Matrices erfordert meist eine Reihe präanalytischer Methoden wie Lyophilisation, Dialyse, Ammoniumsulfatfällung, Ultrafiltration sowie Derivatisierungs- und Trennoperationen.

Die Kapillarelektrophorese wird neben der Analyse von Thiolen zunehmend für die Trennung der Isoformen von Metallothioneinen [54-56] und der Thiolpeptide von Phytochelatinen eingesetzt, da aufwendige Vorreinigungs- und Konzentrationschritte oft nicht erforderlich sind.

Die Leistungsfähigkeit der CE-Analyse von Phytochelatinen soll an Hand des folgenden Beispiels vorgestellt werden [57]. Zuerst erfolgt die Herstellung entsprechender Standardsubstanzen von Phytochelatinen als Basis für die Optimierung der elektrophoretischen Trennung. Die PC's stammen aus einem Rohextrakt der Zellen von Mikroalgen (*Phaeodactylum tricornutum*), die zur Anregung der Produktion von Phytochelatinen 15 Tage lang einer Cadmiumkonzentration von 30 mg/l ausgesetzt waren. Die Reinigung des Extraktes erfolgte durch Größenausschlusschromatographie und prächromatographische Methoden. Zur mikropräparativen Isolierung der einzelnen Standard-Polypeptide diente die RP-HPLC. Die Identifizierung der homologen Peptide wurde an Hand der ermittelten Aminosäurezusammensetzung für die einzelnen Individuen gesichert.

Ein typisches Elektropherogramm einer Kapillarzonenelektrophorese (CZE) von 6 verschiedenen Phytochelatinen zeigt Abbildung 15.48. Unter stark sauren Migrationsbedingungen tragen die Peptide positive Ladungen und wandern innerhalb einer CE-Kapillare bei positivem Spannungspotential (+10 kV) von der Anode zur Kathode. Unter diesen CE-Bedingungen migrieren kleine positiv geladene Moleküle schneller als entsprechend größere Moleküle. Die Elutionsreihenfolge der Phytochelatine beginnt demzufolge mit $(\gamma\text{EC})_4\text{G}$ und endet mit $(\gamma\text{EC})_9\text{G}$.

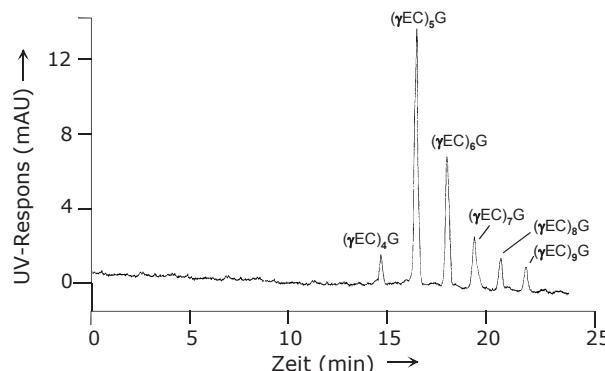


Abb. 15.48 CZE von 6 PC's aus Zellen von *Phaeodactylum tricornutum*, die 15 Tage lang 30 mg/l Cd ausgesetzt waren.

CE-Bedingungen: Fused-Silica-Kapillare 37(30) cm · 50 µm i.D., 100 mM Phosphorsäure, $\lambda = 214$ nm, $V = +10$ kV. Mit freundlicher Genehmigung von J. Abalde [57].

Während der Analyse von Rohextrakten der Mikroalgenzellen zeigt sich jedoch, dass bei derart niedrigem pH-Wert die meisten als „Verunreinigungen“ vorhandenen Proteine und Peptide mit neutraler oder positiver Ladung im Gegensatz zu den Phytochelatinen innerhalb der Kapillare ausfallen. Diese Bedingungen sind für weiterführende Untersuchungen von nicht vorgereinigten Proben ungeeignet.

Durch Einsatz einer Fused-Silica-Kapillare, die mit einem 150 mM Natriumphosphatpuffer bei pH=3,5 eluiert wird, ist das Trennproblem besser zu lösen. Unter diesen sauren Bedingungen besitzen die Phytochelatine ausreichend negative Ladungen, um entgegen des elektroosmotischen Flusses in Richtung Anode zu migrieren.

Die hohe Ionenstärke des Puffers dient dazu, den EOF zu reduzieren. Nachdem jetzt eine negative Spannung ($U=-12\text{ KV}$) angelegt ist, erfolgt der Wechsel beider Polseiten. Dadurch ist es möglich, dass negativ geladene Probespecies auf ihrem Weg zum neu „eingerichteten“ Anodenpol die Detektorzelle passieren und registriert werden können. Die Migrationsreihenfolge der Analyte kehrt sich dadurch um. Die am negativsten geladenen Phytochelatine erscheinen zuerst im Elektro-pherogramm (Abbildung 15.49).

Erfolgt eine Erhöhung des pH-Wertes im Migrationspuffer von 3,5 auf 5,0, so werden die negativen Ladungen der Phytochelatine vergrößert. Dadurch resultieren Verkürzungen der Analysenzeiten, aber auch deutliche Verschlechterungen der Peakauflösung.

Stärker saure pH-Werte um 3 führen dagegen zu langsameren Migrationen, längeren Analysenzeiten und verbreiterten Peakprofilen der Peptide.

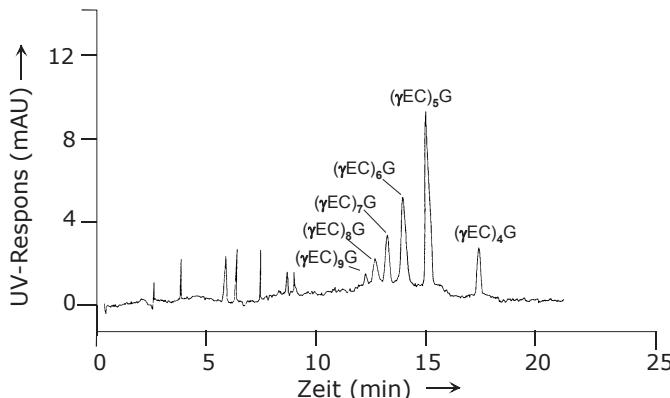


Abb. 15.49 CZE von 6 PC's aus Zellen von *Phaeodactylum tricornutum*, die 15 Tage lang 30 mg/l Cd ausgesetzt waren.

CE-Bedingungen: Fused-Silica-Kapillare 37 (30) cm · 50 μm i.D., 150 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 3,5), $\lambda = 214\text{ nm}$, $V = -12\text{ kV}$.

Mit freundlicher Genehmigung von J. Abalde [57].

Das Elektropherogramm eines ungereinigten Mikroalgenextraktes von *P. tricornutum* zeigt die Abbildung 15.50. Die vorhandenen Peaks sind Proteine und Peptide aus dem Rohextrakt. Unter den vorhandenen CE-Bedingungen interferieren diese (im Gegensatz zu den Bedingungen in Abbildung 15.48) nicht mit den Phytochelatinen, die entstehen, wenn die Zellen dem Schwermetall Cadmium ausgesetzt werden, wie aus Abbildung 15.51 hervorgeht.

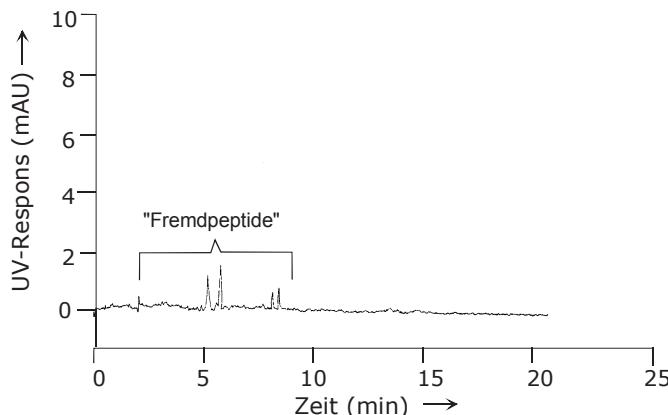


Abb. 15.50 CZE eines Rohextraktes von *Phaeodactylum tricornutum*, der nicht der Cd-Lösung ausgesetzt war.

CE-Bedingungen: wie in Abbildung 15.49. Mit freundlicher Genehmigung von J. Abalde [57].

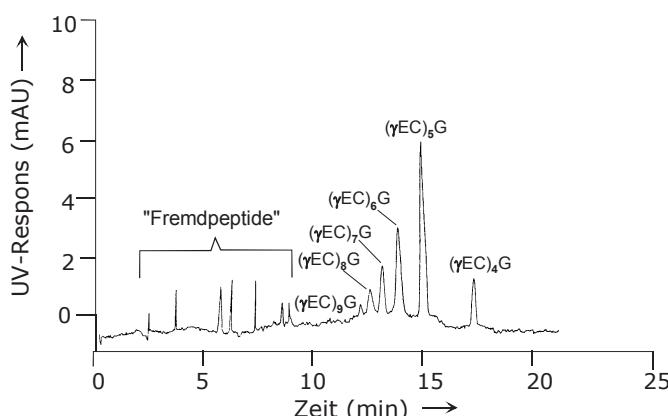


Abb. 15.51 CZE eines Rohextraktes von *Phaeodactylum tricornutum*, der einer Cd-Lösung ausgesetzt war.

CE-Bedingungen: wie in Abbildung 15.49. Mit freundlicher Genehmigung von J. Abalde [57].

15.6 Nucleobasen und Nucleoside in Zellen und Geweben

Wichtige Funktionen und Eigenschaften sowie strukturelle Merkmale der biologischen Substanzklassen Nucleinsäuren (DNA, RNA, s. Abbildung 2.34), Nucleotide (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, IMP), Nucleoside (z. B. Adenosin, Guanosin, s. a. Abbildung 2.32) und Nucleobasen (Purine, Pyrimidine, s. a. Abbildung 2.31) wurden bereits im Abschnitt 2.2 behandelt.

Die Analytik von Nucleotiden wird im Abschnitt 15.11 dargestellt, obwohl zu den hier aufgeführten HPLC-Methoden für Nucleobasen und Nucleoside [1-3] enge Bezüge bestehen.

Biomedizinische Forschungsprojekte und Aktivitäten sind auf Untersuchungen von Stoffwechselprozessen (Purin-Nucleotide), Zellreifungsprozessen und physiologischen Veränderungen während der Entstehung verschiedener Krankheiten und Syndrome beim Menschen gerichtet. Insbesondere Krankheiten wie Gicht [4], Sauerstoffmangel [5], Xanthinurie [4] oder Muskeldystrophie stehen mit den quan-titativen Veränderungen von Nucleinsäure-Bausteinen in menschlichen Zellen und Organen im engen Zusammenhang. Gicht z.B. gehört zu den sogenannten Zivilisationskrankheiten, die durch eine Störung des Purinstoffwechsels gekennzeichnet ist. Bei dieser Erkrankung kommt es zur Ablagerung von Salzen der Harnsäure in den einzelnen Organen bzw. Körperteilen (Gelenke). Die Muskeldystrophie ist durch einen Mangel an AMP-Desaminase gekennzeichnet und mit Veränderungen von Purin metabolisierenden Enzymen verbunden.

Für die analytische Bestimmung von niedermolekularen Nucleosiden und Nucleobasen in biologischen Matrices (Körperflüssigkeiten, rote Blutzellen, innere Organe wie z.B. die Leber) sowie von Nucleotidpolymeren werden vorrangig HPLC-Methoden eingesetzt [3].

Diese Biomoleküle verfügen über polare funktionelle Gruppen, so dass Ionen-austausch-Interaktionen für ihre flüssigchromatographische Trennung ausgenutzt werden können. Auch andere (hydrophobe) Strukturbereiche kennzeichnen diese Moleküle, weshalb insbesondere für die Reversed-Phase-Chromatographie umfangreiche Applikationsmöglichkeiten innerhalb der Nucleinsäureanalytik resultieren. Hinzu kommen die Ionenpaarchromatographie (s. Abschnitt 4.3.4) sowie Chromatographiearten mit speziellen, selektiven Wechselwirkungsmechanismen. Dazu gehört die Ligandenaustausch-HPLC (Kapitel 4.3.5). Als stationäre Phasen dienen neben Polymeren meist Silicagele, die mit chelatbildenden funktionellen Gruppen wie Iminodiessigsäure immobilisiert sind. Diese Phasen werden mit komplexbildenden Metallionen derivatisiert. Der Trennmechanismus in der Ligandenaustausch-Chromatographie beruht auf Wechselwirkungen der Probemoleküle (Nucleinsäure-Bausteine) mit der stationären Phase, die durch koordinative Bindungen innerhalb der Bindungssphäre des komplexbildenden Metallions entstehen. Als Metallion wird insbesondere Cu^{2+} eingesetzt, da es die größte Bindungskonstante zur immobilisierten Iminodiessigsäure besitzt.

Eine weitere an Silicagel gekoppelte, chelatisierende funktionelle Gruppe ist das 8-Hydroxyquinolin, das auch mit Kupferionen beladen ist, und die chromatographische Trennung von Nucleinsäure-Komponenten durch Ligandenaustausch-HPLC ermöglicht [6].

Hinzu kommen affinitätschromatographische Wechselwirkungen über die an Silicagel gebundenen Dihydroxyboryl-Gruppen und die Bildung von Einschlusskomplexen an Cyclodextrinphasen (s. a. Abschnitt 4.3.4).

Aus den umfangreichen chromatographischen Untersuchungen, die bereits in den 70-er und vor allem in den 80-er Jahren durchgeführt wurden, resultiert, dass für die Nucleobasen und Nucleoside die RP-Chromatographie besonders gut geeignet ist, während zur Trennung von phosphorylierten Nucleotiden die Ionen-austauschchromatographie die Methode der Wahl ist. Auch die Kapillarelektrophorese bietet auf Grund ihrer hohen Trenneffizienz und speziell präparierten Kapillaren, die z.B. mit Polyacrylamid gefüllt sind, sehr gute Einsatzmöglichkeiten für die Nucleotid-Analytik (s. a. Abschnitt 15.11).

Vor der chromatographischen oder kapillarelektrophoretischen Trennung von biologischen Proben ist meist eine Deproteinierung erforderlich. Diese erfolgt bei Zellsuspensionen, Geweben oder Organen, die Nucleinsäure-Bausteine enthalten, mit Hilfe von Perchlorsäure oder Kaliumhydroxid. Durch Zentrifugation und Neutralisationsreaktionen wird das biologische Material weiter aufgearbeitet, so dass die Nucleinsäure-Komponenten in einer „störungsfreien Trennoperation“ (mittels HPLC oder CE) quantifiziert werden können.

15.6.1 Reversed-Phase- und Ionenpaarchromatographie

Gegenüber der HPLC-Analytik von Nucleotiden ist die Ionenaustauschchromatographie (IEC) für die niedermolekularen Strukturausteine Nucleoside und Nucleobasen nur wenig erfolgreich anwendbar. Insbesondere der hohe Salzgehalt der Puffer-Eluenten ist eine Ursache für unzureichende IEC-Trennungen von Nucleosiden und Nucleobasen.

In den vergangenen Jahren haben sich insbesondere die effizientere Reversed-Phase-Chromatographie bzw. auch die Ionenpaarchromatographie für die Analyse dieser Substanzklassen etabliert. Die Vorteile der RP-Chromatographie liegen vor allem in der Langzeitstabilität und hohen Reproduzierbarkeit der Säulen, so dass auch gute Vergleichbarkeiten der Ergebnisse von RP-Säule zu RP-Säule bzw. von Labor zu Labor gewährleistet sind. Für die Elution der Nucleoside und Nucleobasen ist meist der isokratische Modus ausreichend. Nach dem Wechsel bzw. Austausch des Lösungsmittels (mobile Phase) wird eine schnelle Gleichgewichtseinstellung in der Trennsäule wieder erreicht.

Für die RP-HPLC dienen als stationäre Phasen mit ODS modifizierte Silicagel („C18-Trennphasen“) mit Partikelgrößen um 3 oder 5 µm. Für die Elution kommen mobile Phasen bestehend aus Phosphatpuffer (ca. 10 mM) mit kleineren Methanolanteilen (ca. 5–10%) und einem pH-Wert, der meist im schwach sauren Bereich liegt, zum Einsatz. Bei einer Flussrate um 1,5 ml/min betragen die Analysezeiten zwischen 10 und etwa 30 Minuten.

Ausgewählte HPLC-Chromatogramme für ein Modelgemisch (A) aus Nucleosiden und Nucleobasen sowie für eine Plasmaprobe (B) werden in Abbildung 15.52 demonstriert. Die Methodik kann auch auf andere biologische Matrices wie Skelettmuskulatur oder Erythrozyten angewandt werden.

Zur HPLC-Trennung von Purin-Species mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie dienen RP-Phasen. Die Elution erfolgt hier mit mobilen Phasen bestehend aus Ammoniumphosphat-Puffer (10 mM) in annähernd neutralen pH-Bereichen, 20% Methanol und Tetrabutylammoniumsalzen (0,5–10 mM).

Zur Ausbildung von Ionenpaaren werden neben dem am häufigsten verwendeten Tetrabutylammoniumphosphat auch andere Verbindungen wie Trifluoressigsäure eingesetzt.

Die Chromatogramme verdeutlichen auch die hohe Komplexität der Proben und die z.T. geringe – nicht ganz zufriedenstellende – chromatographische Auflösung der einzelnen Peaks.

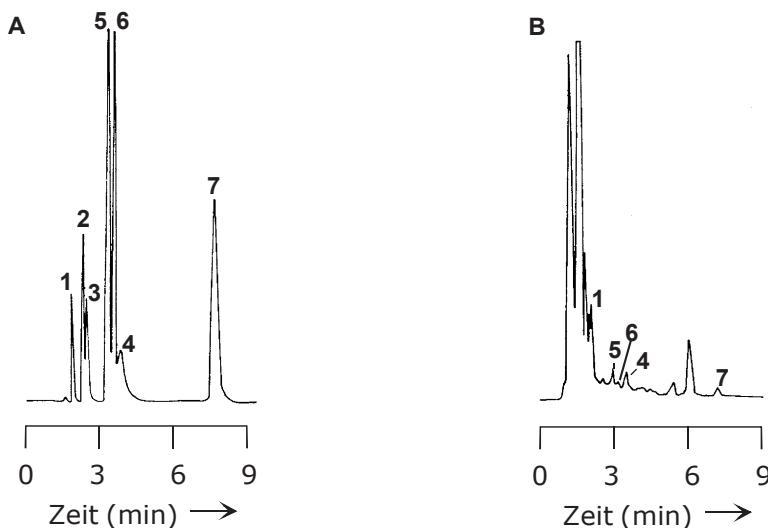


Abb. 15.52 Chromatogramme von Nucleosiden und Nucleobasen, Modellsubstanzen (A), Plasma (B)

1: Harnsäure, 2: Hypoxanthin, 3: Xanthin, 4: Adenin, 5: Inosin, 6: Guanosin, 7: Adenosin,

Säule: 100 · 8 mm i.D., stationäre Phase: RP, 5 µm (Nova Pak C₁₈-Kartusche), mobile Phase: 50 mM KH₂PO₄, + 7 % MeOH (pH = 4,1); Flussgradient: 0–6 min (1,5 ml/min), 6–7 min (1,5 auf 3,0 ml/min), 7–13 min (3,0 ml/min) ab 14. min (1,5 ml/min), Detektion: UV, 280 nm.

Mit freundlicher Genehmigung von T. Grune [2].

15.6.2 Kapillarelektrophorese

Die Abbildung 15.53 zeigt die CE-Trennung der Referenzsubstanzen Adenin, Adenosin, Guanin, Hypoxanthin, Guanosin, Xanthin, Inosin und Harnsäure nach Optimierung der Elutionsbedingungen (Pufferkonzentration, pH-Wert, Temperatur) innerhalb von ca. 8 Minuten. Die Registrierung des Elektropherogramms erfolgt bei 260 nm. Im nahen UV-Bereich um 200–210 nm können die Purinsubstanzen noch empfindlicher registriert werden. Die CE-Analysen in Abbildung 15.54 zeigen (vgl. auch die Absorptionseinheiten der Ordinaten), dass bei 210 nm (A) die Absorption der Purine intensiver als bei 260 nm (B) ist.

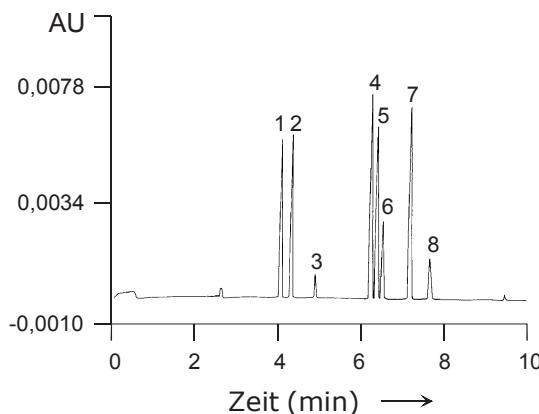


Abb. 15.53 Elektropherogramm von Nucleosiden und Nucleobasen.

1: Adenin, 2: Adenosin, 3: Guanin, 4: Hypoxanthin, 5: Guanosin, 6: Xanthin, 7: Inosin, 8: Harnsäure,

Kapillare: 44 cm · 75 μm i.D., Puffer: 20 mM Boratpuffer (pH = 9,4), Temperatur: 37°C, Detektion: UV, 260 nm.

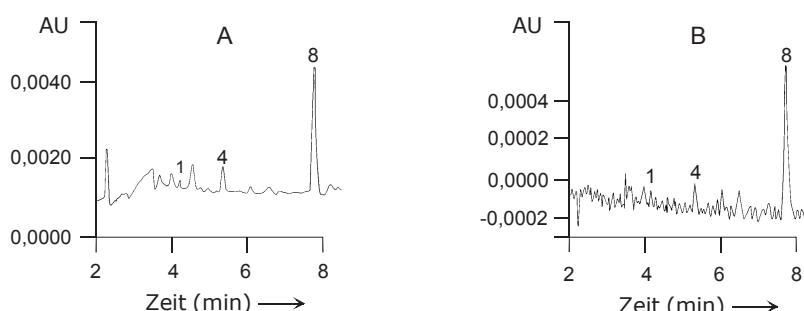


Abb. 15.54 Elektropherogramme von Nucleosiden und Nucleobasen, A und B: Plasmaextrakt vom Menschen, A bei 210 nm, B bei 260 nm.

Peakbezeichnung und weitere CE-Bedingungen wie in Abbildung 15.53. Mit freundlicher Genehmigung von T. Grune [2, 3].

15.7 Zucker in Hydrolysaten und Lebensmitteln

Der Name „Kohlenhydrate“ wurde ursprünglich von K. Schmidt im Jahre 1844 eingeführt und galt als Bezeichnung für die Hydrate des Kohlenstoffs. Der Name ist erhalten geblieben, obwohl die Kohlenhydrate (Zucker) heute als primäre Dehydrierungsprodukte mehrwertiger Alkohole definiert werden. Erfolgt die Dehydrierung einer primären Alkoholgruppe, so wird die entstandene Substanz als Aldehyd bezeichnet. Im Falle der Dehydrierung einer sekundären Alkoholgruppe entsteht ein Keton.

Als analytische Untersuchungsobjekte dienen in diesem Abschnitt kohlenhydrathaltige Abbauprodukte wie z.B. Stärkehydrolysate oder Fermentationsmedien mikrobieller Produktsynthesen. In Nahrungsmitteln sind diese Inhaltsstoffe relativ einfach analysierbar und können sehr anschaulich in Form von HPLC-Chromatogrammen präsentiert werden.

Sowohl Kohlenhydrate als auch organische Säuren gehören zu den Hauptbestandteilen dieser biologischen Matrices und werden auch mit vergleichbaren analytischen (insbesondere chromatographischen) Methoden analysiert, weshalb eine gesonderte Darstellung der Analytik dieser Substanzklasse in einem anderen Teilabschnitt (s. Kapitel 15.9.1) erfolgt.

Zur Analytik von Kohlenhydraten kommen meist HPLC-Methoden [1-21] zum Einsatz. Die Trennungen erfolgen an Silicagelen, die mit Aminogruppen funktionalisiert sind [1-7], mittels Ligandenaustausch- [8], Cyclodextrin- [9], Ionen- [10] oder RP-Chromatographie [11-13] und vor allem an polymeren Anionenaustauschern mittels HPAEC-PAD-Technik [14, 15] sowie mit Hilfe weiterer Chromatographie- und Detektionssysteme [16-21]. Auch die Kapillarelektrophorese [22-26] hat an Bedeutung gewonnen. Zur detaillierteren Strukturaufklärung von kompliziert aufgebauten Kohlenhydraten werden neben der NMR-Technik gegenwärtig verschiedene methodische Variationen der Massenspektrometrie (MALDI-MS, MALDI-PSD, LC-MS) mit großem Erfolg eingesetzt (s. Abschnitt 11.7).

15.7.1 Chromatographie an Aminophasen

Mit Alkylaminen chemisch modifizierte Silicagel-Trennphasen wurden zuerst von Linden und Lawhead [1] und Palmer [2] für die hochleistungsflüssigchromatographische Analyse von Kohlenhydraten angewandt. Die Modifizierung des Silicagels durch Reaktion seiner Silanolgruppen mit 3-Aminopropyltriethoxysilan geht auf Schwarzenbach [3] zurück.

Zur Elution der Kohlenhydrate dienen in der Regel ACN/Wasser-Gemische, die für die Trennung von mono- und dimeren Kohlenhydraten Wasseranteile zwischen 10 und 20% und im Falle der Oligosaccharide bis zu 50% Wasser enthalten. Die Detektion erfolgt mit einem Refraktometer (RI-Detektor) oder/und im nahen UV-Bereich (ca. 190–210 nm).

Mobile Phasen wie Aceton/Ethylacetat/Wasser, die auf Grund ihrer geringen Toxizität als Alternative zu Acetonitril eingesetzt werden, sind für die Chromatographie an Aminophasen nur wenig geeignet, da Ketone und Aldehyde mit den funktionellen Aminogruppen Schiff'sche Basen bilden, die die Lebensdauer der Trennsäule stark herabsetzen können. Dies wird durch eine zunehmende Gelb- und anschließende Braunfärbung des Silicagels angezeigt. Sogar die Zucker selbst werden an neu eingesetzten Aminophasen gebunden und können in Verbindung mit kontaminiertem Probematerial zum schnellen Säulenverschleiß beitragen.

Brons und Oliemann [18] haben diese Schiff'sche Basenbildung an verschiedenen Aminophasen (LiChrosorb NH₂, μ-Bondapak carbohydrate) untersucht und fanden heraus, dass die Verluste der Kohlenhydrate Galactose und Lactose nach ihrer chromatographischen Trennung mit dem Anstieg der Temperatur von 30 auf 40 °C zunehmen und dass erst nach mehrfacher Probeinjektion Recovery-Werte > 95% erreicht werden.

Bevorzugte Einsatzgebiete der chemisch modifizierten Aminophasen für quantitative Bestimmungen von Kohlenhydraten sind Nahrungs- und Genussmittel. Die darin enthaltenen Hauptkomponenten Fructose, Glucose und Saccharose können in kurzer Zeit bestimmt werden, wie aus dem folgenden Chromatogramm einer analysierten *Sauerkirschkonfitüre* hervorgeht (Abbildung 15.55). Weitere Ergebnisse für andere Lebens- und Genussmittel sind in der Tabelle 15.1 aufgeführt.

Problematisch ist die chromatographische Trennung der in den meisten biologischen Matrices enthaltenen Hexosen Mannose, Glucose und Galactose an chemisch modifizierten Aminophasen.

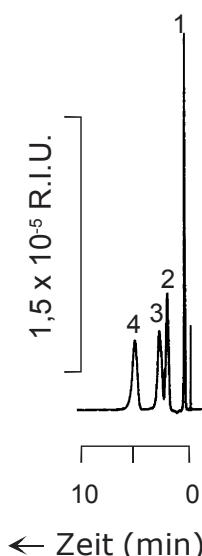
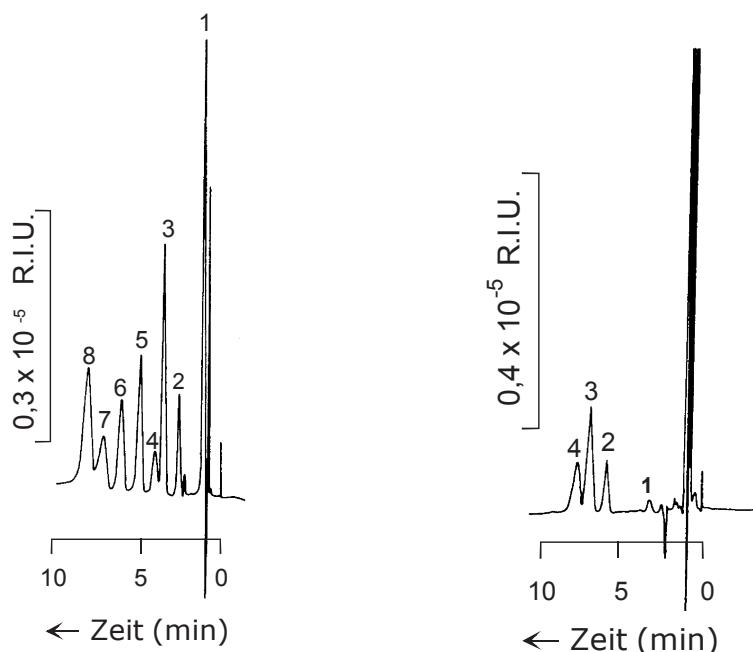


Abb. 15.55 Chromatogramm einer Sauerkirschkonfitüre.

1: Lösungsmittelpeak, 2: Fructose,
3: Glucose, 4: Saccharose,
Glassäule: 100 · 3,8 mm i.D.,
stationäre Phase: Silasorb NH₂, 7,5 μm,
mobile Phase: ACN/Wasser 80 : 20 V/V,
Flussrate: 2,0 ml/min,
Vordruck: 5,6 MPa,
Detektion: RI,
Injektionsvolumen: 20 μl.

Tabelle 15.1 Gehalt an Kohlenhydraten in Lebens- und Genußmitteln

Produkt [%]	Fructose [%]	Glucose [%]	Saccharose [%]	Kohlenhydrat- Summe [%]
Sauerkirschkonfitüre	19,2	20,7	21,7	61,6
Kirschessig, süß	17,8	18,4	27,0	63,2
Kindertee	-	4,1	-	4,1
Früchteteegetränk	1,7	21,2	60,6	83,5
Fenchelsirup	2,8	2,2	47,1	51,1
Likör „Holunder“	1,6	1,7	25,2	28,5
Wermuthgetränk	-	-	12,2	12,2

**Abb. 15.56** Chromatogramm von Modellsubstanzen

1: Lösungsmittelpeak, 2: Rhamnose,
3: Xylose, 4: Arabinose, 5: Fructose,
6: Mannose, 7: Glucose, 8: Galactose,
Glassäule: $150 \cdot 3,8$ mm i.D.,
stationäre Phase: Silasorb 600, 5 µm,
mobile Phase: ACN/Wasser 90 : 10 V/V +
0,01% Piperazin,
Flussrate: 0,5 ml/min,
Vordruck: 6 MPa,
Detektion: RI,
Injektionsvolumen: 20 µl.

Abb. 15.57 Chromatogramm einer Neutralzuckerfraktion aus Schleim nach saurer Hydrolyse

1: Fucose, 2: Mannose, 3: Glu-
cose, 4: Galactose,
HPLC-Bedingungen wie in 15.56.

Die Selektivität der Trennung von monomeren Kohlenhydraten basiert darauf, dass die Wechselwirkungen der Silanolgruppen des Silicagel-Gerüstes mit einer Iminogruppe des Piperazins stärker als die Affinität der OH-Gruppe der Kohlenhydrate zur Iminogruppe ist. Diese Trennsysteme sind analytisch relativ schwer handhabbar. Sie ermöglichen jedoch eine weitgehende chromatographische Auflösung der wichtigen Hexosen (Abbildung 15.56) und können für die Analyse biologischer Matrices (Abbildung 15.57) mit Erfolg eingesetzt werden [7].

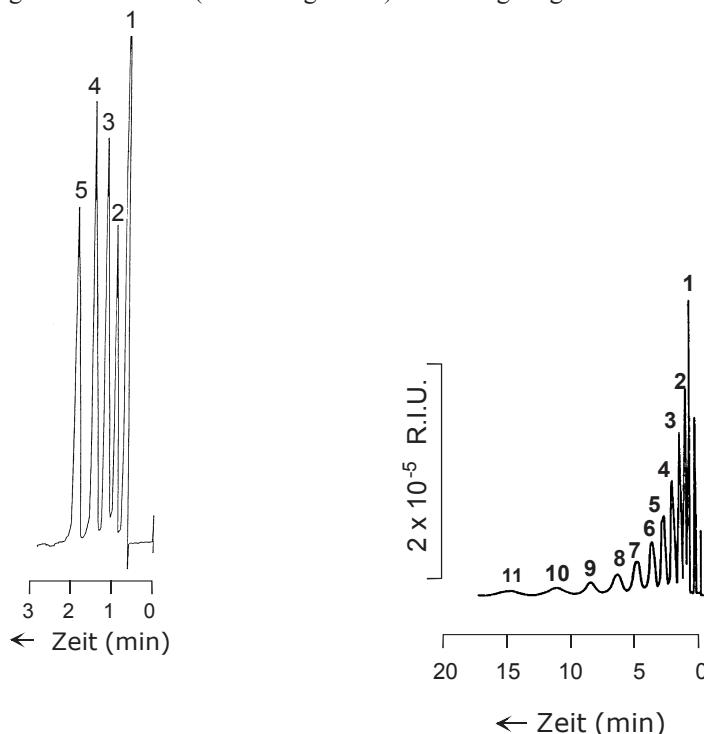


Abb. 15.58 Chromatogramm von Modellsubstanzen.

1: Lösungsmittelpeak, 2: Rhamnose, 3: Glucose, 4: Cellobiose, 5: Raffinose, Glassäule: 100 · 3,8 mm i.D., stationäre Phase: Silasorb NH₂, 5 µm, mobile Phase: ACN/Wasser 75 : 25 V/V, Flussrate: 1,7 ml/min, Vordruck: 9 MPa, Detektion: RI, Injektionsvolumen: 20 µl.

Abb. 15.59 Chromatogramm von Maltooligosacchariden eines Stärkehydrolysat.

1: Glucose, 2: Maltose, Peak 3–11: Maltooligosaccharide mit DP 3–11, Glassäule: 150 · 3,8 mm i.D., stationäre Phase: Silasorb 600, 5 µm, mobile Phase: ACN/Wasser 70 : 20 V/V + 0,01% Piperazin, Flussrate: 1,0 ml/min, Vordruck: 10 MPa, Detektion: RI, Injektionsvolumen: 20 µl.

Auch die Trennung von oligomeren Kohlenhydraten gelingt an Silicagelsäulen mit physikalischer oder chemischer Aminmodifizierung. Die Abbildung 15.58 zeigt die Schnellanalyse einer Pentose, Hexose sowie eines di- und trimeren Kohlenhydrates in weniger als drei Minuten an Silasorb NH₂, während die Trennung einer natürlichen Probe (Stärkehydrolysat) an einer Silicagelsäule (Silasorb 600) mit Piperazin-Imprägnierung in Abbildung 15.60 demonstriert wird.

Untersuchungen von White und Corran [8] zeigen, dass Oligosaccharide an semipräparativen Silicagelsäulen (200 · 8 mm I.D.) durch Elution mit ACN/Wasser (50 : 50 V/V) und mit 0,01% Aminmodifier-Zusatz (1,4-Diaminobutan) bis zu einem Polymerisationsgrad (DP: *degree of polymerisation*) von 20 getrennt werden können.

15.7.2 HPAEC-PAD-Technik

Die methodischen Grundlagen dieser sensitiven und effizienten chromatographischen Methode sind im Abschnitt 5.2.6 ausführlicher erläutert.

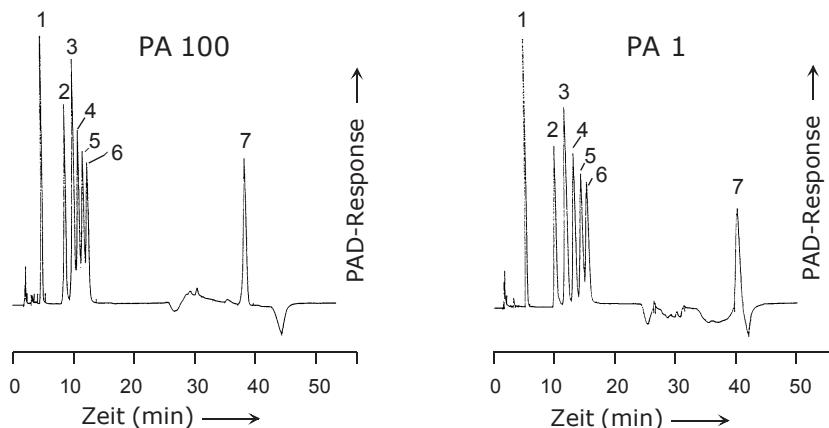


Abb. 15.60 Chromatogramm von Modellsubstanzen.

1: Fucose, 2: N-Acetylgalactosamin,
3: N-Acetylglucosamin, 4: Galactose,
5: Glucose, 6: Mannose, 7: N-Acetylneuraminsäure,

Säule: 250 · 4 mm i.D.,
stationäre Phase: CarboPak PA 100,
mobile Phase: 21 mmol/l NaOH,
Flussrate: 1,0 ml/min,
Detektion: PAD ($E_1=50$ mV,
 $E_2=650$ mV, $E_3=-950$ mV,
 $t_1=300$ ms, $t_2=60$ ms, $t_3=60$ ms),
Injektionsvolumen: 20 µl.

Abb. 15.61 Chromatogramm von Testsubstanzen.

Stationäre Phase: CarboPak PA 1,
Peaks und weitere HPLC-Bedingungen
wie in Abbildung 15.60.

Die HPAEC-PAD-Technik [14, 15] basiert auf der Anionenaustauschchromatographie (*AEC*) unter stark alkalischen Elutionsbedingungen (*high pH*). Zur Registrierung der als Oxianionen vorliegenden Zucker dient die gepulst-amperometrische Detektion (*PAD*).

Die Abbildung 15.60 zeigt die Trennung von sieben Monosaccharid-Species, die vorwiegend in Glycoproteinen vorkommen (siehe a. Abschnitt 15.12), an einer CarboPac PA 100-Säule mit isokratischer Elution [15]. Demgegenüber werden mit der CarboPac PA 1-Säule (15.61) unter identischen Chromatographie-Bedingungen die etwas größeren Peakauflösungen erzielt. Diese können durch Optimierungen der Versuchsbedingungen (Gradient, NaOH-Konzentration) weiter verbessert werden. Im isokratischen Elutionsmodus ist ein NaOH-Anteil um 20 mmol/l günstig, während bei niedrigeren Konzentrationen (11 mmol/l) die Auflösung zwischen *N*-Acetylglucosamin und Galactose unzureichend ist und bei höheren NaOH-Gehalten die Mannose nur als „Schulter“ von der Glucose abgetrennt wird [15]. Auch für die chromatographische Trennung von Oligo- und Polysacchariden ist die Anionenaustauschchromatographie bei hohen pH-Werten gut geeignet. Die Abbildung 15.62 zeigt die Elutionskurve einer Amylosefraktion.

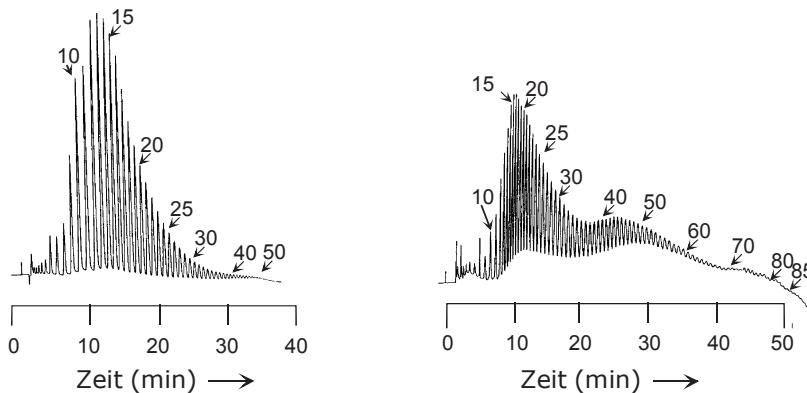


Abb. 15.62 Chromatogramm von (1→4)-*a*-D-Glycanen (kurzkettige Amylose EX-1).

Peak 1–50: DP 1 ... DP 50,
Säule: 250 · 4 mm i.D.,
stationäre Phase: HPIC-AS6,
mobile Phase: A: 150 mM NaOH und
B: A + 500 mM NaAc (Gradienten-
programm I), Flussrate: 1,0 ml/min,
Detektion: PAD ($E_1 = 100$ mV,
 $E_2 = 600$ mV, $E_3 = -800$ mV),
 $t_1 = 300$ ms, $t_2 = 120$ ms, $t_3 = 300$ ms,
Empfindlichkeit: 10 K nA
Injektionsvolumen: 50 µl.

Abb. 15.63 Chromatogramm von Maltodextrinen (aus Maisstärke „Amylo-Waxy“).

Peak 1–85: DP 1 ... DP 85,
(Gradientenprogramm II),
(Empfindlichkeit: 10 K nA,
von 10 auf 3 K nA in den
letzten 10 min),
weitere HPLC-Bedingungen in 15.62.
Mit freundlicher Genehmigung
von K. Koizumi [14].

Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (DP) beträgt 17 [14]. Es wird ein Gemisch bestehend aus (1 → 4)- α -D-Glycanen mittels HPAEC-PAD-Technik im Gradientenmodus analysiert, worin bis zu 50 einzelne Peaks nachweisbar sind. Die Identifizierung jeder einzelnen Komponente erfolgt durch Zugabe von entsprechenden Maltooligosacchariden mit bekannten DP-Graden.

Je höher molekulare Kohlenhydrat-Bausteine in einer Probe vorliegen, desto wahrscheinlicher ist ihr Ausfallen aus der mobilen Phase während der chromatographischen Trennung. Dieser Effekt kann vermieden werden, wenn die Kohlenhydrat-Polymeren in stark basischen Medien mit hoher Salzkonzentration (150 mM NaOH) zuvor gelöst werden.

Auch Fraktionen von Poly- bzw. Oligosacchariden mit noch höheren Polymerisationsgraden können mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie unter stark alkalischen Bedingungen getrennt werden (Abbildung 15.62). Der Gradientenverlauf ist im Vergleich zur Elution in Abbildung 15.63 dadurch gekennzeichnet, dass er zeitlich verlängert ist und einen höheren Prozentsatz an mobiler Phase B erreicht. Auf Grund dessen ist die Peakauflösung zu Beginn des Chromatogramms etwas verringert, während am Ende Glycane bis DP 85 detektiert werden können.

15.7.3 Kapillarelektrophorese

Innerhalb der Anwendung von CE-Methoden in der Zuckermanalytik [22-26] spielt vor allem die Kapillarzonenelektrophorese (Abschnitt 5.4.3.1) eine wichtige Rolle. Mit Hilfe dieser CZE-Technik werden insbesondere mono- und dimere aber auch oligomere Kohlenhydrate getrennt.

Problematisch ist auch hier die Detektion der Zucker, da sie über keine chromophoren Gruppen verfügen. Für relativ unempfindliche Kohlenhydratanalysen in nicht zu komplexen Matrices (insbesondere Peakinterferenzen müssen beachtet werden) ist oft die Kapillarzonenelektrophorese von underivatisierten Species mit der Registrierung im nahen UV-Bereich (200–220 nm) ausreichend.

Die Methode der indirekten UV-Detektion (s. Abbildung 8.30 in Abschnitt 8.4.1.4) ermöglicht einen empfindlicheren Nachweis der Zucker. Dem Migrationspuffer wird ein stark absorbierender Elektrolyt wie z.B. Sorbinsäure zugesetzt, der eine den Zuckermolekülen vergleichbare Mobilität besitzt. Die Substanzzonen von getrennten und nicht oder nur gering absorbierenden Species bewirken eine Abschwächung der Gesamtabsorption im Migrationspuffer und werden in Form von negativen Peaks detektiert.

Eine Alternative zur UV-Registrierung von underivatisierten Zuckern bietet die elektrochemische Detektion. Durch die Entwicklung von Mikroelektroden konnte diese hoch empfindliche Nachweistechnik auch für CE-Systeme erfolgreich angewandt werden. Als Arbeitselektroden dienen z.B. Cu- oder Au-Drähte und als Referenzelektroden fungieren die Kalomel- oder die Ag/AgCl-Elektrode.

Weiterhin werden durch Derivatisierung von mono- bzw. auch oligomeren Kohlenhydraten sehr empfindlich detektierbare Species synthetisiert. Dafür kommen Reagenzien wie 2-Aminopyridin, 4-Aminobenzoësäure oder 8-Aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonsäure (8-ANTS) zum Einsatz.

15.8 Zuckeranalytik und Lactoseintoleranz

Grundlagen und Applikationen zur Analytik von Zuckern (Kohlenhydraten) sind Bestandteil mehrerer Abschnitte (2.3, 15.7, 15.12) dieses Buches. Dies betrifft sowohl die Analyse von mono- und dimeren Zuckern als auch die Auftrennung von oligomeren Kohlenhydraten.

Innerhalb des Applikationsgebietes Lactoseintoleranz (LIT) wird die Liganden-austauschchromatographie (LEC) eingesetzt. Hier werden Säulen auf der Basis von sulfonierten Styren-Divinylbenzen-Trennphasen, die mit Metallionen (Counter-Ionen) „belegt“ sind, verwendet. Es ist eine besonders umweltfreundliche Methodik, da zur Elution nur reines Wasser (ggf. ein wenig angesäuert) zum Einsatz kommt. Die Säulentemperatur liegt im Bereich von 60–85 °C; die Registrierung der Zuckerpeaks erfolgt mit einem RI-Detektor (*refractive index detector*).

15.8.1 Was ist Lactoseintoleranz

Laktoseintoleranz ist eine Milchzuckerunverträglichkeit, die auch als Lactosemangelsyndrom oder Alaktasie bezeichnet wird. Bei Aufnahme von Milchzucker (Lactose) mit der Nahrung kann dieser Zucker auf Grund des Fehlens oder einer stark verminderten Aktivität des Verdauungsenzyms Lactase nicht in seine Bestandteile Glucose und Galactose (Abbildung 15.64) gespalten werden.

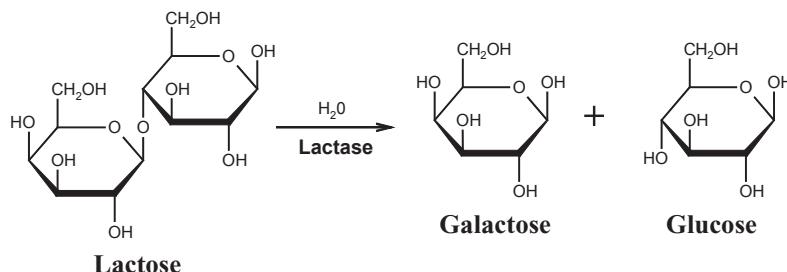


Abb. 15.64 Enzymatische Spaltung von Lactose in Galactose und Glucose

Nur monomere Zucker (Glc, Gal) können im Dünndarm resorbiert werden und damit für eine „geordnete“ Ernährung dienen. Ungespaltener Milchzucker (Disaccharid) gelangt hingegen in den Dickdarm und wird dort von Bakterien zersetzt. Dadurch entstehen Gärprodukte wie Milchsäure, Methan und Wasserstoff. Die Gase führen unter anderem zu Blähungen („Winde“) und die osmotisch aktive Milchsäure zu einem Wassereinstrom in den Darm. Dadurch kann Durchfall (Diarröh) hervorgerufen werden. Der Begriff Lactoseintoleranz wird nur verwendet, wenn derartige Symptome beim Menschen auftreten. Bleiben diese aus, so handelt es sich um eine Lactosemalabsorption (verminderte Nährstoffausnutzung). Circa 75 % der erwachsenen Weltbevölkerung leidet an Lactoseintoleranz. Es gibt aber nur wenige Populationen (meist in den nordischen Ländern), die im erwachsenen Alter über eine Persistenz der Lactaseaktivität verfügen.

In diesen Ländern existieren meist gut entwickelte Milchwirtschaften und ein intensiver Konsum von Milch-Produkten. Bedingt durch die kalten Jahreszeiten ist Milch länger haltbar. Eine gegenteilige Situation existiert in den über das Jahr hinweg sehr warmen Südländern (Sauerwerden der Milch!).

Hier wurden Milch(-Produkte) im Verlaufe der Evolution auf Grund der gerin-
geren Haltbarkeit nur wenig konsumiert. Enzyme wie die Lactase zur Spaltung
von Milchzucker bilden sich zurück, wenn sie nicht (ständig) benötigt werden.
Somit besitzt die Bevölkerung in den Südländern eine Lactoseintoleranz bis zu 90
% und mehr.

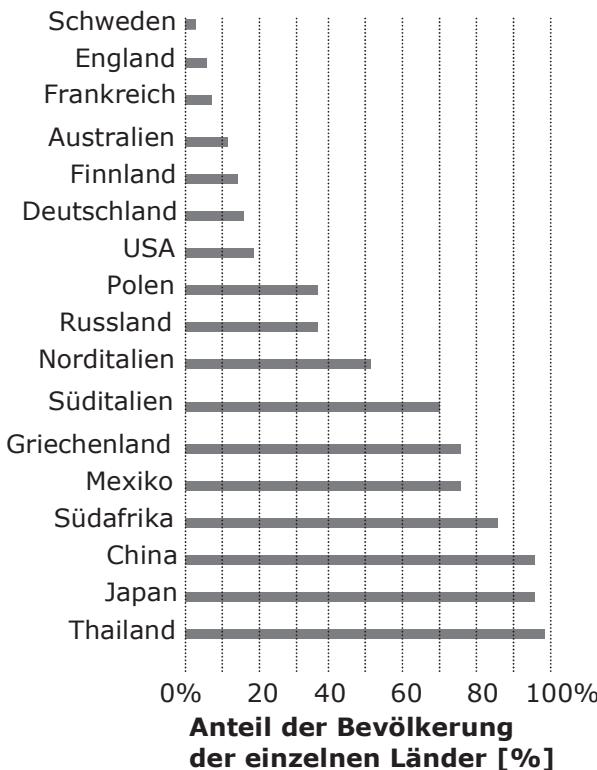


Abb. 15.65 Lactoseintoleranz in verschiedenen Ländern

Gutgemeinte Lieferungen von Milchpulver in Entwicklungsländer auf der Süd-
halbkugel waren vor Jahrzehnten demzufolge kontraproduktiv.

Andererseits bilden neugeborene Säuglinge während ihrer Stillzeit das Enzym Lactase, das den Milchzucker in die verwertbaren Monosaccharide Galactose und Glucose spaltet. Im Laufe der natürlichen Entwöhnung von der Muttermilch sinkt aber die Aktivität der Lactase auf etwa 5–10 % der Aktivität bei der Geburt.

15.8.2 Analytik von Glucose, Galactose und Lactose

Innerhalb der analytischen Untersuchungen von Milchprodukten sind geeignete flüssigchromatographische Methoden erforderlich, die neben der Abtrennung des Disaccharids Lactose auch Basistrennungen zwischen den Hexosen Glucose und Galactose erreichen.

Beide Hexosen unterscheiden sich in ihren Strukturen nur marginal. Mittels Ligandenaustrauschchromatographie (LEC) gelingt eine gute Peakauflösung, wie das Beispiel der Analyse von Katzenmilch zeigt (Abbildung 15.66). Derartige Produkte – wie auch lactosefreie Milch – enthalten kaum noch die Lactose (1) und sind bei Lactoseintoleranz geeignete Nahrungsmittel.

Es sind auch nur geringe Probenmengen erforderlich. So werden 250 µl Milch in einem 100-ml-Kolben mit reinem Wasser gelöst. Das entspricht einer Verdünnung von 1:400 V/V. Die Matrix der Milch (Fette, Proteine, Mineralstoffe) spielt praktisch keine Rolle und kann weitestgehend vernachlässigt werden.

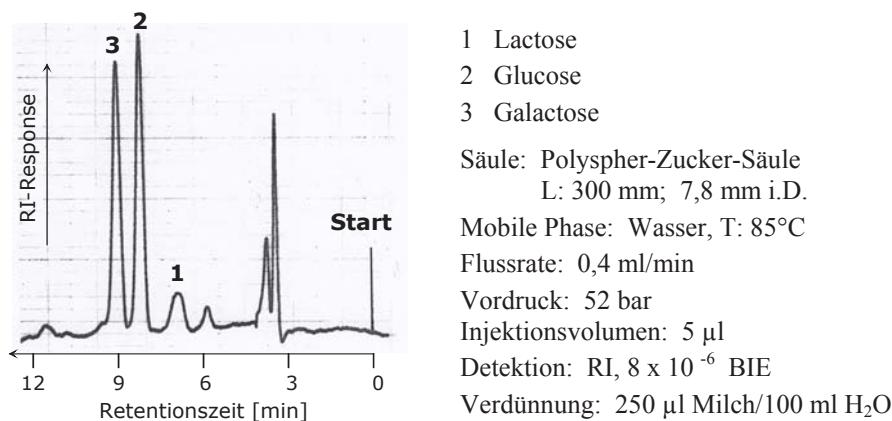


Abb. 15.66 Chromatogramm von Katzenmilch (Whiskas)

Reine Kuhmilch enthält ca. 5 % Lactose (Abbildung 15.67). Bei Rentieren ist der Anteil halbiert und Muttermilch kann bis zu 7 % Lactose enthalten.

Lactosefreie Milch kann auch selbst hergestellt werden. Dazu werden Tabletten, die das Enzyme Lactase enthalten, in normale Kuhmilch eingebracht. Die Abbildung 15.68 zeigt das Resultat einer mit Lactasetabletten durchhydrolysierten Kuhmilch. Auch hier sind kaum noch detektierbare Mengen an Lactose vorhanden. Glucose und Galactose als adäquate Bestandteile des Disaccharids Lactose erscheinen im Chromatogramm mit identischen Peakhöhen, da auch die RI-Response zwischen beiden Hexosen vergleichbar ist. Die enzymatische Lactose-spaltung ist natürlich von der Enzymmenge bzw. seiner Aktivität sowie von der Einwirkzeit und der Temperatur abhängig.

Einige Analysenergebnisse dazu werden im nächsten Abschnitt präsentiert.

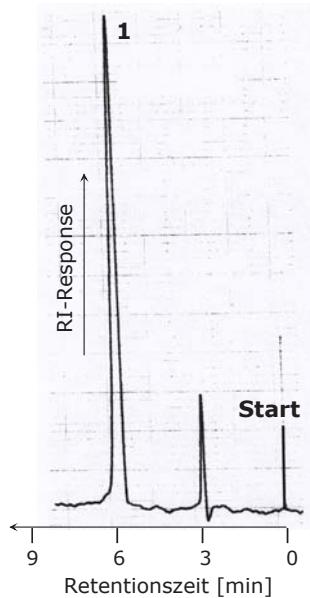


Abb. 15.67 Kuhmilch, Bedingungen wie in Abb. 15.66

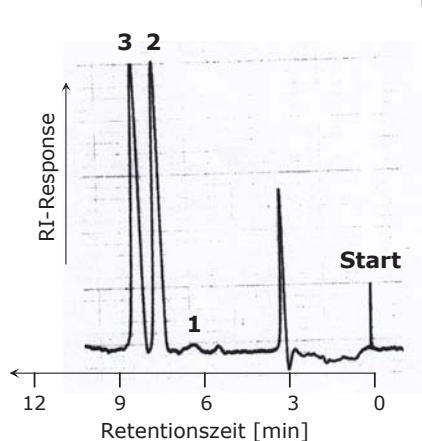


Abb. 15.68 Hydrolysierte Kuhmilch, Bedingungen wie in Abb. 15.66

15.8.3 Enzymatischer Abbau von Lactose in Milch

Durch Zugabe von Lactasetabletten in ein Glas Kuhmilch kann die Lactose vollkommen in Glucose und Galactose gespalten werden (Abbildung 15.68). Somit kann der Proband, der unter Lactoseintoleranz leidet bzw. dies glaubt, bedenkenlos dieses Milchprodukt genießen.

Mit Hilfe der vorgestellten LEC-Analytik kann nun die Kinetik dieses Hydrolyseprozesses kontinuierlich verfolgt und optimiert werden (Abb. 15.69, 15.70).

Bei der Versuchsdurchführung wurden 80 ml Kuhmilch in einem Becherglas (für die Verdünnung der zu analysierenden Proben mit Wasser ist es günstig Milch mit einem Fettanteil von 0,3 % einzusetzen) mit Lactasetabletten versetzt. Die enzymatischen Abbauvorgänge erfolgten in Abhängigkeit von der Zeit (6 und 300 Minuten) und der Temperatur (Abb. 15.69: Raumtemperatur, RT, und bei 37 °C.). Bei ca. 70 °C waren die Enzyme der Lactasetabletten inaktiv und es fand kein Abbau statt. Nach erfolgter Probenahme aus dem Becherglas wurde die Milch mit entionisiertem Wasser verdünnt (250 µl Milch in 100 ml Wasser) und zentrifugiert (5 min bei 7000 g). Der Überstand wurde danach in eine HPLC-Apparatur appliziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Spaltung der Lactose im „Probeglas“ nur sehr langsam verläuft. Erwartungsgemäß ist das Enzym bei einer höheren Temperatur (37 °C) aktiver im Vergleich zur Raumtemperatur (RT).

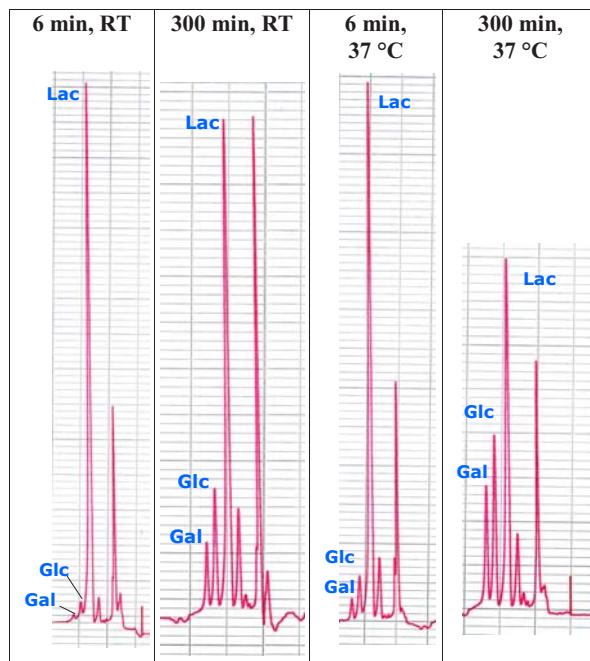


Abb. 15.69 Enzymatische Hydrolyse von Milch bei RT und 75 °C

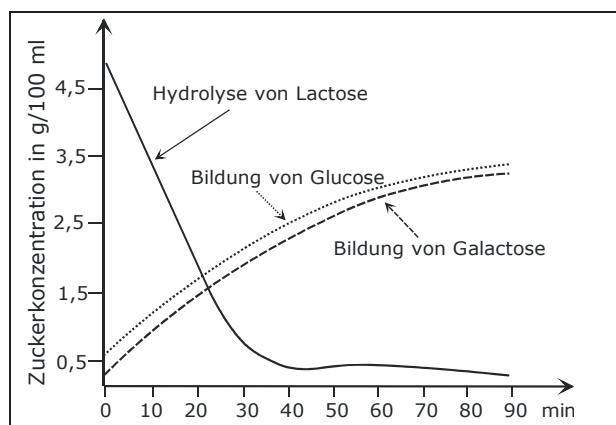


Abb. 15.70 Hydrolyse von Lactose, Bildung von Glucose und Galactose

Die Chromatogramme (Abb. 15.69) zeigen den schrittweisen Rückgang des Lactose-Peaks und die Anstiege der Glucose- und Galactose-Peaks.

In Abbildung 15.70 sind weitere Kinetiken dargestellt. Bei diesen Versuchen erfolgte die enzymatische Hydrolyse von Lactose bei 50 °C.

15.9 Säuren in biotechnologischen Prozessen

Zu den organischen Säuren gehören u.a. die Carbonsäuren und Oxocarbonsäuren. Eine weitere Gruppe sind die Fettsäuren, die z.B. nach ungesättigten, verzweigt-kettigen, ungeradzahligen, cyclischen oder Hydroxy-Fettsäuren unterschieden werden (vgl. auch Abschnitt 2.4.1). Die Analytik von Aminosäuren war bereits Gegenstand der Abschnitte 15.4 und 15.5. Die Bestimmung von Fettsäuren mittels GC bzw. GC-MS ist in Abschnitt 15.9.2 enthalten.

15.9.1 Organische Säuren in Fermentationsmedien

Organische Säuren sind Bestandteile vieler Nahrungs- und Genussmittel und kommen oft in der Natur zusammen mit Kohlenhydraten vor. Für die Analyse organischer Säuren in komplexen Proben dienen meist HPLC-Methoden [1-13].

Organische Säuren können auch innerhalb biotechnologischer Verfahren mit Hilfe von Mikroorganismen produziert werden (Abbildung 15.71).

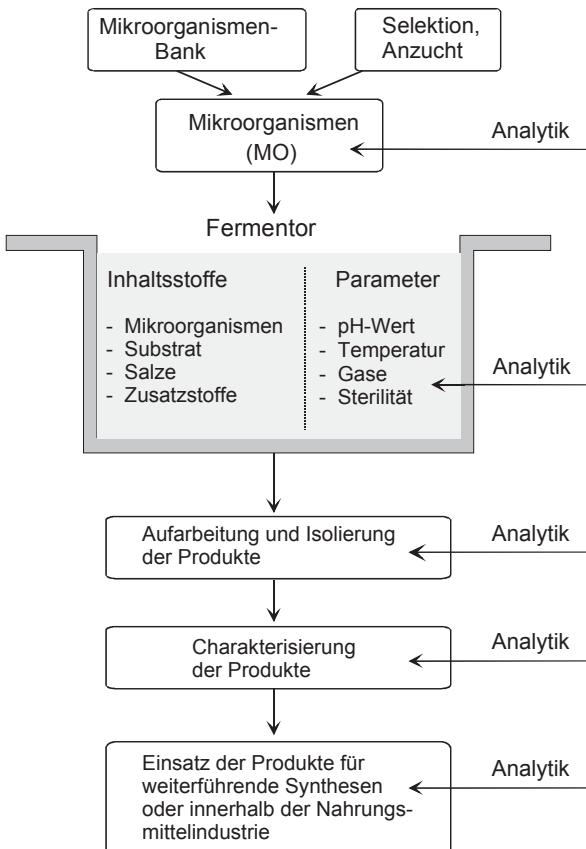


Abb. 15.71 Prozessanalytik innerhalb der mikrobiellen Produktsynthese.

Die mikrobielle Synthese organischer Säuren erfolgt in Fermentoren und erfordert eine vorherige Auswahl von geeigneten Mikroorganismen aus einer Stamm Sammlung oder ihre Isolierung aus einer natürlichen (biologischen) Matrix sowie die Optimierung der Prozessparameter (z.B. pH-Wert, Temperatur, Nährsalze oder Gaszufuhr) für die Fermentation. Während der Produktsynthese ist eine begleitende Analytik erforderlich, die meist on-line mit dem Fermentor gekoppelt ist. Für die Charakterisierung der Endprodukte sowie zur Kontrolle von weiterführenden mikrobiellen oder auch chemischen Synthesen sind ebenfalls analytische Verfahren erforderlich.

Von verfahrenstechnischer, aber auch wirtschaftlicher Bedeutung, ist das gewählte Substrat, auf dem die Mikroorganismen utilisiert werden. Kommerziell verfügbares Methanol oder Paraffinöl können direkt zur Fermentation eingesetzt werden, während andere (zuckerhaltige) Substrate auch in einer Vorstufe durch saure oder enzymatische Hydrolyse von Polysacchariden (Stärke) hergestellt werden können (Abbildung 15.72). Dieses Schema beinhaltet auch spezielle Zielprodukte von organischen Säuren und die für ihre Synthese eingesetzten Mikroorganismen.

Zur Prozess- und Qualitätskontrolle haben sich leistungsfähige und gegenüber von Fermentationsmedien robustere flüssigchromatographische Methoden wie die Ionenaustauschchromatographie besonders bewährt.

Am Beispiel der 2-Oxoglutarsäure-Synthese werden einige entwickelte und optimierte HPLC-Methoden [9-13] vorgestellt und die damit erzielten Ergebnisse (z.B. Kinetiken von Fermentationsprozessen) präsentiert.

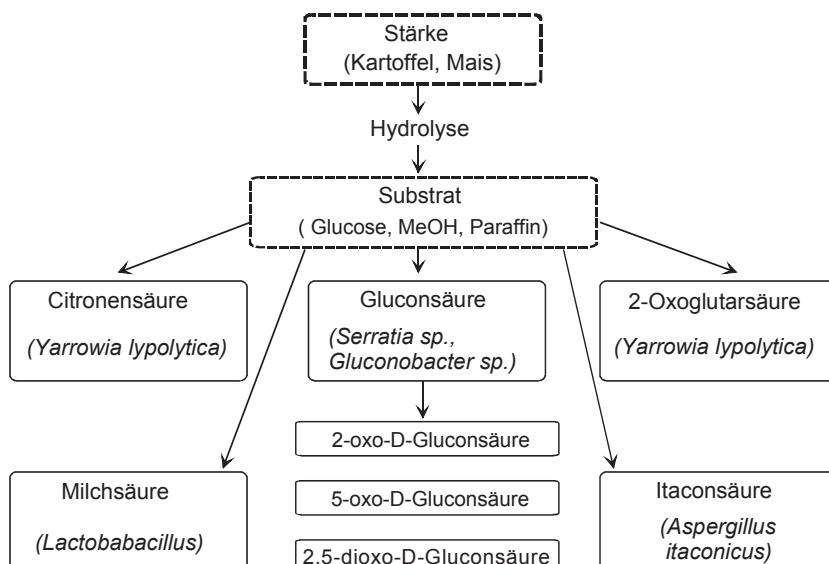


Abb. 15.72 Mikrobielle Produktsynthesen von organischen Säuren

15.9.1.1 Ionenaustauschchromatographie von organischen Säuren

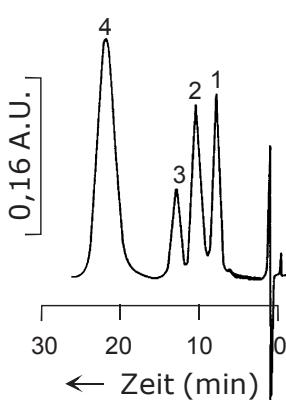
Oxocarbonsäuren können u.a. an Anionenaustauschern auf Styren-Divinylbenzen- oder Silicagelbasis und mittels Ionenausschlusschromatographie (Ligandenaustauschchromatographie, sulfonierte Kationenaustauscher) getrennt werden.

Entscheidende Fortschritte in der Ionenaustauschchromatographie organischer Säuren gehen auf Arbeiten von Turkelson und Richards [3] zurück, die Säuren des Tricarbonsäurecyclus an einem 4% quervernetzten Styren-Divinylbenzen-Copolymer chromatographierten. Weiterhin konnten durch höhere Vernetzungen (8%) der Ionenaustauscher die Druckstabilität erhöht, das Quellvermögen reduziert sowie Permeabilität und Kapazität verbessert werden.

Die Realisierung kleiner Polymerpartikel um $10\text{ }\mu\text{m}$ ($5\text{ }\mu\text{m}$) mit enger Korngrößenverteilung garantiert gegenüber Silicagelmaterialien vergleichbare Trennleistungen der Säulen (bis ca. $30\,000\text{ N/m}$). Die damit verbundene Konzentrierung der Probespecies innerhalb der „spitzen Peakprofile“ führt zu Empfindlichkeitsteigerungen bei der Detektion der Säuren.

Seither werden Standardsäulen für die Ionenausschlusschromatographie (z.B. Aminex HPX-87-Serie) oder stark basische Anionenaustauscher (Aminex A 25... A 29) zur Bestimmung organischer Säuren auf den verschiedensten Gebieten angewandt [2, 4, 6, 7].

Eine speziell präparierte Trennsäule, die mit einem stark basischen Anionenaustauscher auf Styren-Divinylbenzen-Basis (SBA=S-DVB) gefüllt ist, zeichnet sich durch einfache Herstellung, schnelle Regenerierung und hohe Robustheit bei der Analytik der Säuren (Citronens-, Brenztraubens- und Isocitronensäure) in Fermentationsmedien der 2-Oxoglutarsäure-Synthese aus (Abbildung 15.73). Die Trennung der organischen Säuren erfolgt an einer druckstabilen Glassäule, die mit dem SBA=S-DVB-Material gefüllt ist. Als Eluent dient ein $0,28\text{ M}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puffer mit einem pH-Wert von 10. Die Elutionskurve wird im nahen UV-Bereich registriert [9].



1: Citronensäure (6,65 mg/ml), 2: Brenztraubensäure (0,8), 3: Isocitronensäure (6,65), 4: 2-Oxoglutarsäure (2,66),
Glassäule: $50 \cdot 8\text{ mm i.D.}$,
stationäre Phase: Anionenaustauscher,
 $\text{dp}: 10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$,
mobile Phase: $0,28\text{ M}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
 $\text{pH} = 10,0$;
Flussrate: $1,0\text{ ml/min}$,
Vordruck: $1,5\text{ MPa}$,
Detektion: UV, 210 nm ,
Injektionsvolumen: $20\text{ }\mu\text{l}$.

Abb. 15.73 Chromatogramm von Modellsubstanzen.

Dieses Trennsystem zeigt bei der Analyse von Fermentationsmedien eine hohe Langzeitstabilität und ermöglicht das Applizieren der komplexen Proben nach entsprechender Verdünnung direkt auf die Trennsäule bzw. eine Vorsäule.

Allerdings sind Peaküberlappungen vorprogrammiert, wenn größere Mengen Brenztraubensäure mit hohem Extinktionskoeffizienten neben geringen Mengen Citronen- und Isocitronensäure mit kleinen ϵ_λ -Werten im Probematerial vorliegen.

Für besonders schnelle und effiziente Analysen (Abbildung 15.74) eignen sich kurze HPLC-Trennsäulen [10] mit kleinkörnigen Partikeln um 3 µm oder 5 µm (DEAE-Si 100 Polyol).

Die Elutionsreihenfolge an diesem schwach basischen Ionenaustauscher ist gegenüber der SBA=S-DVB-Säule verändert. Brenztraubensäure wird im Vergleich zu dem Peakpaar von Citronen- und Isocitronensäure separat eluiert und kann deshalb auch in sehr großen Mengen im Fermentationsmedium bestimmt werden. Die Weinsäure fungiert hier als innerer Standard für eine exaktere Quantifizierung der organischen Säuren in Fermentationsmedien und damit zur Erstellung von Fermentationskinetiken.

Beide Trennsysteme ergänzen sich und werden innerhalb der Charakterisierung und Optimierung der 2-Oxoglutarsäure-Synthese als robuste und zuverlässige analytische HPLC-Methoden eingesetzt.

Von 60 verschiedenen Wildstämmen und Mutanten, die in Vorversuchen mittels Schüttelkolben getestet und mit HPLC analysiert wurden, konnte lediglich der Hefestamm *Yarrowia lipolytica* mit einer herausragenden 2-Oxoglutarsäure-Produktion selektiert werden [9].

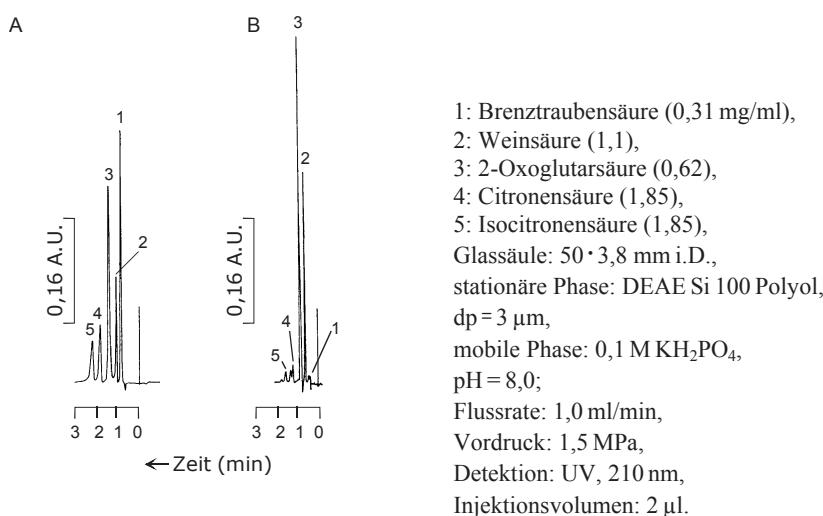


Abb. 15.74 Chromatogramme von Modellsubstanzen (A) und einer Fermentationslösung (B)

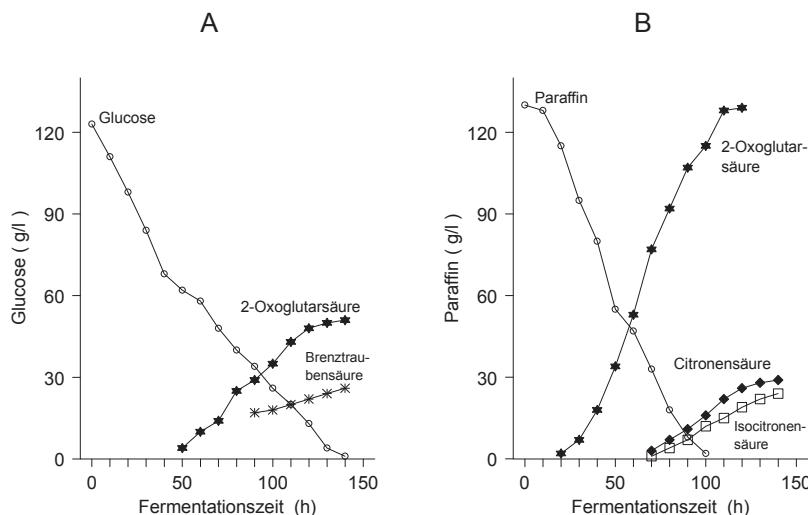


Abb. 15.75 Kinetik der 2-Oxoglutaräuresynthese auf Glucose (A), Paraffin (B)

Seine Kultivierung auf einem glucosehaltigen Substrat (Abbildung 15.75, A) wird von einer verstärkten Ausschüttung von Brenztraubensäure begleitet, während der gleiche Hefestamm auf Kohlenwasserstoffen (Paraffin) deutlich höhere 2-Oxoglutaräuremengen produziert (15.75, B).

Als Nebenprodukte dieser Fermentation treten Citronen- und Isocitronensäure in größeren Mengen auf.

Innerhalb der Optimierung der Fermentationsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur oder Gelöstsauerstoffkonzentration ist auch die Untersuchung des Einflusses der Thiaminkonzentration auf die verstärkte Produktbildung von 2-Oxoglutaräure von besonderem Interesse. Während die kritischen Thiaminkonzentrationen für vergleichbare Hefestämme i.d.R. zwischen 0,3 und 4,0 µg/l Thiaminchlorid liegen, erwiesen sich für den eingesetzten Stamm der Hefe *Yarrowia lipolytica* bereits Konzentrationen von 0,05–0,15 µg/l als optimal für diese Säurereproduktion [9, 10].

15.9.1.2 Ionenausschlusschromatographie von organischen Säuren

Zur Analyse von niederen organischen Säuren dienen Säulen mit Polymeren auf Styren-Divinylbenzen-Basis (Abschnitt 5.2.1; 5.2.2). Auch Oxosäuren und Kohlenhydrate werden an derartigen Säulen getrennt.

Die Elution in der ICE (*ion chromatography exclusion*) erfolgt bei sehr niedrigem pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure, wodurch die Dissoziation der Säuren unterdrückt wird und die organischen Säuren durch die o.g. Trenneffekte auf der Säule retardiert werden. Gleichzeitig bewirkt der Eluent Schwefelsäure eine ständige Reinigung und Regenerierung der polymeren Trennphase.

In die H⁺-Form überführte HPX-Säulen zeigen optimale Auflösungen für niedrige Säuren bei Temperaturen zwischen 30 und 60 °C, während eine Modifizierung der Trennphase mit Bleiionen und die Elution mit Wasser bei einer Säulentemperatur von 85 °C selektive Kohlenhydrat-Trennungen ermöglichen [13].

LC-Trennungen von kurzketten C₁- bis C₆-Alkansäuren (Ameisen-, Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter-, Valerian- und Isovaleriansäure) sowie von Milchsäure an einer kommerziellen Trennsäule zeigen die Abbildungen 10.40, 10.41.

Die Trennung erfolgt an einer Aminex HPX-87H-Säule (300 · 7,8 mm i.D.) mit verdünnter Schwefelsäure als mobiler Phase bei einer Temperatur von 40 °C und mit einer Flussrate von 0,6 ml/min innerhalb von ca. 30 Minuten. Eine deutliche Vergrößerung der Elutionsgeschwindigkeit, um die Analysenzeit zu reduzieren, wird nicht empfohlen, da der Säulenvordruck stark ansteigen kann. Zur Registrierung der niederen organischen Säuren dient ein duales Detektionssystem (UV- und RI-Detektion).

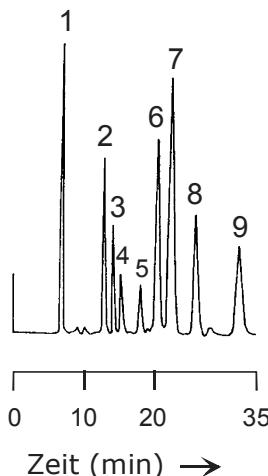


Abb. 15.76 Registrierung des Chromatogramms mit UV-Detektion, $\lambda = 205 \text{ nm}$.

- 1: Elutionsmittelfront
- 2: Milchsäure (150 µg/ml)
- 3: Ameisensäure (62,4)
- 4: Essigsäure (62,4)
- 5: Propionsäure (72,0)
- 6: Isobuttersäure (240)
- 7: Buttersäure (480)
- 8: Isovaleriansäure (236)
- 9: Valeriansäure (236).

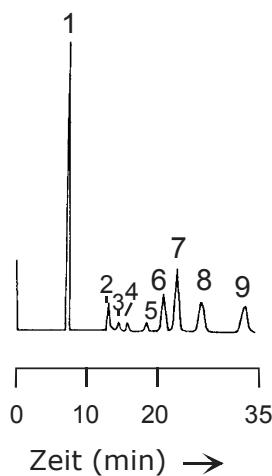


Abb. 15.77 Registrierung des Chro-

matogramms mit RI-Detektion.
Empfindlichkeit: 5,
Säule: 300 · 7,8 mm i.D.,
stationäre Phase: Aminex HPX-87H,
Vorsäule: 50 · 4,6 mm i.D.,
stationäre Phase: Aminex A9,
Temperatur: 40 °C,
mob. Phase: 0,02 M H₂SO₄,
Flussrate: 0,6 ml/min,
Vordruck: 7,3 MPa,
Injektionsvolumen: 40 µl.

Aus den Chromatogrammen geht hervor, dass die Registrierung der Elutionskurve im nahen UV-Bereich bei 205 nm (Abbildung 15.76) im Vergleich zur RI-Detektion (Abbildung 15.77) empfindlicher ist.

Die Anwendung dieses Detektionssystems auf ein Fermentationsmedium (s.a. Abbildung 15.78) zeigt, dass unbekannte Fermentationssubstanzen mit hohem Extinktionskoeffizienten unverhältnismäßig intensiv angezeigt werden (Abbildung 15.78: UV-Detektion). Daraus resultieren auch Peakinterferenzen im Chromatogramm. Demgegenüber wird aus der mittels RI-Detektion registrierten Elutionskurve deutlich, dass Glucose als überwiegende Hauptkomponente in dieser Fermentationslösung vorhanden ist. Dies ist im nebenstehenden Chromatogramm (Abbildung 15.79) dargestellt.

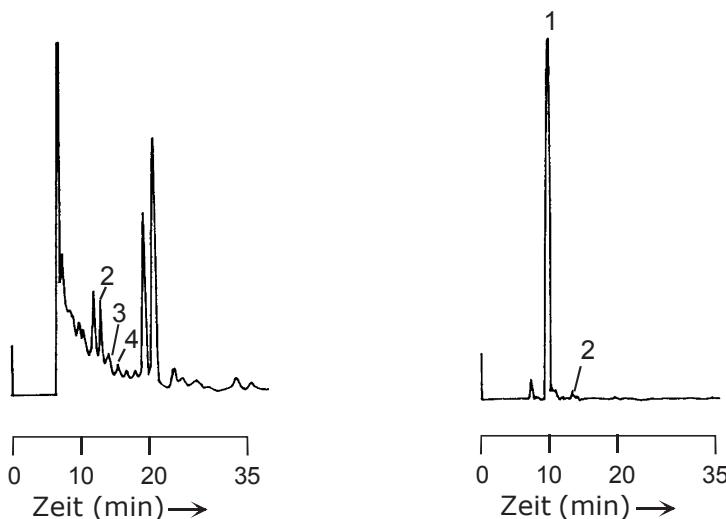


Abb. 15.78 Chromatogramm einer Startkultur, UV-Detektion

1: Glucose, 2: Milchsäure,
3: Ameisensäure, 4: Essigsäure,
HPLC-Parameter: s. 15.77.

Abb. 15.79 Chromatogramm einer Startkultur, RI-Detektion

(Parameter: s. 15.77, 15.78).

15.9.2 Fettsäuren in Hefen und Bakterien

Die Strukturen von häufig in der Natur vorkommenden und bedeutsamen Fettsäuren sind bereits im Abschnitt 2.4.1 vorgestellt worden. Als Fettsäuren werden im engeren Sinne die gesättigten und ungesättigten Carbonsäuren, die Alkylketten mit ca. 10 bis 24 C-Atomen enthalten, bezeichnet [14]. Hinzu kommen atypische bzw. seltene Fettsäuren, die z.B. durch Kettenverzweigungen, Cyclopropan- oder Cyclopopenstrukturen sowie Hydroxygruppen gekennzeichnet sind.

Von besonderer Bedeutung innerhalb der biotechnologischen Forschung ist die Analyse der Fettsäuren in Mikroorganismen der Hefen und Bakterien [15-18].

Über den Stoffwechsel von Mikroorganismen (insbesondere Bakterien) können (atypische) Fettsäuren synthetisiert werden, die in herkömmlichen Nahrungsmitteln nicht oder kaum vorkommen. Sie besitzen deshalb ernährungsphysiologische und toxikologische Bedeutung.

Zur taxonomischen Einordnung dieser Mikroorganismen kann neben chemischen, morphologischen und serologischen Methoden auch die Zusammensetzung der Fettsäuren herangezogen werden [19, 20]. Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgt mittels Kapillargaschromatographie und stellt eine Art „Fingerprint-Profil“ für jeden einzelnen Mikroorganismus dar. Es existieren bereits umfangreiche Datenbanken [21], die durch Vergleich der Fettsäuremuster zur Identifizierung von unterschiedlichen Bakterienstämmen erfolgreich eingesetzt werden.

Auch die Fettsäureverteilung in Bakterienlipiden ist im Vergleich zu Hefelipiden unterschiedlich. Die Fettsäuren der Hefen sind den in Nahrungsfetten enthaltenen sehr ähnlich. Es dominieren unter den geradzahligen, gesättigten Fettsäuren die Palmitin- und Stearinsäure. Von den ungesättigten Fettsäuren treten vor allem Palmitolein- und Ölsäure auf.

In Bakterienlipiden sind in der Gruppe der geradzahligen gesättigten Fettsäuren insbesondere die Palmitin-, Stearin- und Myristinsäure enthalten, während Octadecen- und Palmitoleinsäure zu den Hauptvertretern der ungesättigten Spezies gehören. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren fehlen bzw. sind nur in sehr geringen Mengen anzutreffen. Demgegenüber sind atypische Fettsäuren (Cyclopropan-, Cyclo-propen-, Hydroxyfettsäuren) Bestandteile insbesondere von Bakterien; z.T. auch von Hefen. Cyclopropenfettsäuren werden mit einer canzerogenen Wirkung und Hydroxyfettsäuren mit Wachstumshemmung in Zusammenhang gebracht [22, 23].

Ernährungsphysiologisch sind die ungesättigten Fettsäuren besonders wertvoll (essentiell). Zu den wichtigsten Vertretern dieser essentiellen Fettsäuren (Polyenfettsäuren) gehören die Linol- und Linolensäure. Polyenfettsäuren besitzen auch schützende Funktionen, z.B. gegen Krebs, Allergien oder Arthritis [24].

Für eine vertieftere Betrachtung der Funktionen und Eigenschaften von Fettsäuren wird auf die weiterführende Literatur [25] verwiesen.

Die zur Isolierung der Fettsäuren aus dem biologischen Material erforderlichen Aufarbeitungsschritte sind in Abbildung 15.80 enthalten.

Sie umfassen die Extraktion, Verseifung sowie die Freisetzung und Veresterung der Fettsäuren. Weit verbreitet ist die Extraktion der Lipidfraktion nach Folch [26] mit Chloroform/Methanol-Gemischen (Pfad 1). Die sich anschließende Präparation der Fettsäuremethylester erfolgt durch eine Umesterung der Lipide; bei „frei“ vorliegenden Fettsäuren durch direkte Veresterung mit Bortrifluorid.

Biologische Materialien mit stabilen Zellwänden müssen zur Freisetzung der Fettsäuren mit intensiveren Methoden (mechanisch, enzymatisch, mit Säuren) aufgeschlossen werden. Zu diesen gehört auch die alkalische Hydrolyse (Pfad 2) mit anschließender Extraktion des Lipidextraktes, der Freisetzung der Fettsäuren und der Überführung in die Methylester.

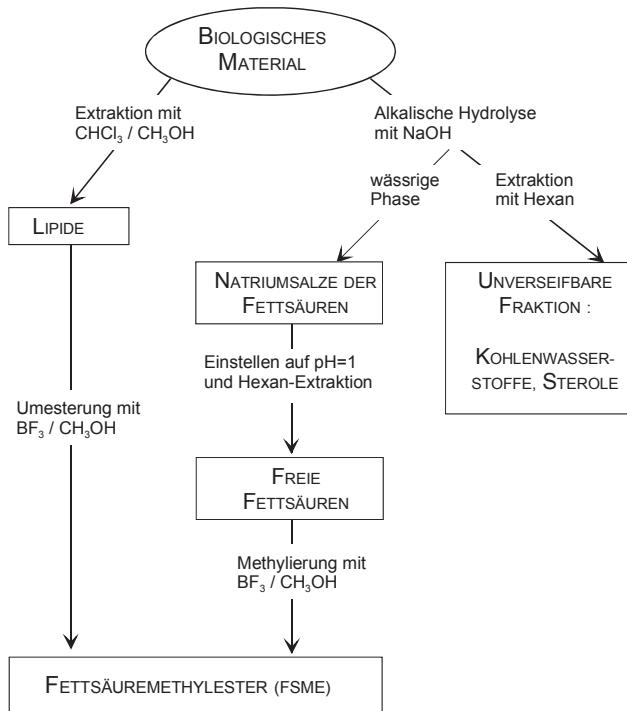


Abb. 15.80 Aufarbeitung der Lipidfraktion

Die Trennung der Fettsäuremethylester mittels Gaschromatographie erfolgt hauptsächlich an unpolaren, thermostabilen Silicon trennphasen (OV-1, SE 30, [15, 16]).

15.9.2.1 Modifizierungen und Kapillargaschromatographie

In Abbildung 15.81 sind zwei Wege zum Nachweis einzelner Fettsäurespecies mit Hilfe der Kapillargaschromatographie (CGC) aufgezeigt. Gepackte GC-Säulen sind im Vergleich zu Kapillaren auf Grund ihrer geringen Trennleistung für komplex zusammengesetzte Gemische kaum einsetzbar.

Die Kopplung der CGC mit der Massenspektrometrie (Pfad 1) gilt als weitverbreitete strukturanalytische Methode zur Bestimmung von Fettsäuren in biologischen Matrices.

Die CGC-MS-Kopplung verbindet in idealer Weise die hohe Trenneffizienz und Reproduzierbarkeit der Kapillargaschromatographie mit der hohen Selektivität und Empfindlichkeit der Massenspektrometrie. Der aktuelle Stand zur CGC-MS-Analytik von Fettsäuren geht aus der neueren Literatur [29] hervor; die folgenden Darstellungen reflektieren auf den Beginn dieser Entwicklungen.

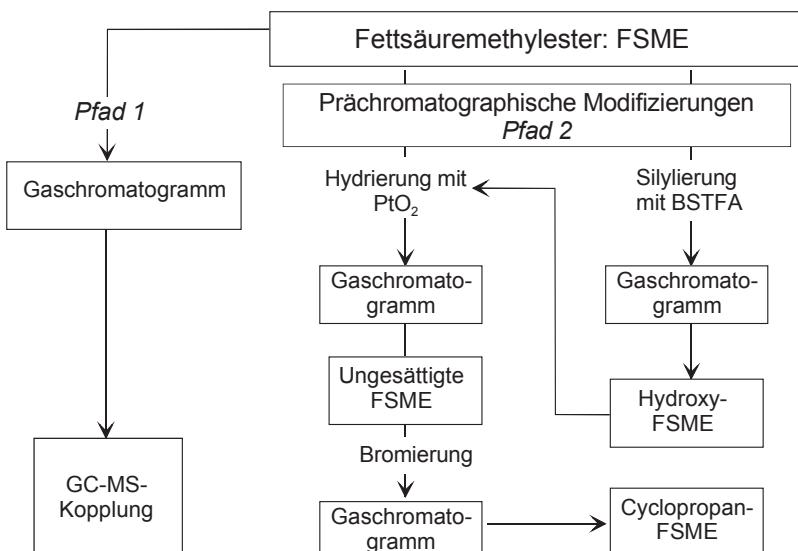


Abb. 15.81 Prächromatographische Modifizierungen und CGC von FSME.

Das Einbeziehen von chemischen Reaktionen und Derivatisierungen (prächromatographische Modifizierungen der Fettsäuren, Pfad 2) bietet die Möglichkeit zur Klassifizierung von funktionellen Gruppen innerhalb der Fettsäuremoleküle. Zum Beispiel werden durch Hydrierung die Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren eliminiert. Durch Silylierung wird eine selektive Reaktion mit vorhandenen Hydroxygruppen ausgelöst. Die Bromierung erfolgt am Cyclopropanring [15, 16].

Auf Grund dieser Modifizierungen der Fettsäuren kommt es zu Veränderungen der Peakzusammensetzung im Kapillargaschromatogramm. Es treten Retentionszeitverschiebungen, Eliminierung und Neubildung von Peaks auf, wie der Vergleich zwischen den Chromatogrammen in Abbildung 15.82 und 15.83 zeigt.

Die kapillargaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester einer nativen Probe aus Bakterienlipiden an einer OV-1-Kapillare spiegelt die hohe Trenneffizienz der CGC-Methode wieder. An Hand der Retentionszeiten entsprechender Referenzsubstanzen können einige Fettsäuremethylester-Peaks (z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure, Linolsäure, Ölsäure) zugeordnet werden.

Am Beispiel der Hydroxyfettsäuren wird die Aussagefähigkeit der angewandten prächromatographischen Modifizierungen näher vorgestellt.

Nach der Silylierung der Probe und kapillargaschromatographischen Trennung unter identischen Bedingungen resultiert das Chromatogramm in Abbildung 10.46. Die Peaks der 3-Hydroxydekansäure (**10**: dunkel unterlegt), 2-Hydroxytetradekansäure (**19**), 3-Hydroxytetradekansäure (**20**), 2-Hydroxyhexadekansäure (**29**), 2-Hydroxy-cis-vaccensäure (**35**) und 2-Hydroxy-11,12-methylenokta-dekansäure (**36**) treten nicht mehr auf. Dafür werden die entsprechenden Silylierungsprodukte (Peakbezeichnung **10***, **19***, **20***, **29***, **35***, **36***) bei größeren Retentionszeiten registriert.

Wird die native und silylierte Probe nachfolgend hydriert, so treten weitere Peakverschiebungen auf. Die 2-Hydroxy-cis-vaccensäure (Peak 35 in Abbildung 15.81) und das korrespondierende Silylierungsprodukt (Peak 35* in Abbildung 15.82) ändern ihre Positionen, wodurch eine ungesättigte Hydroxy-Fettsäure nachgewiesen wird. Erfolgt auch noch die Bromierung der silylierten/hydrierten Lipidprobe, wird der Peak 36* eliminiert. Hier handelt es sich um eine Hydroxy-Cyclopropan-Verbindung. Die anderen Hydroxysäuren bleiben durch diese Reaktionen unverändert und werden als gesättigte Hydroxysäuren ausgewiesen.

Zur weiteren Identifizierung von Fettsäurestrukturen (Alkylkettenverzweigung, Anzahl der Doppelbindungen) der komplexen Lipidprobe dienen Struktur-Retentions-Beziehungen auf der Grundlage des Retentionsindexkonzeptes in Form von äquivalenten Kettenlängen (ECL, [27]). Für den Palmitinsäuremethylester (C_{16}) z.B. beträgt der ECL-Wert definitionsgemäß 16,00 und für Stearinsäuremethylester (C_{18}) 18,00. Durch Auftragen der gemessenen ECL-Werte (logarithmisch) von mehreren Testsubstanzen gegen die Kohlenstoffzahl (C-Zahl) resultiert eine Gerade, aus der an Hand der ermittelten ECL-Werte auf noch unbekannte Fettsäuremethylester geschlossen (extrapoliert) werden kann. Beispielsweise werden die gemessenen ECL-Werte von 15,76 und 17,76 den ungesättigten Verbindungen Palmitoleinsäure bzw. Vaccensäure zugeordnet.

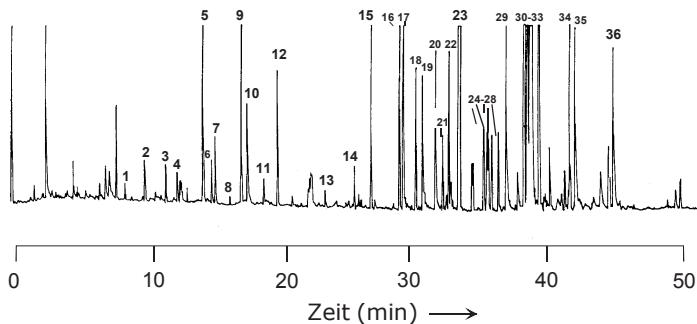


Abb. 15.82 Chromatogramm der Kapillar-GC einer nativen Probe [16]

Kapillarsäule: 21 m · 0,22 mm i.D., imprägniert mit OV 1, Detektion: FID,
 1: Nonansäure (12,71 min), 2, 3, 5, 9, 14: nicht identifiziert, 4: Dekansäure,
 6: iso-Undekansäure, 7: anteiso-Undekansäure, 8: Undekansäure, 10: 3-Hydroxydekan-säure, 11: anteiso-Dodekansäure, 12: Dodekansäure, 13: Tridekan-säure, 15: Tetradekansäure, 16: iso-Pentadekansäure, 17: anteiso-Pentadekan-säure, 18: Pentadekansäure, 19: 2-Hydroxytetradekansäure, 20: 3-Hydroxy-tetradekansäure, 21: iso-Hexadekansäure, 22: Palmitoleinsäure, 23: Palmitinsäure, 24: iso-Heptadekansäure, 25: anteiso-Heptandekansäure, 26: monoungesättigte Heptansäure, 27: 9,10-Methylenpalmitinsäure, 28: Heptadekansäure, 29: 2-Hydroxyhexadekansäure, 30: Linolsäure, 31: Ölsäure, 32: cis-Vaccen-säure, 33: Stearinsäure, 34: 11,12-Methylenoktadekansäure, 35: 2-Hydroxy-cis-vaccensäure, 36: 2-Hydroxy-11,12-methylenoktadekansäure.

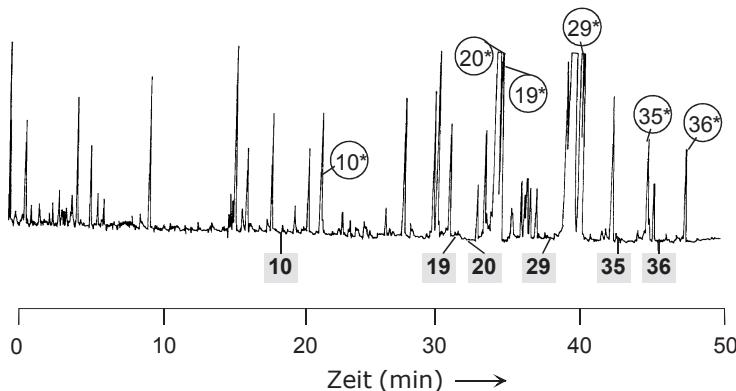


Abb. 15.83 Chromatogramm der CGC einer silylierten Probe.

Kapillarsäule: 21 m · 0,22 mm i.D., imprägniert mit OV 1, Detektion: FID [16].

15.9.2.2 Kapillargaschromatographie - Massenspektrometrie

Als Beispiel für eine massenspektrometrische Identifizierung eines Fettsäuremethylesters nach der GC-Analyse an der OV1-Kapillare dient Peak 36 (Abbildung 15.82). Nach der GC-MS [28] konnte die Komponente an Hand ihrer charakteristischen Fragmente (Abbildung 15.84) als 2-Hydroxy-11,12-methylenstearinsäuremethylester identifiziert werden [16]. Derartige Cyclopropanfettsäuren fragmentieren in vergleichbarer Weise wie monounsgesättigte Fettsäuremethylester.

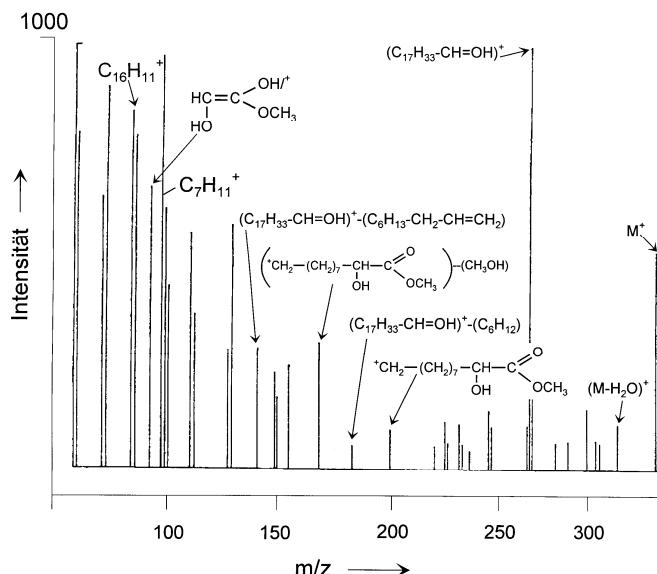


Abb. 15.84 MS-Spektrum, 2-Hydroxy-11,12-methylenstearinsäuremethylester.

15.10 Enzyme thermophiler Mikroorganismen

Extremophile Mikroorganismen sind befähigt, unter außergewöhnlichen Umweltbedingungen zu existieren. Beispielsweise können verschiedene *Bacillus*-stämme sowohl in stark sauren ($\text{pH}=1\text{--}2$) als auch stark basischen ($\text{pH}=9\text{--}11$) Milieus leben. Besonders interessant sind thermophile Mikroorganismen [1-3], die in heißen terrestrischen oder aquatischen Systemen vorkommen. Jene werden nach gemäßigt thermophilen Mikroorganismen, deren Wachstumstemperatur zwischen 40 und 75°C liegt, extrem thermophilen (60–80°C) und hyperthermophilen Mikroorganismen (80–110°C) unterschieden.

Während die extrem thermophilen Mikroorganismen meist in heißen Quellen wie **Gey-Sirenen**, Überlaufwässern von Kraftwerken, schwelenden Kohlenhalden oder in normalen Wasserheizungsanlagen angesiedelt sind, werden hyperthermophile Mikroorganismen in Gebieten und Quellen vulkanischen Ursprungs gefunden. Dazu gehören festländische Solfatarenfelder (Austrittsstellen von schwefelwasserstoffhaltigen Wasserdämpfen mit Temperaturen um 100–200°C) sowie untermeerische hydrothermale Quellen und Heißwasserkamine (mineralhaltiges, bis zu 400°C heißes Wasser) in der Tiefsee.

Im allgemeinen beginnen Proteine bereits ab 40 oder 50°C zu denaturieren. Zellbestandteile von thermophilen Mikroorganismen wie Enzyme (Proteine), Nucleinsäuren oder Lipidmembranen bleiben selbst bei Temperaturen um 100°C noch unverändert. Die Phänomene dieser Thermostabilität sind in ihrer Gesamtheit noch nicht restlos aufgeklärt. Eine Ursache ist die Stabilisierung der doppelhelicalen Struktur in der DNA durch vermehrte Wasserstoffbrücken-Bindungen. Diese werden auf einen höheren Anteil von Desoxyguanin und -cytosin der DNA im Vergleich zu anderen bzw. gemäßigt thermophilen Mikroorganismen zurückgeführt. Auch hohe intrazellulare Salzgehalte werden mit einer Stabilisierung der DNA-Doppelstränge in Verbindung gebracht. Hinzu kommt die Präsenz von *Histonen* und *Gyrasen*, die eine stabilisierende superhelicale Verdrillung der DNA bewirken und ihr frühes Schmelzen verhindern.

15.10.1 Isolierung der Enzymfraktionen

Zuerst erfolgt die Selektion von zwei thermophilen *Bacillus*-stämmen (*Bacillus stearothermophilus* TP 26 und 32), die zur mikrobiellen Synthese einer thermostabilen Protease und β -Galactosidase eingesetzt werden.

Die Protease wird in einem kontinuierlichen Fermentationsprozess als extrazelluläres Enzym hergestellt. Die zur Aufarbeitung der Enzyme notwendigen und hier praktizierten Schritte (s.a. präanalytische Methoden in Kapitel 3.3) und [4]) sind in Abbildung 15.85 zusammengefasst aufgeführt [3]. Zur Isolierung der β -Galactosidase, die als intrazelluläres Enzym synthetisiert wird, ist ein zusätzliches Aufbrechen der Bakterienzellwände mit Hilfe von Lysozym erforderlich.

Beide Enzyme können nach der Aufarbeitung mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (IEC, [5-7]) und/oder mittels SEC [8-18] gereinigt werden.

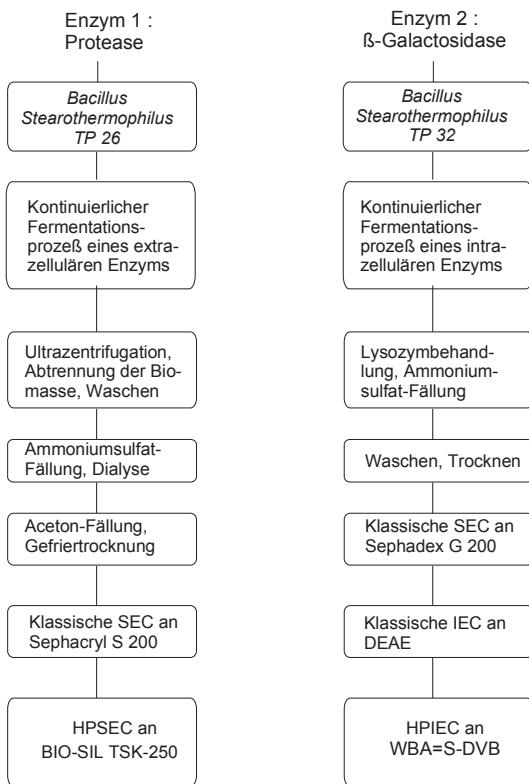


Abb. 15.85 Aufarbeitung für thermostabile Proteasen und β-Galactosidase

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität in den mikropräparativ isolierten Protease-Fraktionen erfolgt nach dem Azocasein-Abbau [17]. Grundlage dieser Bestimmung ist die Absorptionsmessung der in Trichloressigsäure gelösten Abbauprodukte bei 440 nm mittels UV/VIS-Spektroskopie (s. Abschnitt 10.1).

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms β-Galactosidase basiert auf der hydrolytischen Spaltung von o-Nitrophenol-β-D-galactosid (ONPG) in Galactose und o-Nitrophenol (s.a. Abbildung 15.86). Dabei wird die Absorption des Spaltproduktes o-Nitrophenol bei 420 nm gemessen, die als Maß für die Enzymaktivität dient.

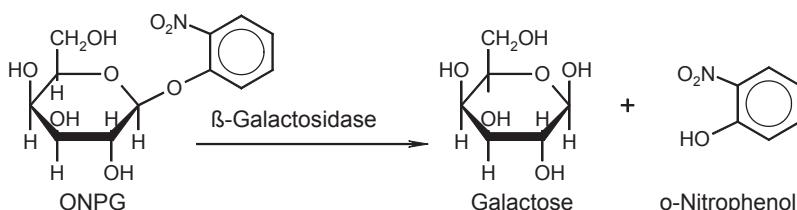


Abb. 15.86 Enzym-Assay für β-Galactosidase

Aus der Proteinkonzentration (mg/ml) und der Enzymaktivität können spezifische Aktivitäten (U/mg) und Reinigungsfaktoren für jeden Aufarbeitungsschritt ermittelt werden [3].

15.10.2 Biochromatographie

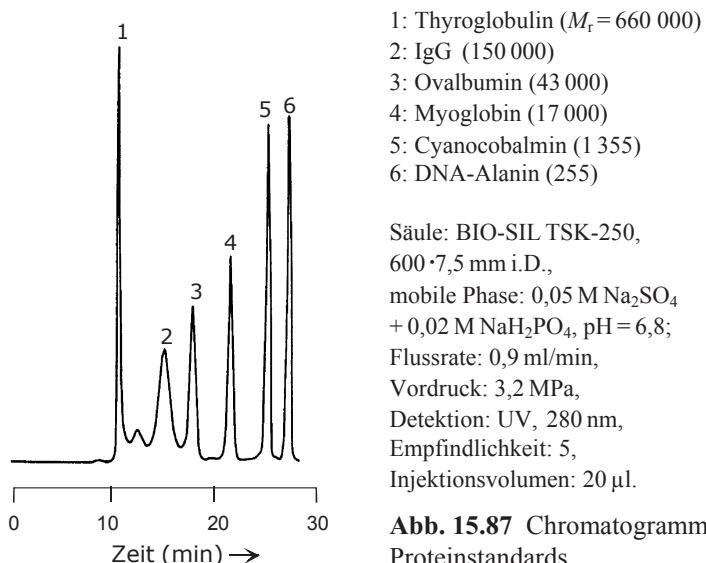
In der Biochromatographie (s. Abschnitt 5.3) werden hydrophile stationäre Phasen eingesetzt, die die Reinigung von Enzymen unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität weitestgehend garantieren.

Die Endreinigung der Enzymextrakte einer thermostabilen β -Galactosidase und Protease erfolgt mittels HPIEC bzw. HPSEC („High-performance“ *ion-exchange chromatography* bzw. *size-exclusion chromatography*).

Die Größenausschlusschromatographie kann auch zur groben Abschätzung des Molekulargewichtes (M_r) mit Hilfe einer Eichkurve (Auftragen des Retentionsvolumens gegen M_r) herangezogen werden. Diese SEC-Methode (Abschnitt 5.3.2) basiert auf dem Vergleich der Retentionsdaten von Standardproteinen (Abbildung 15.87) mit den von mikropräparativ isolierten Proteinfraktionen, die die enzymatische Aktivität enthalten.

Das Chromatogramm in Abbildung 15.88 zeigt die SEC-Trennung des Rohpräparates der thermostabilen Protease mit Protein- und Aktivitätskurve. Die Zusammensetzung der Proteinfraktion ist noch sehr komplex.

Als „Verunreinigungen“ werden vor allem Proteine des niedermolekularen Bereichs registriert. Die Hauptenzymaktivität liegt in der Fraktion zwischen der 28. und 29. Minute.



Nach erneuter SEC-Trennung dieser Fraktion (Rechromatographie) unter identischen Elutionsbedingungen resultiert das in Abbildung 15.89 dargestellte Chromatogramm. Durch Vergleich mit den Elutionsvolumina der Proteinstandards konnte ein Molekulargewichtsbereich um 17 000 Da abgeschätzt werden [3].

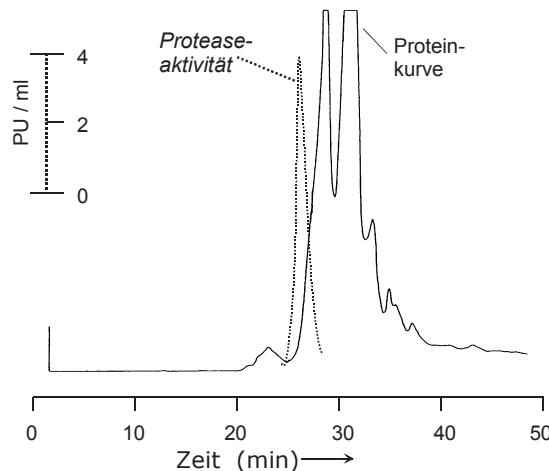


Abb. 15.88 Chromatogramm mit Aktivitätskurve des Rohextraktes einer thermostabilen Protease

Trennsäule: BIO-SIL TSK-250, 600 · 7,5 mm i.D., mobile Phase: 0,05 M Na₂SO₄ + 0,02 M NaH₂PO₄, pH = 6,8, Flussrate: 0,7 ml/min, Vordruck: 2,5 MPa, Detektion: UV, 280 nm, Empfindlichkeit: 5, Injektionsvolumen: 200 µl.

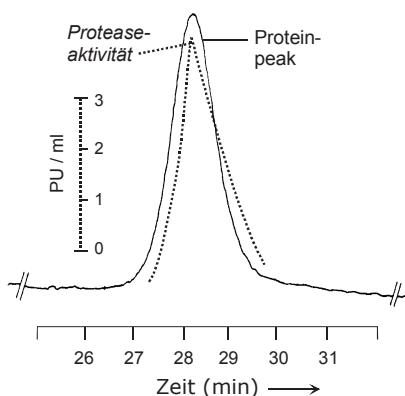


Abb. 15.89 Chromatogramm der „Rechromatographie“. Protease-Fraktion, die zwischen der 28. und 29. Minute isoliert wurde (vgl. Abbildung 15.88).

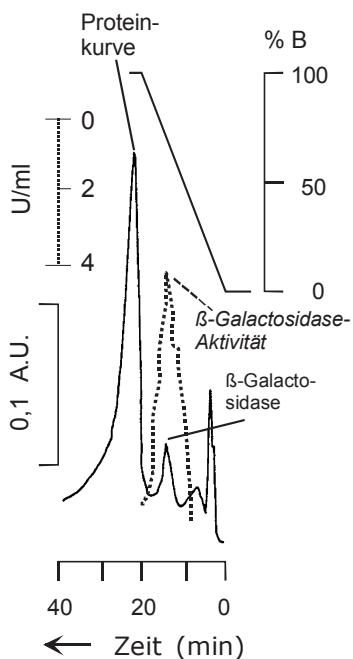


Abb. 15.90 Chromatogramm mit Aktivitätskurve eines gereinigten Extraktes der β -Galactosidase

Glassäule: 150 · 8 mm i.D.,
stationäre Phase: WBA=S-DVB,
 $d_p = 10\text{--}29 \mu\text{m}$,
mobile Phase: **A:** 0,05 M Na_2SO_4
+ 0,02 M NaH_2PO_4 + 2 mM EDTA,
 $\text{pH} = 6,8$;
B: A + 1 M NaCl,
Flussrate: 3 ml/min,
Vordruck: 3 MPa,
Detektion: UV, 254 nm,
Injektionsvolumen: 250 μl .

Eine exaktere Bestimmung von M_r sowie die Reinheitsprüfung der Enzymfraktion erfolgt jedoch in der Regel mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 5.1.4). Die genaueste Methode zur Ermittlung des Molekulargewichtes ist heute die MALDI-MS (Abschnitt 11.7).

Ziel der folgenden Untersuchungen ist jedoch, eine ausreichend gute Reinigung und mikropräparative Isolierung der thermostabilen Enzyme zu erreichen, um Nachweise für ihre Stabilität zu erhalten.

Zur Feinreinigung der thermostabilen β -Galactosidase dient die Ionaustausch-chromatographie. Das resultierende HPLC-Chromatogramm an einem schwach basischen Anionenaustauscher auf Styren-Divinylbenzen-Basis (WBA=S-DVB) zeigt eine gute Abtrennung der β -Galactosidase von vielen anderen Proteinen (s. Abbildung 15.90). Die β -Galactosidase ist auch enzymatisch aktiv, obwohl sie mit einer relativ hydrophoben stationären Phase, die eine Denaturierung dieses Enzyms bewirken kann, chromatographiert wird.

Mit diesem Trennsystem konnten ausreichende Enzymmengen mikropräparativ isoliert und für weiterführende Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms unter extremen Bedingungen eingesetzt werden.

In Abbildung 15.91a ist die Abhängigkeit der β -Galactosidase-Aktivität von der Natriumchloratkonzentration dargestellt. Eine Menge von 1 mg Enzympräparat wird in 1 ml NaCl ansteigender Molarität (1–5 M) gelöst.

Bis zu einer Konzentration von 3 M NaCl bleibt der Recovery-Wert für die β -Galactosidase-Aktivität annähernd 100%. Erst danach wird ein signifikanter Abfall registriert. Zur Bestimmung des Temperatuoptimums für die gereinigte thermostabile β -Galactosidase werden 1-mg-Mengen des Enzympräparates mit 1 ml Tris-HCl-Puffer (pH = 7) gemischt und ihre Enzymaktivität im Bereich von 20 und 100 °C bestimmt. Bei einer Temperatur von 75 °C beträgt die β -Galactosidase-Aktivität nahezu 100%, während bei 80 °C bereits ein deutlicher Aktivitätsabfall zu verzeichnen ist (Abbildung 15.91b).

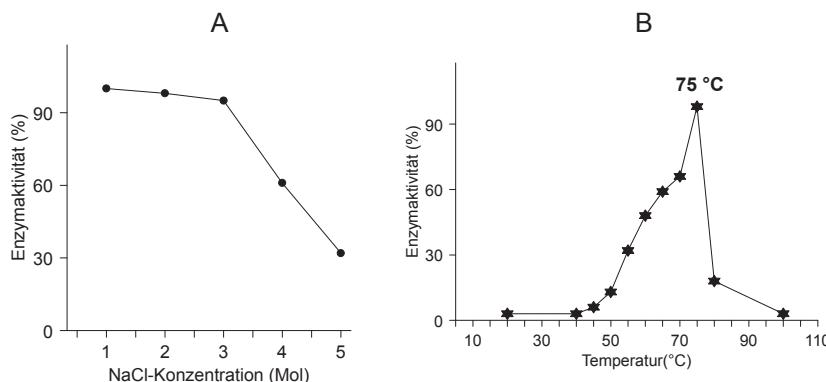


Abb. 15.91 Abhängigkeit der β -Galactosidase-Aktivität von der NaCl-Konzentration (A: 1–5 M) und der Temperatur (B: 20–100 °C).

15.11 Nucleotide in Geweben und von DNA-Spaltprodukten

Eine kurze Einführung zum strukturellen Aufbau von Nucleinsäuren (DNA, RNA) und Nucleotiden erfolgte im Abschnitt 2.2. HPLC- und CE-Trennungen von Nucleobasen und Nucleosiden waren Gegenstand einiger Applikationen in Abschnitt 16.6. Innerhalb der Bezeichnung DNA-Spaltprodukte werden Polynucleotide wie DNA-Restriktionsfragmente, PCR-Produkte und weitere DNA-Moleküle eingeordnet. Man unterscheidet auch zwischen Nucleosidtriphosphaten (ATP, GTP), Nucleosiddiphosphaten (ADP, GDP) und Nucleosidmonophosphaten (AMP, GMP), die als Nucleotide bezeichnet werden.

Die Analytik von einzelnen Nucleotidbausteinen und von (größeren) DNA-Molekülen spielt in der modernen Biotechnologie (Molekularbiologie, Gentechnik) eine zentrale Rolle. Zu den neuen Techniken gehören u.a. die Restriktionsanalyse [1] und Genklonierung [2], die Polymerasenkettenreaktion (vgl. Abschnitt 2.2.4, [3, 4]) und die DNA-Sequenzierung [5, 6], das Arbeiten mit transgenen Pflanzen [7, 8] und transgenen Tieren [9] sowie die Gendiagnose [10, 11] und Gentherapie [13].

Weitreichende Erkenntnisse für die Charakterisierung und erfolgreiche Behandlung von Krankheiten, insbesondere von Erbkrankheiten, werden durch das bereits vollendete *human genome project* (HGP) erwartet [14, 15].

Für das vertiefte Verständnis der wissenschaftlichen Prinzipien der Gentechnik und der Funktionsweisen der modernen molekularbiologischen Methoden wird auf die zahlreich vorhandene Spezialliteratur verwiesen [16, 17].

Die am häufigsten und erfolgreichsten angewandte Trennmethode in der Nucleinsäureanalytik ist die Gelelektrophorese [18, 19]. Für dieses Flachbettverfahren werden als Trennmedien Agarose und Polyacrylamid eingesetzt. Zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Molekülen dienen Tris-Acetat- oder Tris-Borat-Puffer. Diesen wird meist Ethidiumbromid zugesetzt, um die Trennung der DNA-Produkte auf dem Gel zu verfolgen und am Ende zu detektieren. Dabei treten die planar angeordneten aromatischen Ringe des Ethidiumbromids mit den heteroaromatischen Ringen der Nucleobasen in Wechselwirkung. Die Detektion basiert auf der Anregung der entstandenen Komplexe durch eingestrahltes UV-Licht (λ : ca. 250–350 nm) und dem Emissieren und Registrieren von farbigem Licht im sichtbaren Bereich um 590 nm.

Für weitere Untersuchungen der DNA-Fragmente erfolgt ihre Überführung von der Gelmatrix auf eine Membran, die aus Nylon oder Nitrocellulose (E. Southern, 1975) besteht. Dies wird als Nucleinsäure-Blotting (Southern-Blot) bezeichnet [20]. Der sich anschließende empfindliche Nachweis der DNA-Moleküle erfolgt durch die Technik der Hybridisierung, bei der zuerst die Nucleinsäure-Ketten bei einer Temperatur von 60–70°C getrennt (inkubiert) werden. Danach hybridisieren die komplementären Sequenzen der DNA-Abschnitte mit den markierten DNA-Sonden auf der geplotteten Membran [16, 17].

Strukturanalytische Methoden wie die Massenspektrometrie (Kapitel 11; [21, 22]) und die MALDI-MS (11.7; [23, 24]) gehören zu den Methoden der Wahl.

Zu Beginn dieser Entwicklung um 1990 standen der Detektion von Nucleinsäure-Komponenten noch ihre starke Tendenz zur Ausbildung von Fragmentionen entgegen. Die Einführung neuer organischer Matrices in der MALDI-MS sowie die Kombination mit geeigneteren Laserwellenlängen im IR- und UV-Bereich ermöglichen heute die Analyse von intakten DNA-Molekülen. Als Kombinationen der Matrices und Laserwellenlängen dienen z.B. Bernsteinsäure ($\lambda=2,94\text{ }\mu\text{m}$) oder 3-Hydroxypikolinsäure ($\lambda=337\text{ nm}$).

Auch die Kapillarelektrophorese [25–28] gehört zu den bioanalytischen Methoden, die auf Grund ihrer hohen Trenneffizienz und der enormen Peakkapazität viele potentielle Möglichkeiten innerhalb der DNA-Analytik besitzt.

Im Mittelpunkt der analytischen Trennmethoden steht weiterhin die HPLC, die durch die Verfügbarkeit unterschiedlicher Trennsysteme (SEC, IEC IPC, RP) eine breite Anwendung in der Aufarbeitung und analytischen Charakterisierung von DNA-Molekülen [29–34] findet. Gegenstand dieses Applikationsabschnittes ist die Darstellung einiger Trennungen von DNA-Molekülen bzw. DNA-Restriktionsfragmenten mit der Kapillargelelektrophorese (CGE, s. Kapitel 8.4.3.2 und 15.11.2) und mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie (IPC, s. Kapitel 5.2.4 und 15.11.1).

15.11.1 Ionenpaarchromatographie

Die signifikanten Unterschiede im flüssigchromatografischen Verhalten der Nucleotide [29-34] im Vergleich zu den kleineren Biomolekül-Species Nucleobasen und Nucleoside wurden im Abschnitt 15.6 herausgestellt und diskutiert.

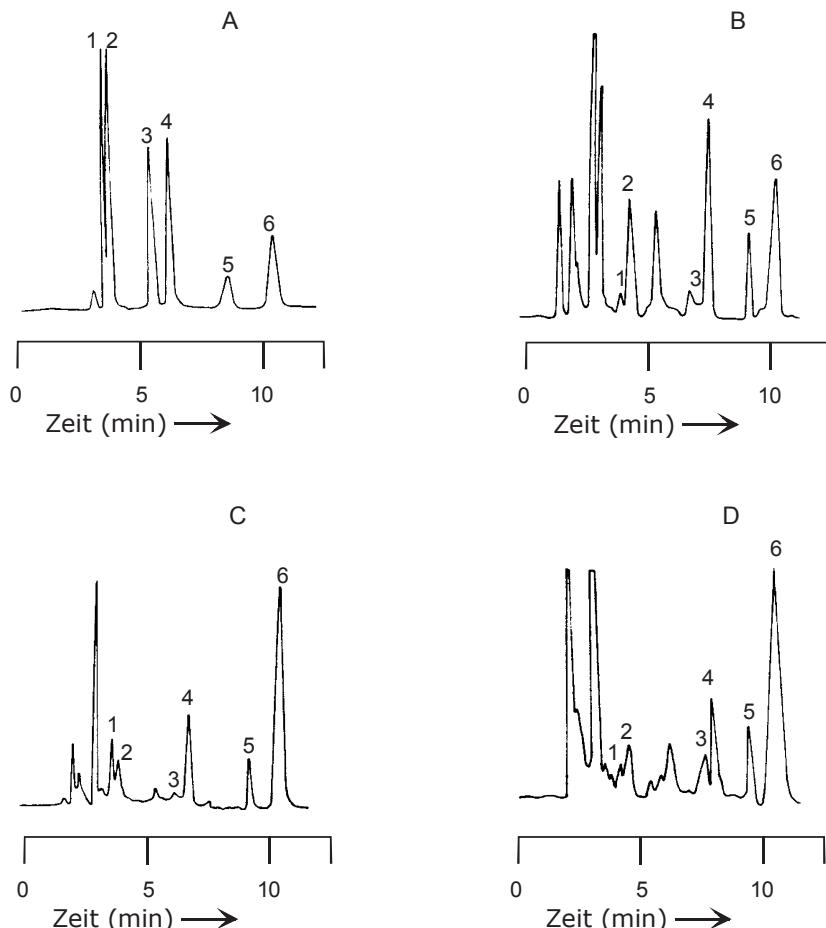


Abb. 15.92 Chromatogramme von Nucleotiden aus verschiedenen von Tumoren befallenen Geweben aus Mäusen.

A: Modellsubstanzen, B: Leber, C: Erythrozyten, D: Skelettmuskulatur.

1: GMP + IMP, 2: AMP, 3: GDP, 4: ADP, 5: GTP, 6: ATP,

Säule : 100 · 8 mm i.D., stationäre Phase: RP, 5 µm (Nova Pak C₁₈-Kartusche), mobile Phase: 10 mM NH₄H₂PO₄, + 2 mM PIC-Reagenz A (Tetrabutylammoniumphosphat) + 20% ACN, Detektion: UV, 254 nm.

Mit freundlicher Genehmigung von T. Grune [33].

Chromatographische Trennungen von Nucleotiden erfolgen mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie [30], für die sowohl schwach als auch stark basische Anionenaustauscher eingesetzt werden (s. Abschnitte 5.2.2 und 5.3.3).

Die RP-Chromatographie ist weniger für die Trennung der Nucleotidmoleküle geeignet, da die negativ geladenen Phosphatgruppen stärkere hydrophile als hydrophobe Wechselwirkungen gestatten.

Fügt man jedoch in der RP-Chromatographie der mobilen Phase Ionenpaar-Reagenzien [31-34] wie Tetrabutylammoniumphosphat hinzu, werden DNA-Moleküle wie Adenosinmono-, Adenosindi- und Adenosintriphosphate auf diesen Säulen retardiert und gut voneinander getrennt, wie an Hand von verschiedenen Modellsubstanzen im Chromatogramm A in Abb. 15.92 dargestellt ist.

Die qualitativen und quantitativen Bestimmungen derartiger Nucleinsäurekomponenten in Extrakten aus Organen bzw. Geweben, die vom Befall mit Tumoren und deren weiteren Ausbreitung betroffen sind, stellen ein wichtiges Applikationsgebiet innerhalb der biomedizinischen Forschung [32, 33] dar.

Besonders hohe Gehalte an ATP und GTP werden in wachsenden Tumorgeweben gefunden, während die Verringerung von ATP auf Grund von Alterungsprozessen eintritt.

Die anderen Chromatogramme in Abbildung 15.92 zeigen die Nucleotidtrennung von ausgewählten biologischen Extrakten aus der Leber (B), den Erythrozyten (D) und der Skelettmuskulatur (C) während der Phase des Tumorwachstums.

15.11.2 Kapillargelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Adaptation der experimentellen Bedingungen der herkömmlichen Gelelektrophorese auf Kapillaren mit sehr kleinen Innendurchmessern (ca. 50–100 µm) führt zur Methode der Kapillargelelektrophorese (CGE, s. a. Abschnitt 8.4.3.2). Das Ziel und die experimentellen Bestrebungen sind die Herstellung von stabilen und effizienten mit Gelen (Polyacrylamid) gefüllten Kapillaren für schnelle und reproduzierbare Trennungen der DNA-Moleküle.

In Abbildung 15.93 ist eine hochaufgelöste CE-Trennung von DNA-Restriktionsfragmenten an einer mit Polyacrylamid (3% T, 0,5% C) gefüllten Kapillare in ca. 18 Minuten dargestellt. Diese Fragmentfraktion besteht aus ϕ X174 DNA, die mit dem Restriktionsenzym *Hae* III gespalten wurde, sowie den Vektoren pB322 DNA und M13mp18 DNA, die beide mit *Eco*R I gespalten wurden.

Die Spaltfraktion ϕ X174 setzt sich aus 11 Fragmenten mit Basenpaaren im Bereich von 72 bis 1 353 zusammen. Die Spaltprodukte von pB322 und M13mp18 bestehen aus einzelnen Fragmentpeaks mit einer Größe von 4 363 bzw. 7 250 Basenpaaren.

Grundlage der Peakidentifikation sind die mittels Gelelektrophorese getrennten und isolierten DNA-Fragmente, die den Proben für die CE zugemischt werden.

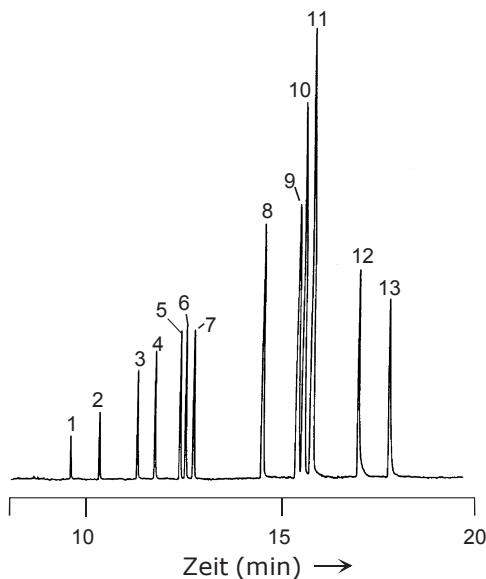


Abb. 15.93 Elektropherogramm von DNA Restriktionsfragmenten bestehend aus fX174 DNA (gespalten mit Hae III) sowie pB322 und M13mp18 (beide gespalten mit EcoR I).

CE-Bedingungen: Fused-Silica-Kapillare: 40 (30) cm · 75 µm i.D., gefüllt mit Polyacrylamid (3% T, 0,5% C); Puffer: 100 mM Tris-Borat-Puffer, pH = 8,3 + 2 mM EDTA, λ : 260 nm, E: 250 V/cm, I: 12,5 µA, Injektion: elektrophoretisch bei 10 kV für 0,5 s.

1: 72, 2: 118, 3: 194, 4: 234, 5: 271, 6: 281, 7: 310, 8: 603, 9: 872, 10: 1978, 12: 4363, 13: 7253. Mit freundlicher Genehmigung von B. Karger [26].

Im folgenden Elektropherogramm (Abbildung 15.94) sind Trennungen von DNA-Restriktionsfragmenten mit bis zu 12 000 Basenpaaren dargestellt. Die kapillargelelektrophoretische Analyse zeigt die schnelle Trennung von Basenpaaren einer DNA-Reihe, die durch einen Abstand von ca. 1 000 Basenpaaren zwischen den einzelnen Peaks gekennzeichnet ist. Es werden Basenpaare um ca. 1 000, ca. 2 000 bis ca. 12 000 registriert.

Die weiteren Fragmentpeaks im Bereich von 75 bis 1 636 Basenpaaren resultieren von der enzymatischen Spaltung des Klonierungsvektors, der für die Präparation dieser Probe verwendet wird.

Auch hier erfolgt die Zuordnung der Peaks im Elektropherogramm mit Hilfe der aus der herkömmlichen Gelelektrophorese isolierten DNA-Fragmente. Um die hohe Trenneffizienz und Peakkapazität gel gefüllter Kapillaren für die Trennung noch größerer Reaktionsprodukte aus der DNA-Sequenzierung zu verdeutlichen, wird die einsträngige M13mp18 DNA als Templat utilisiert. Als Primer dient JOE-Prm18.1 und die Reaktionsführung erfolgt unter Standardbedingungen [27].

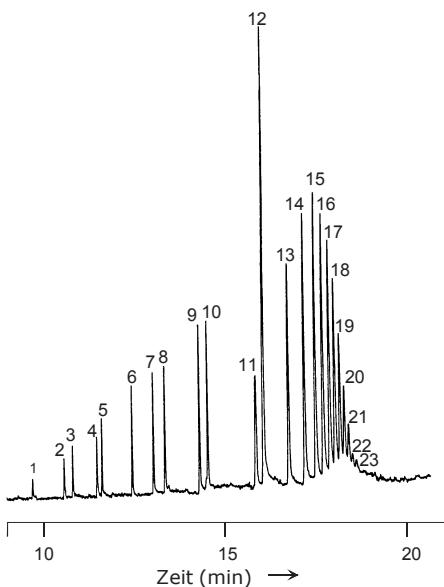


Abb. 15.94 Elektropherogramm einer 1 000-Basenpaar DNA-Reihe

CE-Bedingungen: wie in Abbildung 15.93.

1: 75, 2: 142, 3: 154, 4: 200, 5: 220, 6: 298, 7: 344, 8: 194, 9: 506, 10: 516, 11: 1018, 12: 1635, 13: 2036, 14: 3054, 15: 4072, 16: 5090, 17: 6108, 18: 7126, 19: 8144, 20: 9162, 21: 10180, 22: 11198, 23: 12216. Mit freundlicher Genehmigung von B. Karger [26].

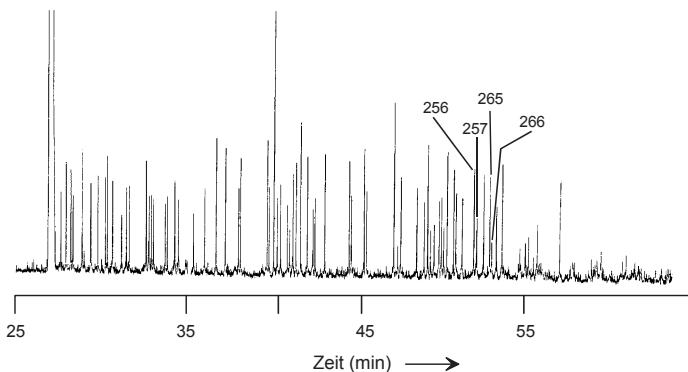


Abb. 15.95 Elektropherogramm der Reaktionsprodukte einer Sequenzierung

Templat: einzelsträngige M13mp18 Phagen DNA,

Primer: JOE-PRM18.1 = 5'-JOE-TCCCAGTCACGAC-GTTGT-3',

dC Reaktion: Verlängerung des Primers durch Sequenase 2.0 in Anwesenheit von ddCTP.

CE-Bedingungen: Fused-Silica-Kapillare: 65 (50) cm · 75 µm i.D., gefüllt mit Polyacrylamid (3% T, 5% C); Puffer: 100 mM Tris-Borat-Puffer, pH = 8,0 + 2,5 mM EDTA + 7 M Harnstoff, λ: 260 nm, E: 350 V/cm, Injektion: elektrophoretisch bei 10 kV für 15 s. Mit freundlicher Genehmigung von B. Karger [27].

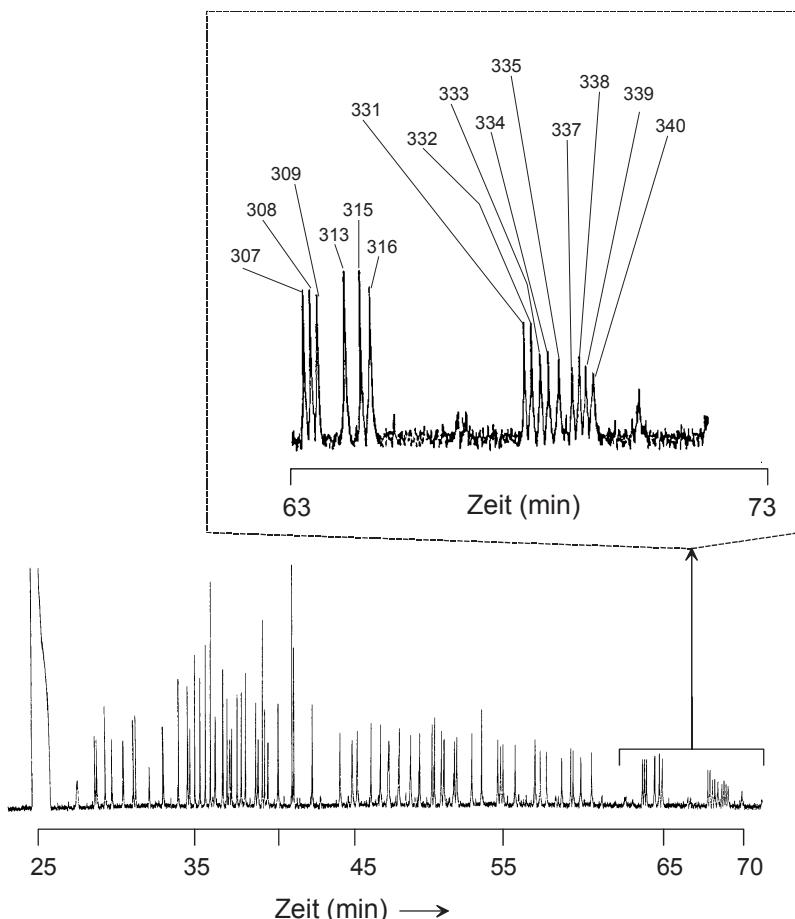


Abb. 15.96 CE-Trennung der Reaktionsprodukte einer Sequenzierungsreaktion.

Templat: einzelsträngige M13mp18 Phagen DNA,
 Primer: JOE-PRM18.1 = 5'-JOE-TCCCAGTCACGAC-GTTGT-3',dT Reaktion:
 Verlängerung des Primers durch Sequenase 2.0 in Anwesenheit von ddTTP.
 CE-Bedingungen: Fused-Silica-Kapillare: 92 (75) cm · 75 µm i.D., E: 310 V/cm,
 weitere Bedingungen wie in Bild 10.11. Mit Genehmigung von B. Karger [27].

Das Elektropherogramm der Reaktionsprodukte, die in Anwesenheit von ddCTP erhalten werden, ist in Abbildung 15.95 dargestellt. Innerhalb von ca. 60 Minuten wird eine beachtlich große Anzahl von Fragmentpeaks registriert, die auf der Basis der bekannten Sequenz des Vektors M13mp18 identifiziert werden. Die Analyse zeigt, dass für die Fragmente 256-257 und 265-266 Basislinientrennungen erzielt werden. Es wird deutlich, dass die Fragmente, die sich immer durch eine einzige Base unterscheiden, bis zu einer Größe von 300 getrennt werden können.

Das Elektropherogramm der Reaktionsprodukte, die in Anwesenheit von ddTTP entstehen, zeigt Abbildung 15.96. Es werden Fragmente bis zu 340 Basen in ca. 60 Minuten mit hohem Auflösungsvermögen getrennt. Dieses wird insbesondere aus dem Elektropherogramm-Ausschnitt, der oberhalb von Abbildung 15.96 plaziert ist, deutlich.

Die Fragmentbereiche 331-355 und 337-340 differieren lediglich um eine Base. Die Identifizierung der Peaks erfolgt auch hier an Hand der bekannten Frequenz von M13mp18.

Trotz dieser Fortschritte innerhalb der Kapillargelelektrophorese von DNA-Spaltprodukten ist die Gelelektrophorese im Flachbettverfahren oft die Methode der Wahl für die DNA-Analytik innerhalb der Sequenzierungen der Basen des menschlichen Genoms (s. auch *human genome project*) oder der Charakterisierung von PCR-Produkten der Polymerase-Kettenreaktion.

15.12 Glycan-Strukturen von Glycoproteinen

Wichtige Grundlagen zur Isolierung von Glycoproteinen aus biologischen Membranen sowie zur Freisetzung, Struktur und Verknüpfung von Kohlenhydratkettchen (Glycane bzw. Oligosaccharide) wurden bereits im Abschnitt 2.3 behandelt.

Die Glycanketten von Glycoproteinen setzen sich im wesentlichen aus den Monosaccharid-Species Fucose, Galactose, Glucose, Mannose, *N*-Acetylglucosamin, *N*-Acetylgalactosamin und *N*-Acetylneuraminsäure (s. auch Abbildung 2.44) zusammen.

Durch saure Hydrolyse des gesamten Glycoproteins oder von einzelnen Glycanketten mit Trifluoressigsäure bei ca. 100°C (4 Stunden lang) werden alle Monosaccharid-Species freigesetzt.

Die Verknüpfung von Glycanen mit dem Proteinteil erfolgt durch eine *N*- oder *O*-glycosidische Bindung (s. Abbildungen 2.42 und 2.43). *O*-Glycane sind über *N*-Acetylgalactosamin mit der Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin *O*-glycosidisch verbunden, während die *N*-Glycane über *N*-Acetylglucosamin mit der Amidgruppe der Aminosäure Asparagin verknüpft sind (Abbildung 15.97).

Ziel dieses Abschnittes ist, Möglichkeiten der Charakterisierung (Profilanalyse) und Strukturaufklärung von *N*-Glycanen aufzuzeigen [1, 2]. Die Analytik von *O*-Glycanen ist im Prinzip vergleichbar und kann an Hand weiterer Literatur [3, 4] nachvollzogen werden.

Innerhalb der *N*-Glycane unterscheidet man zwischen Hybrid-, High-Mannose- und Complex-Typ (s. Abbildungen 2.49 bis 2.51). Identisch sind diese *N*-Glycan-Typen hinsichtlich ihrer „inner-core“-Struktur. Diese besteht aus drei Mannosen sowie zwei *N*-Acetylglucosaminen, die beide zusammen ein Chitobiose-Molekül ergeben. An die „inner-core“-Zuckereinheit sind weiterreichende und verzweigte Kohlenhydratketten geknüpft. Diese können für Proteine mit identischer Aminosäurezusammensetzung z.T. sehr unterschiedlich sein. Daraus resultieren verschiedene Eigenschaften und Mikroheterogenitäten der Glycoproteine.

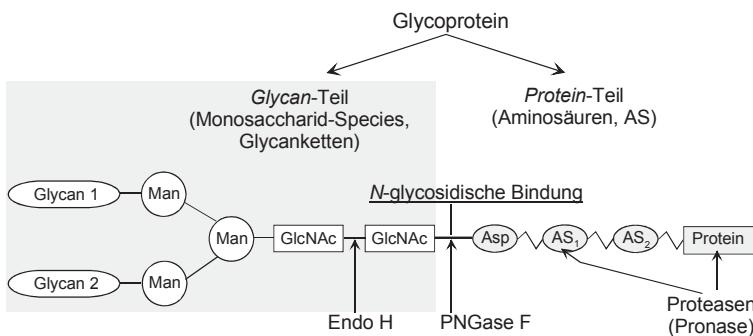


Abb. 15.97 Schematische Darstellung der Glycoproteinstruktur

Das hat Bedeutung für die Herstellung und Anwendung rekombinanter Glycoproteine in der medizinischen Forschung und für therapeutische Zwecke.

Beispielsweise findet Interleukin-2 Anwendung bei der Behandlung von Tumoren und Interferon- β wird zur Therapie von multipler Sklerose eingesetzt. Die Wirksamkeit dieser Glycoproteine, die heutzutage gentechnisch erzeugt werden, setzt eine möglichst identische Glycosylierung im Vergleich zu den ursprünglichen humanen Proteinen voraus.

Die Zusammensetzung der Glycanketten kann durch enzymatische Sequenzierung mit Hilfe spezifischer Glycosidasen (s. Abschnitt 2.3.3 und Tabelle 2.2) erfolgen [5]. Diese Sequenzierung kann auch direkt von entsprechend gereinigten Glycoproteinen durchgeführt werden, ohne dass eine Abtrennung der Glycane vom Proteinanteil erforderlich ist.

Für die Strukturaufklärung der Kohlenhydratkettchen mittels instrumenteller Analysenmethoden werden die Glycanketten unter Erhalt ihres intakten Zustandes meist in automatisierten Verfahren freigesetzt. Dies erfolgt durch Hydrazinolyse (s. Abschnitt 2.3.4) auf chemischem Wege [6] oder enzymatisch mit PNGase F (Abbildung 15.97). Um den spezifischen Angriff dieses Enzyms an der N-glycosidischen Bindung zu erleichtern, wird die Proteinstruktur des Glycoproteins mit Hilfe von Proteasen (partiell) hydrolysiert oder mit Detergenzien zuvor entfaltet. Die Freisetzung von N-glycosidisch gebundenen Oligosacchariden kann auch mit dem Enzym Endo H (Endoglycosidase, s. auch Tabelle 2.2) erfolgen. Die Spaltung erfolgt zwischen den GlcNAc-Molekülen innerhalb der „inner-core“-Einheiten des High-Mannose- und Hybrid-Typs, während entsprechende Strukturen des komplexen Typs nicht angegriffen werden. Somit ist eine selektive „Vorfraktionierung“ dieser N-Glycan-Typen mittels Endo H möglich. Die Menge an isolierten intakten Glycanen, die für eine weitere chromatographische oder elektrophoretische Auf trennung in einzelne Species und deren strukturelle Aufklärung zur Verfügung steht, ist oft äußerst gering. Außerdem enthalten die Monosaccharid-Species keine chromophoren Gruppen, so dass eine Derivatisierung mit intensiv absorbierenden bzw. fluoreszierenden Substanzen wie z.B. 2-Aminobenzamid, 2-Amino(6-amido-biotinyl)-pyridin (s. 2.3.5) erforderlich wird.

Radioaktive Markierungen von Glycan-Molekülen (vgl. Abbildung 2.64) werden auf Grund der Entsorgung des Probematerials zunehmend problematisch.

Die exakte Strukturaufklärung erfordert eine umfangreiche Expertise der Kohlenhydratchemie und ein großes spezialisiertes Arsenal instrumenteller Methoden. Auf Grund dessen kann hier nicht auf alle Methoden und Varianten, insbesondere innerhalb der umfassenden Strukturanalytik, eingegangen werden. Für die bereits länger innerhalb der Glycananalytik etablierten Methoden wie GC-MS- oder NMR-Analysen erfolgt lediglich die Beschreibung der wichtigsten Prinzipien, verbunden mit repräsentativen Hinweisen auf die einschlägige Spezialliteratur.

Demgegenüber werden neue MALDI-PSD-TOF-MS-Technik im Hinblick auf die Fragmentierungsanalyse definierter Kohlenhydratspaltprodukte von *N*-Glycanketten stärker in den Mittelpunkt gestellt (s. Abschnitt 15.12.2.5).

15.12.1 Profilanalysen der Glycane

Nach erfolgter Hydrazinolyse oder enzymatischen Spaltung erfolgt die Aufreinigung der Glycane einschließlich ihrer Abtrennung von den in der Fraktion verbliebenen Peptiden und Proteinen. Dies kann im einfachsten Fall durch Präzipitation und Extraktion (s. Kapitel 3.3) realisiert werden. Meist wird jedoch die klassische (präparative) Größenausschlusschromatographie (SEC), die auch als Gelfiltration (GF) bezeichnet, eingesetzt (s. Abschnitt 5.3.2).

Die weitere Auftrennung bzw. die Erstellung von Glycanprofilen (Verteilung von Mono- und/oder Oligosacchariden) erfolgt meist mit speziellen flüssigchromatographischen Methoden (HPAEC-PAD: *high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*, HPLC mit Diol- oder NH₂-Säulen, FPLC: *fast protein liquid chromatography* mit MonoQ-Säulen, HPSEC: High-performance SEC).

15.12.1.1 Monosaccharid-Mapping mittels HPAEC-PAD

Durch saure Hydrolyse mit TFA werden die komplexen Glycanketten in ihre einzelnen Monosaccharid-Bausteine zerlegt.

Diese können mit Hilfe der sehr empfindlichen und effizienten HPAEC-PAD-Technik (s. Abschnitte 5.2.6 und 15.7.2) bestimmt werden. Abbildung 15.98 zeigt das Chromatogramm einer derartigen Analyse der Monosaccharid-Species, die aus überwiegend *N*-glycosidisch gebundenen Oligosacchariden des Glycoproteins Fetuin stammen [7].

Die saure TFA-Hydrolyse kann zur Zersetzung der *N*-Actylneuraminsäure (NANA) führen. Außerdem werden unter diesen Bedingungen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin zu den korrespondierenden Glucosamin (GlcNH₂) bzw. Galactosamin (GalNH₂) deacetyliert und demzufolge erscheinen diese Verbindungen im Chromatogramm.

Die Monosaccharid-Bausteine werden dabei lediglich summarisch erfasst. Daraus können nur begrenzte Aussagen über die Sequenz der Glycanketten und die Verknüpfung ihrer Monosaccharid-Species abgeleitet werden.

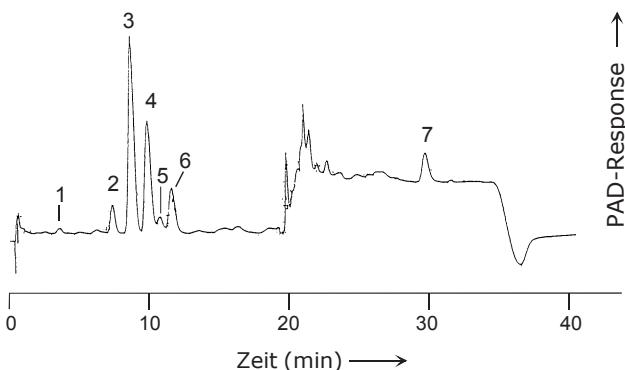


Abb. 15.98 Chromatogramm von Monosaccharid-Species aus Fetiin.

1: Fucose, 2: *N*-Acetylgalactosamin, 3: *N*-Acetylglucosamin, 4: Galactose, 5: Glucose, 6: Mannose, 7: *N*-Acetylneuraminsäure,

Säule: $250 \cdot 4$ mm i.D., stationäre Phase: CarboPak PA 1,

mobile Phase: 19 mmol/l NaOH, Flussrate: 1,0 ml/min,

Detektion: PAD ($E_1 = 50$ mV, $E_2 = 650$ mV, $E_3 = -950$ mV, $t_1 = 300$ ms, $t_2 = 60$ ms, $t_3 = 60$ ms), Injektionsvolumen: 20 μ l.

15.12.1.2 N-Glycan-Trennungen mit speziellen HPLC-Methoden

Die Auswahl einer geeigneten HPLC-Methode (-Säule) richtet sich nach der erforderlichen Selektivität und Empfindlichkeit, die für die entsprechenden *N*-Glycan-analysen notwendig sind.

Mittels FPLC-Technik und Anionenaustauschchromatographie (AEC) an MonoQ-HR-Säulen wird die *N*-Glycan-Fraktion in neutrale und polare (geladene) *N*-Glycan-Strukturen getrennt (Abbildung 15.99). Letztere können in einzelne Gruppen aufspalten, die als Mono-, Di-, Tri- und Tetrasialostrukturen bezeichnet werden. Ob eine nachfolgende Derivatisierung (Markierung) der *N*-Glycane erforderlich ist, hängt u.a. von der verfügbaren Glycanmenge ab.

Unabhängig davon stehen für die weitere Auf trennung der Glycan-Fraktionen spezielle HPLC-Varianten zur Verfügung, die entsprechend optimiert sowohl für derivatisierte als auch unveränderte Glycan-Fraktionen geeignet sind.

Mittels HPSEC [8] werden die Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Dieses Volumen nimmt ein Molekül innerhalb einer Lösung entsprechend seines Molekulargewichtes ein. Die Abbildung 15.87 im Abschnitt 15.10 zeigt eine derartige Trennung von Proteinen mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (s. a. Abschnitt 5.3.2).

An chemisch gebundenen Aminopropylphasen (NH_2 -Säulen, Abschnitt 15.7.1), an Diol-HPLC-Säulen oder mittels Reversed-Phase-Chromatographie (Abschnitt 4.3.2) können weitere Auf trennungen in einzelne Individuen oder spezielle Glycan-Gruppen erfolgen.

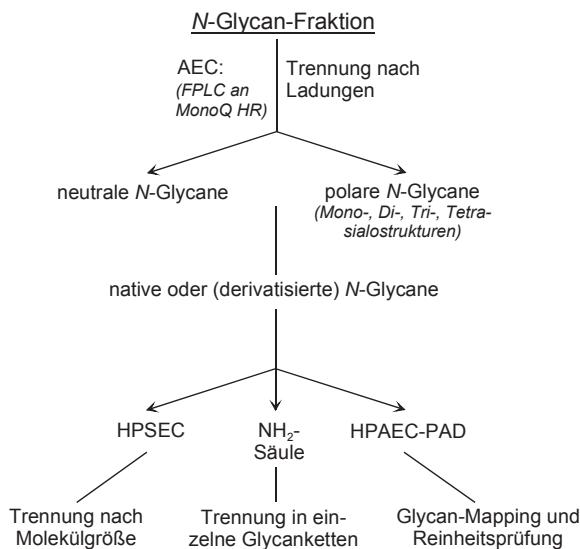


Abb. 15.99 HPLC-Methoden zur Trennung von N-Glycanen

Vor allem die HPAEC-PAD-Methode [9, 10] ist aufgrund ihrer hohen Trenneffizienz und Empfindlichkeit für die Analyse von N-Glycanen (Oligosacchariden) prädestiniert. Ihr Vorteil liegt vor allem darin, dass keine Derivatisierung der Monosaccharid-Species einer Probe erforderlich ist.

Abbildung 15.100 zeigt das Chromatogramm nativer Oligomannosen (Man 5 bis Man 9), die N-glycosidisch an das rhBMP-2-Glycoprotein gebunden sind [11]. Die Freisetzung dieser Oligosaccharide basiert auf der enzymatischen Hydrolyse mit PNGase F. Die Oligomannose 7 spaltet innerhalb dieser Trennung in zwei Peaks auf, deren nähere strukturelle Charakterisierung und Identifizierung in Abschnitt 15.12.2.5 mit Hilfe der MALDI-PSD-TOF-MS erfolgt und diskutiert wird.

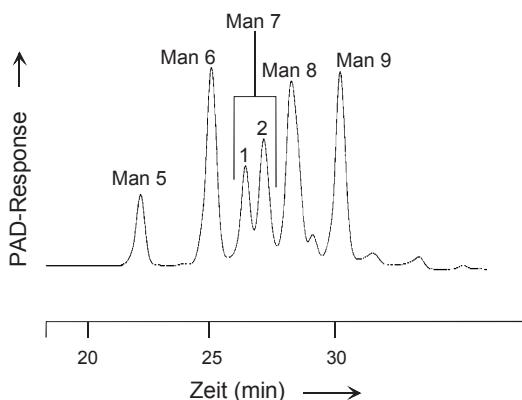


Abb. 15.100 HPAEC-PAD von Oligomannosen [11]

15.12.2 Strukturanalysen der Glycane

Ziel der strukturellen Charakterisierung von Glycanketten, in die auch die Ergebnisse der Profilanalysen einbezogen werden, ist die exakte Ermittlung der Kohlenhydratsequenz für ein Glycoprotein, wie das bereits standardmäßig für die Aminosäuresequenzierung von Proteinen erfolgt.

Die folgende Darstellung gibt einen Überblick zu den wichtigsten strukturanalytischen Methoden, die zur Sequenzierung bzw. Strukturaufklärung von Glycanketten herangezogen werden. Welchen Beitrag sie im einzelnen dafür erbringen, ist im rechten Teil dieser Abbildung kurz aufgeführt und soll in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

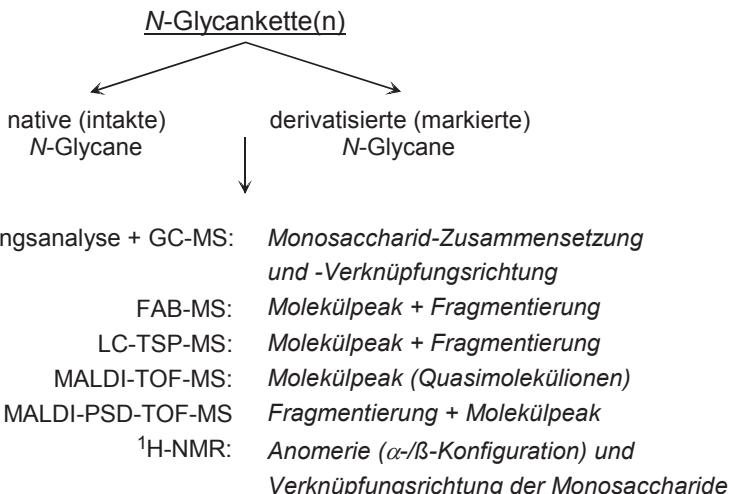


Abb. 15.101 Methoden zur Strukturaufklärung von N-Glycanen

15.12.2.1 GC-MS und Methylierungsanalyse

Gaschromatographische Trennungen mit Kapillaren hoher Trenneffizienz (Kapillargaschromatographie, CGC) ermöglichen nach entsprechender Derivatisierung die gesamte Verteilung an Monosaccharid-Species in einer hydrolysierten Glycan-Fraktion zu ermitteln.

Durch Einbeziehung der Methylierungsanalyse und der Kopplungstechnik GC-MS (s. auch die Abschnitte 8.4.1, 15.9.2.2) können strukturelle Verknüpfungen zwischen den einzelnen Monosaccharid-Species festgestellt werden [12, 13].

Innerhalb der Methylierungsanalyse (s.a. Abbildung 15.102) werden zuerst die freien Hydroxylgruppen der Oligosaccharide (N-Glycane) methyliert. Danach folgt die Hydrolyse der entstandenen Oligosaccharid-Derivate. Die resultierenden Monosaccharid-Species werden reduziert.

Durch beide Reaktionen entstehen wiederum Hydroxylgruppen. Diese werden, um sie von den ursprünglichen Hydroxylgruppen der *N*-Glycane zu unterscheiden, nicht methyliert, sondern acetyliert. Dadurch entstehen sogenannte partiell methylierte Alditolacetate, die im Gegensatz zu den Monosacchariden leicht flüchtige Verbindungen darstellen. In diesem Zustand sind sie der Gaschromatographie bzw. GC-MS-Kopplung gut zugänglich.

Die Identifizierung der einzelnen Species erfolgt durch Vergleich der Retentionzeiten von entsprechenden Referenzsubstanzen, die einzeln synthetisiert wurden. In Kombination mit der Massenspektrometrie können auch an Hand der Fragmentierungsmuster die Identifizierung der Monosaccharid-Bausteine sowie weitere Strukturinformationen über die analysierten *N*-Glycane abgeleitet werden [23, 14].

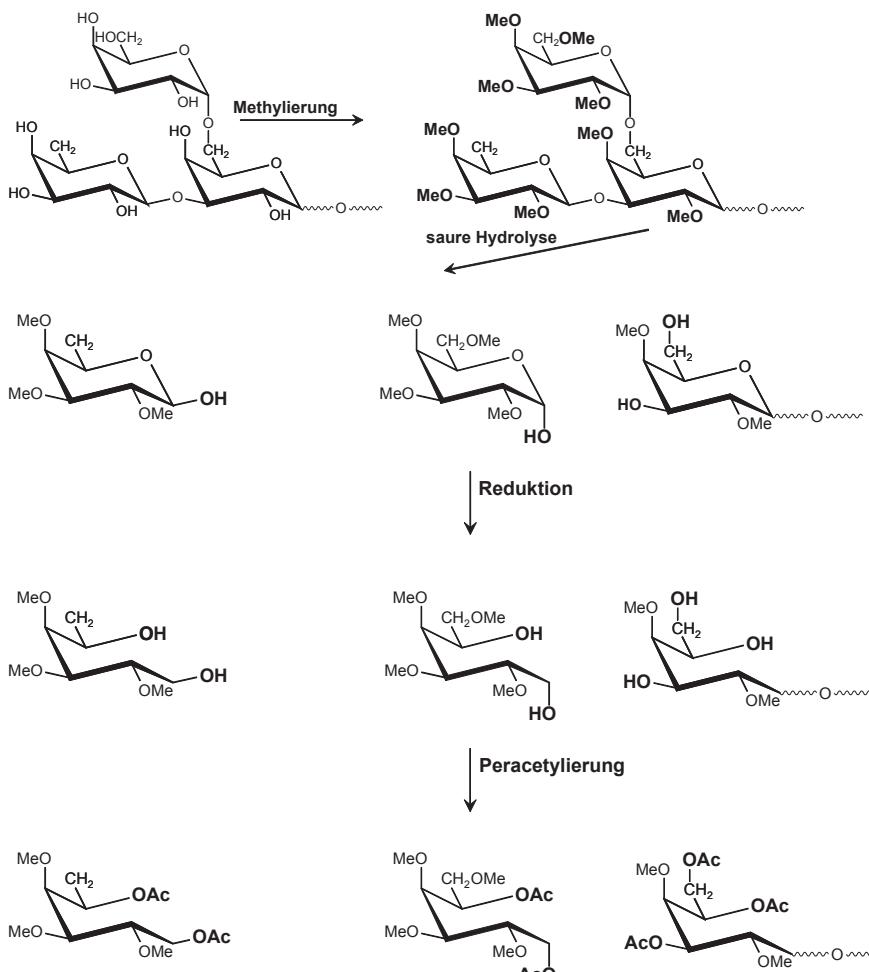


Abb. 15.102 Schema der Methylierungsanalyse

15.12.2.2 Fast-Atom-Bombardement

Die allgemeinen Prinzipien dieser massenspektrometrischen Technik (FAB) wurden einführend im Abschnitt 11.3.3 dargestellt. Die On-line-Kopplung mit der Flüssigchromatographie (LC-FAB-MS) geht aus Abschnitt 12.4.2.1.4 hervor.

Die FAB-MS gehört zu den schonenden bzw. weichen oder „sanften“ Ionisierungsmethoden. Damit können die Molekulargewichte von *N*-Glycanketten ermittelt werden.

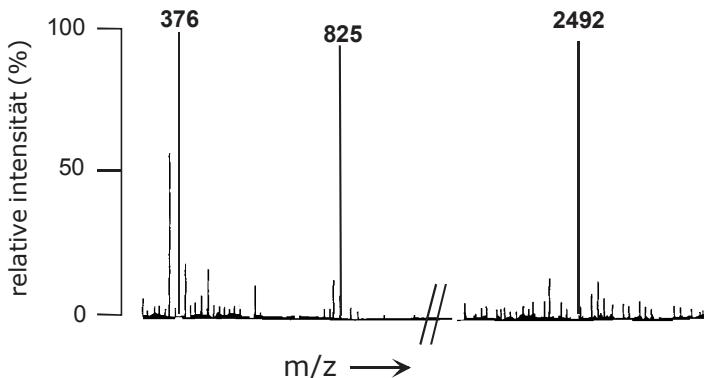
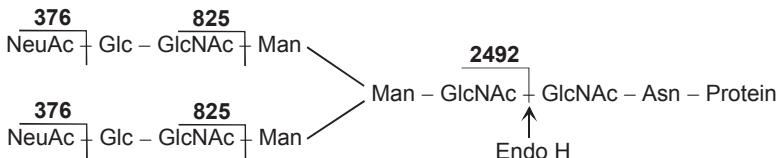


Abb. 15.103 FAB-MS eines disialisierten biantennären Oligosaccharides

Aus dem Fragmentierungsmuster von permethylierten *N*-Glycanen sind einzelne Kohlenhydrat-Bausteine identifizierbar [15, 16].

Als Beispiel dafür dient ein disialisiertes biantennäres Oligosaccharid (siehe Abbildung 15.103, oben). Die *N*-Glycan-Struktur wurde mit der Endoglycosidase Endo H zwischen den Chitobiose-Molekülen gespalten und danach permethyliert.

Im FAB-MS-Spektrum werden von diesem Kohlenhydrat-Molekül charakteristische Fragmentpeaks registriert. Für die abgespaltene methylierte Neuraminsäure [NeuNAc] resultiert ein Massenpeak bei 376 und für die Strukturgruppe [NeuAc-Gal-GlcNAc] eine Masse von 825. Eine Differenzierung dieser Massenpeaks zwischen den beiden Antennen innerhalb der Glycoproteinstruktur ist jedoch nicht möglich. Dafür muss die ¹H-NMR-Spektroskopie (Abschnitt 15.12.2.6) hinzugezogen werden.

15.12.2.3 LC-Electrospray-MS

Die ablaufenden Vorgänge beim Electrospray (ESI) waren bereits Gegenstand der Abschnitte 11.3.6 sowie der LC-MS-Kopplungstechnik in 12.4.2.3 (LC-ESI-MS).

Mit dieser weichen Ionisierungsmethode [17, 18] werden neben dem Molekülpeak (M^+) charakteristische sogenannte Quasimolekülionen bei den Massenzahlen 198,1 [$M + NH_4]^+$ und 378,1 [$2 M + NH_4]^+$ registriert, wie aus dem Massenspektrum von Glucose in Abbildung 15.104 hervorgeht. Eine Differenzierung gegenüber den hinsichtlich des Molekulargewichtes identischen Hexosen Mannose und Galactose ist hier nicht möglich.

Erst die Kopplung von Electrospray-MS mit einer geeigneten Chromatographiesäule (LC-ESI-MS), die eine Separation aller drei Hexosen ermöglicht [16], lässt ihre Identifizierung in zeitlicher Reihenfolge mittels Electrospray zu. Die Basislinien-Trennung dieser drei Hexosen erfolgt mit Hilfe der Ligandenaustausch-Chromatographie an Aminex HPX 87H. Die HPLC-Säule wird bei erhöhter Temperatur (50°C) mit verdünnter Schwefelsäure (0,015 mol/l) eluiert.

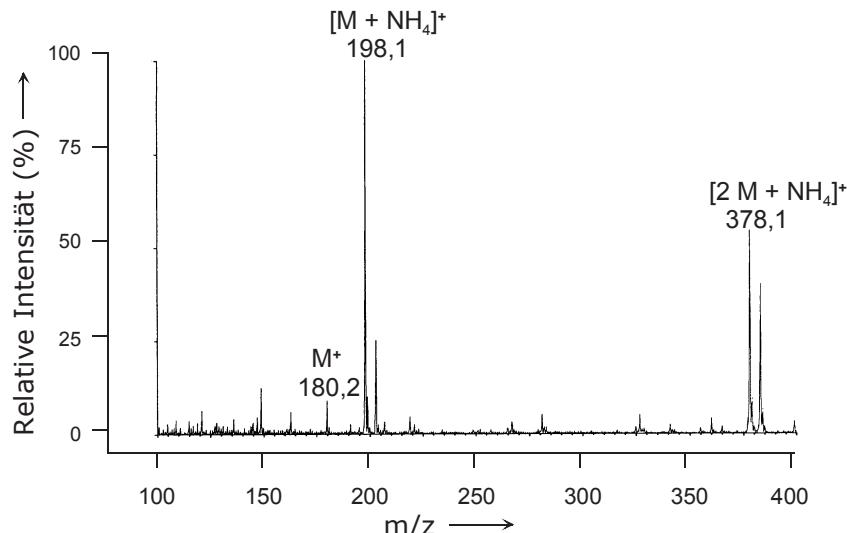


Abb. 15.104 Massenspektrum von Glucose

15.12.2.4 MALDI-TOF-MS

Die Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation–Time of Flight–Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) bezeichnet die schonende Desorption und Ionisierung mittels gepulster Laserstrahlung (LDI) von intakten Biomolekülen wie Proteinen, Nucleotiden, Glycoproteinen, Oligosacchariden unter Verwendung einer organischen Matrix (*matrix-assisted*) in Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF), wie bereits in Abschnitt 11.7 dargestellt wurde.

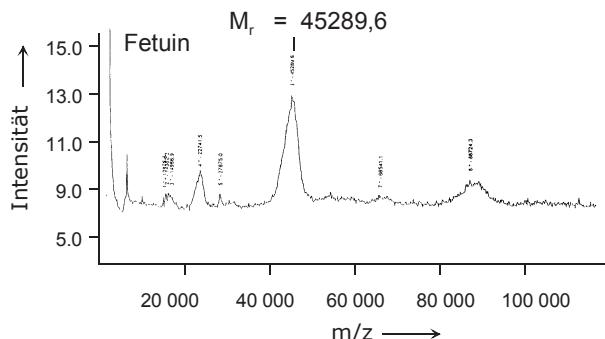


Abb. 15.105 MALDI-MS-Spektrum von Fetuin

Für das ursprüngliche Glycoprotein, das hinsichtlich seiner Glycanstrukturen analysiert werden soll, sind mit dieser Methode Molekulargewichtsbestimmungen möglich, wie an dem Beispiel Fetuin ($M_r = 45\,289,6$ Da) in Abbildung 15.105 gezeigt wird. Die breiten Signalpeaks resultieren aus den Mikroheterogenitäten der Glycoproteine im Vergleich zu nicht oder nur gering glycosylierten Proteinen.

Für Oligosaccharid-Gemische einer homologen Reihe von Glucosabausteinen (Polymerisationsgrad DP 4–18) können mit MALDI-MS [19, 20] die Verteilung der Moleküle und die entsprechenden einzelnen Molekulargewichte ermittelt werden, wie Abbildung 15.106 zeigt. Derartige „Profilanalysen“ komplexer Kohlenhydratproben sind auch mit der HPAEC-PAD-Technik möglich, wie aus der Abbildungen 15.62 und 15.63 im Abschnitt 15.7.2 hervorgeht.

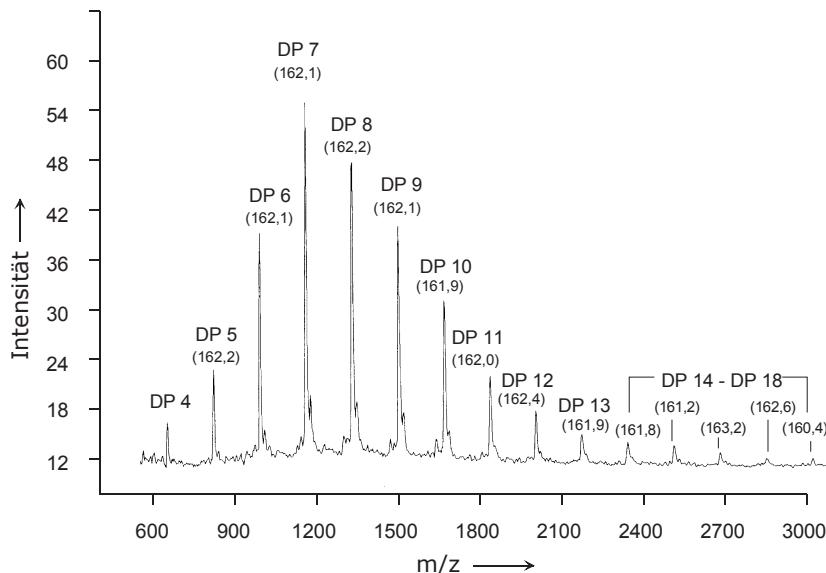


Abb. 15.106 MALDI-MS-Spektrum von Oligosacchariden

15.12.2.5 MALDI-PSD-TOF-MS

Das Prinzip dieser Variante (PSD: *post source decay*) der MALDI-MS-Methode wurde bereits im Abschnitt 11.7 einführend erklärt (s. Abb. 11.28 und 11.29).

Neben intakten Molekülien bzw. Quasimolekülien, die mit der herkömmlichen MALDI-Technik in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer (Linear-TOF) registriert werden, entstehen innerhalb der Beschleunigungsstrecke außerdem metastabile Fragmentierungen der Molekülien (PSD-Ionen). Bei diesem Zerfall der Molekülien werden geladene und neutrale Fragmentionen gebildet, die nur mit Hilfe eines Reflektor-TOF-Gerätes registriert werden können (s. Abbildung 11.29).

Diese MALDI-PSD-Technik wird insbesondere zur Sequenzierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt, aber auch andere Substanzklassen wie z.B. Carotinoide [51] können mit dieser Methode analysiert und durch ihre Fragmentionen identifiziert werden.

Zunehmend erfolgen auch Sequenzierungen von natürlichen Oligosacchariden [11, 22, 23] und von Glycanketten, die aus Glycoproteinen stammen. Dies soll hier an Hand einiger Beispiele näher vorgestellt werden.

Abbildung 15.107 A zeigt das PSD-Spektrum der Oligomannose Man 7 D1. Diese „reine“ Standardsubstanz besteht aus 7 Mannose- und 2 GlcNAc-Molekülen, wie aus der am linken oberen Rand des Bildes dargestellten Struktur hervorgeht. Dafür sind die folgenden Symbole charakteristisch: (■) *N*-Acetylglucosamin, (○) Mannose und (⊗) „inner-core“-Mannose.

Das PSD-Spektrum des Gemisches, das aus unterschiedlichen Anteilen isomerer Oligomannosen (Man 7 D1: 56%, Man 7 D2: 18,5%, Man 7 D3: 25,5%) besteht, geht aus Abbildung 15.107 B hervor. Alle in den PSD-Spektren aufgeführten Fragmentionen beinhalten Na-Ionen. Die Massenzahl des Molekülionenpeaks $[M+Na]^+$ ist für alle drei isomeren Oligomannosen identisch und beträgt 1 582,4.

Aus einer ersten Spektrenanalyse resultiert, dass die registrierten Fragmentionen-Peaks exakt den Abspaltungen von einzelnen Mannose- bzw. GlcNAc-Molekülen und -Gruppen entsprechen. Beispielsweise beträgt das *m/z*-Verhältnis bei der Abspaltung von 3 Mannose-Molekülen 1 096, von 2 GlcNAc-Molekülen 1 158 oder von 3-Mannose- + 2 GlcNAc-Molekülen 672. Aus dem letzteren Fragmentpeak, der die übriggebliebenen 4 Mannose-Moleküle repräsentiert, lassen sich drei verschiedene Verknüpfungen ableiten (s. Bildmitte in 15.107 A).

Eine vertieftere Spektrenanalyse geht aus der umfassenden Diskussion der Ergebnisse in der entsprechenden Spezialliteratur [11] hervor.

Inwieweit sich die hier an Hand von Modellsubstanzen gezeigten Ergebnisse auf natürliche Glycanstrukturen aus hydrolysierten Glycoproteinen übertragen lassen, soll an den folgenden Beispielen gezeigt werden.

Dafür dient das rhBMP-2-Glycoprotein, aus dem durch enzymatische Hydrolyse mit PNGase F die *N*-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide freigesetzt wurden.

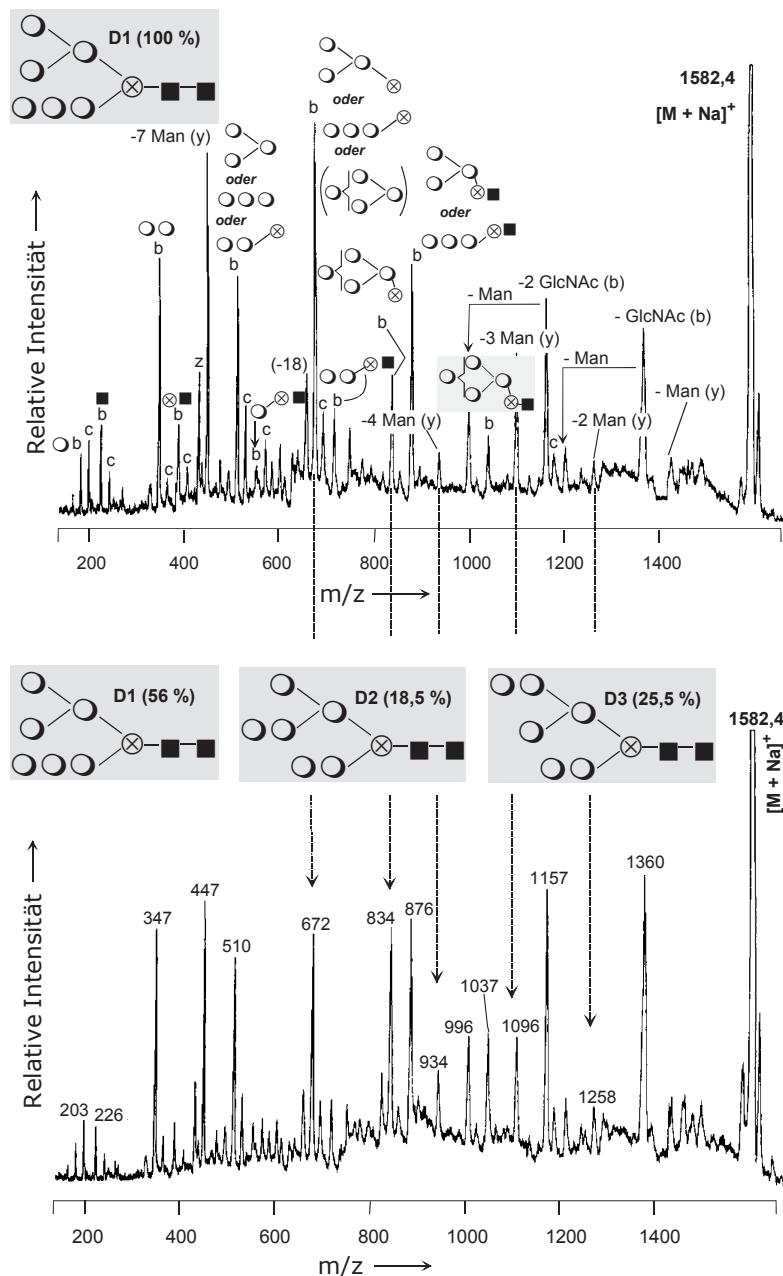


Abb. 15.107 MALDI-PSD Spektrenbibliothek, A: Man 7 D1 Isomer, B: Gemisch aus D1, D2, D3.

Mit freundlicher Genehmigung von J. C. Rouse [11].

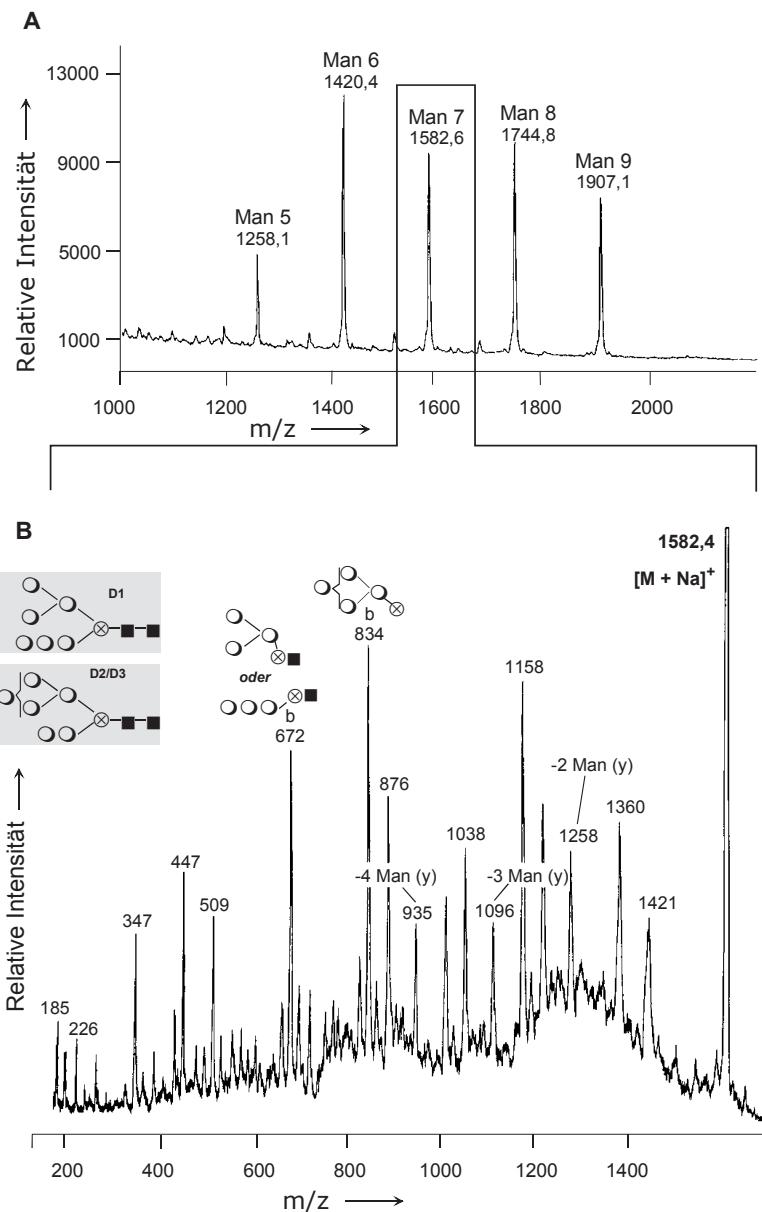


Abb. 15.108 MALDI-Spektrum (A) von *N*-glycosidischen Oligosacchariden, die enzymatisch mit PNGase F aus dem Glycoprotein rhBMP-2 freigesetzt wurden und MALDI-PSD-Spektrum (B) der selektierten (*precursor ion selection*) Oligomannose Man 7.

Mit freundlicher Genehmigung von J. C. Rouse [11].

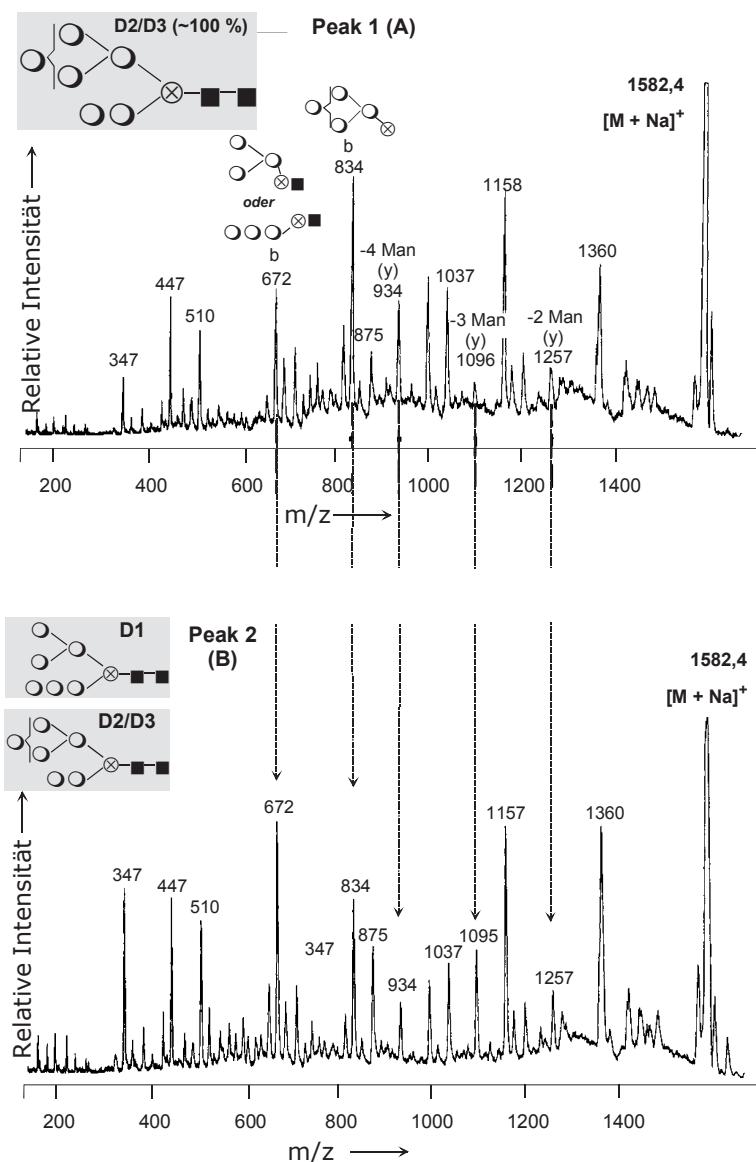


Abb. 15.109 PSD-Spektren von Peak 1 und 2 der Oligomannose Man 7 aus der HPAEC-Trennung von Abbildung 15.100.

Mit freundlicher Genehmigung von J. C. Rouse [11].

Die chromatographische Trennung dieser Glycan-Fraktion mittels HPAEC-PAD-Technik wurde bereits in Abbildung 15.100 gezeigt.

Auch mit Hilfe der MALDI-MS-Technik im linearen TOF-Modus können die Massenprofile dieser einzelnen Oligomannosen der isolierten Glycan-Fraktion an Hand ihres Molekulargewichtes registriert werden (s. Abbildung 15.108 A). Alle fünf Oligomannosen (Man 5 bis Man 9) können durch ihre charakteristischen Molkülmassen, deren Größen in der Abbildung aufgeführt sind, identifiziert werden.

Von der mannosereichen Glycankette Man 7 erfolgte nach „Ausblenden“ der anderen Oligomannosen die Aufnahme eines PSD-Spektrums (15.108 B, [11]).

Daraus geht anhand der typischen Fragmentions-Peaks (s. Abbildung 10.21 A und B) hervor, dass alle drei möglichen Isomeren von Man 7 D1 bis D3 Bestandteile der Glycanketten des hydrolysierten rhBMP-2-Glycoproteins sein können.

Wie aus den in Abbildung 15.100 dargestellten Ergebnissen der HPAEC-PAD-Trennung außerdem ersichtlich ist, werden für Man 7 zwei Chromatogramm-Peaks (1 + 2) registriert.

Die nach der Isolierung von Peak 1 und 2 einzeln aufgenommenen PSD-Spektren sind in Abbildung 15.109 wiedergegeben. Daraus geht hervor, dass im Peak 1 Isomere von Man 7 D2 und Man 7 D3 enthalten sind, während im Peak 2 zusätzlich die isomere Oligomannose Man 7 D1 vorhanden ist.

Eine weiterführende und vertiefte Strukturaufklärung der Glycanmoleküle bietet die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR). Sie ermöglicht u.a. die Unterscheidung zwischen α - und β -Anomeren.

15.12.2.6 $^1\text{H-NMR}$

Methodische Grundlagen der $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie wurden einführend im Abschnitt 6.5 dargestellt.

Aus einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum können als Messdaten die chemische Verschiebung, die Spin-Spin-Kopplung und nach Integration der Signale die relative Anzahl der Kerne einer Substanz erfasst werden.

Innerhalb der Strukturanalytik von *N*-Glycanen ermöglicht die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie [24, 25] die Bestimmung der anomeren Konfiguration der Monosaccharid-Bausteine (α - oder β -glycosidisch gebundenes C-Atom in Abbildung 15.110) sowie ihre Verknüpfungsrichtung zu benachbarten Glycan-Species.

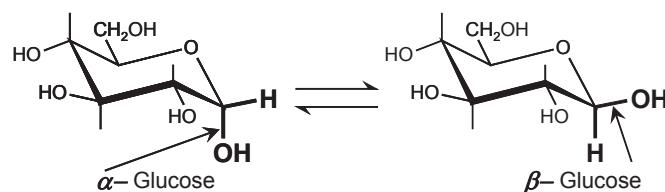


Abb. 15.110 Strukturen von α - und β -Glucose

Wie aus dem strukturellen Aufbau der Kohlenhydrate bereits abgeleitet werden kann, unterscheiden sich die Protonen, die einerseits an die Kohlenstoffatome und andererseits an die Sauerstoffatome der Hydroxylgruppen gebunden sind. Letztere Gruppe kann jedoch für die Strukturaufklärung kaum genutzt werden.

Innerhalb der C-H-Bindungen eines Kohlenhydrates unterscheidet sich das anomere Proton am C₁-Atom (H-1) deutlich von den Protonen, die mit den C₂- bis C₆-Atomen (H-2 bis H-6) verknüpft sind.

H-1 befindet sich in unmittelbarer Umgebung zum Ring-Sauerstoff-Atom und zum O-Atom der Hydroxylgruppe, die beide gegenüber dem anomeren Proton eine stark elektronenziehende Wirkung ausüben. Hinzu kommt, dass das anomere Proton nur mit *einem* weiteren Proton (H-2) koppelt. Durch diese Effekte wird das anomere Proton im Vergleich zu den anderen Protonen im Glucose-Molekül weniger stark abgeschirmt. Im hochfrequenten Magnetfeld (600 MHz ¹H-NMR) resultiert demzufolge eine größere chemische Verschiebung für H-1.

Äquatorial verknüpfte Protonen (α -Bindung) treten im Vergleich zu strukturell entsprechenden axialen Protonen (β -Bindung) meist bei einem niedrigeren Feld in Resonanz. Axiale Protonen wie H-2 und H-4 der Glucose besitzen demzufolge gegenüber von äquatorialen Protonen (z.B. H-2-Protonen der Mannose) eine geringere chemische Verschiebung. Auch die Protonen der α - und β -Anomere (H-1) unterscheiden sich deutlich, wobei das Proton des α -Anomers die größere chemische Verschiebung im NMR-Spektrum ergibt (Abbildung 15.111).

Daraus resultiert die Differenzierungsmöglichkeit der z.B. in einem Gemisch vorliegenden α - und β -Glucose mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie. Weiterhin können die Protonen des übrigen Glucose-Gerüstes differenziert werden, wie im rechten Teil der Abbildung angedeutet ist.

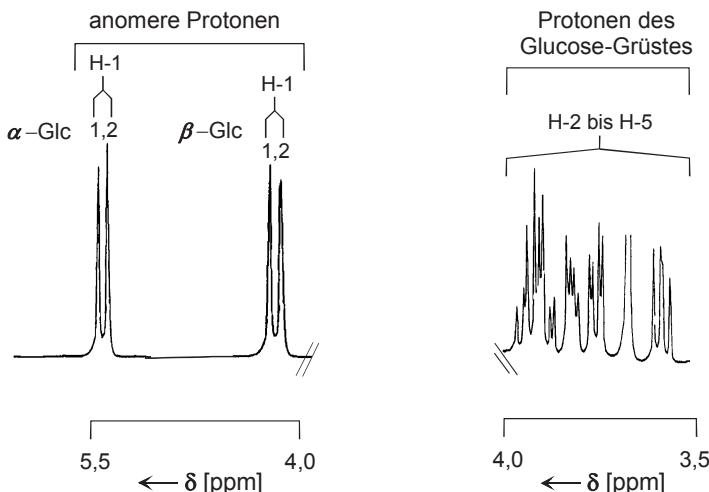


Abb. 15.111 Schematische Darstellung des ¹H-NMR-Spektrums eines Gemisches bestehend aus α - und β -Glucose.

15.13 Phospholipide in biologischen Extrakten

Phospholipide sind durch eine sehr komplexe Zusammensetzung (Strukturen s. Abschnitt 2.4.1) gekennzeichnet, besitzen strukturelle Funktionen innerhalb der Doppelschicht biologischer Membranen und spielen eine aktive Rolle bei der Regulation wichtiger biologischer Prozesse, zu denen selektive Kationeninteraktionen oder Adhäsionsphänomene gehören.

Wichtige Vertreter dieser Lipidklasse sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinsitol, Sphingomyelin und entsprechende *Lysoverbindungen* wie Lysophosphatidylethanolamin oder Lysophosphatidylcholin.

Phosphatidylserin wurde bereits 1941 von Folch et al. [1] aus dem Gehirn, in dem es die Hauptkomponente (20–25%) der Phospholipidfraktion darstellt, isoliert. Wie auch Phosphatidylethanolamin steht das Phosphatidylserin bei erhöhten Konzentrationen mit verschiedenen Krankheitserscheinungen wie Leukopenie oder Fibrinolyse [2] im Zusammenhang.

Von Phosphatidylcholin ist bekannt, dass ein Mangel dieser Verbindung an der Oberfläche der Lunge für das Atemnotsyndrom (ARDS) von Frühgeborenen verantwortlich ist.

Phosphatidylethanolamin wird in Zellmembranen in Anwesenheit von Ethanol gebildet. Auf Grund des langsamem Abbaus von Phosphatidylethanolamin im Körper (Blut) dient es als Marker für Alkoholismus [3].

Die Isolierung der Lipide (Phospholipide) aus dem biologischen Material wird in der Regel nach der Methode von Folch [4] bzw. nach entsprechenden Modifikationen durchgeführt, die auf der Extraktion mit Chloroform-/Methanol-haltigen Lösungsmitteln beruhen.

Chromatographische und zunehmend auch strukturanalytische Methoden werden vorrangig für qualitative und quantitative Bestimmungen der Phospholipide eingesetzt.

15.13.1 Flüssigchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (TLC) gehört zu den oft angewandten Methoden in der Lipidanalytik [5, 6]. Als stationäre Phase dienen Silicagele. Die Elution erfolgt mit chloroformhaltigen Lösungsmitteln, in denen die Phospholipide im Gegensatz zu vielen anderen organischen Flüssigkeiten besonders gut löslich sind. Ihre Detektion erfolgt mit Hilfe von Anfärbetechniken direkt auf der Dünnschichtplatte. Es werden vorrangig Dünnschichtplatten mit sehr kleinen und einheitlichen Korngrößen eingesetzt (HPTLC, s. auch Abschnitt 6.2).

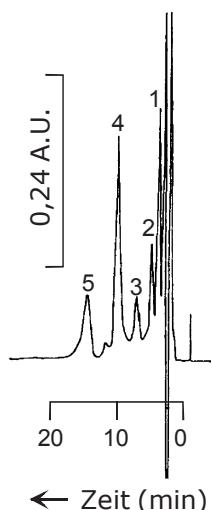
Insbesondere HPLC-Methoden [7-15] werden auf Grund ihrer Automatisierung und der neu entwickelten Detektoren gegenüber der TLC bevorzugt eingesetzt. Als stationäre Phasen für die Trennung von Phospholipiden dienen u.a. chemisch modifizierte Silicagele wie Diol- [8, 10], Aminopropyl- und Cyanopropylphasen [11].

Für HPLC-Trennungen sind chloroformhaltige Eluenten wenig geeignet, wenn nur die UV- oder RI-Detektoren zur Verfügung stehen. Letztere sind relativ unempfindlich und für Gradientenelutionen ungeeignet. Die Detektion der Phospholipide im UV-Bereich ist auch problematisch.

Einerseits enthalten die Moleküle keine chromophoren Gruppen, die eine sensible Detektion im mittleren UV-Bereich ermöglichen würden. Andererseits setzen Elutionsmittel wie Chloroform oder Essigsäure, in denen Phospholipide gut löslich sind, die Transparenz der Durchflusstürette im nahen UV-Bereich (200–220 nm) und damit die Empfindlichkeit für die Phospholipid-Registrierung stark herab. Hinzu kommt, dass die Anzahl der durch UV-Licht anregbaren Doppelbindungen innerhalb der Fettsäuremoleküle von Phospholipiden unterschiedlich ist. Daraus resultieren verschiedene große Extinktionskoeffizienten (s. Abschnitt 10.2). Demzufolge sind quantitative Bestimmungen nur dann zuverlässig, wenn identische Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen.

Wie am Beispiel der Fettsäuren beschrieben (Abschnitt 15.9.2), gehören auch Phospholipide zu den biochemisch wichtigen Inhaltsstoffen speziell von Hefen und Bakterien. Die Isolierung der Lipide erfolgt durch Extraktion der Biomasse mit Chloroform/Methanol (1 : 1 V/V). Die Fällung der Lipidbestandteile mit Aceton ergibt eine in dieser Flüssigkeit lösliche Fraktion (unpolare Lipide) und eine darin unlösliche Fraktion (Phospholipide).

Abbildung 15.112 zeigt ein Beispiel der HPLC-Trennung eines Phospholipidextraktes aus Hefebiomasse mit Detektion im nahen UV-Bereich bei $\lambda = 203$ nm [9]. Die chromatographische Trennung erfolgt an einer selbst präparierten, druckstabilen Glastrennsäule mit Silicagelfüllung (Silasorb 600, $d_p = 5 \mu\text{m}$) mit Hilfe eines Elutionsmittels (MeOH/Acetonitril/Phosphorsäure: 100 : 100 : 3 V/V/V).



- 1: Phosphatidylethanolamin (PE)
 - 2: Lysophosphatidylethanolamin (LPE)
 - 3: Lysophosphatidylcholin (LPC oder LL)
 - 4: Phosphatidylcholin (PC)
 - 5: Sphingomyelin (SP oder SM)
- Glassäule: $150 \cdot 3,8 \text{ mm i.D.}$,
 stationäre Phase: Silasorb 600, $5 \mu\text{m}$;
 mobile Phase: MeOH/ACN/ H_3PO_4
 (100 : 100 : 3 V/V/V),
 Flussrate: 0,3 ml/min,
 Vordruck: 4 MPa,
 Detektion: UV, 203 nm.

Abb. 15.112 Chromatogramm: Phospholipidextrakt aus Hefebiomasse.

In diesem Gemisch sind die Phospholipide ausreichend gut löslich und können auch im nahen UV-Bereich relativ empfindlich registriert werden. An Hand von entsprechenden Referenzsubstanzen können fünf Phospholipide in diesem Chromatogramm zugeordnet werden.

Ein für die HPLC von Lipiden besonders geeigneter Detektor ist das Streulichtphotometer [14, 15] mit der Bezeichnung *evaporative light scattering detection* (ELSD). Im Prinzip können damit alle nicht flüchtigen Verbindungen unabhängig von ihrer Struktur und bei Abwesenheit chromophorer Gruppen detektiert werden.

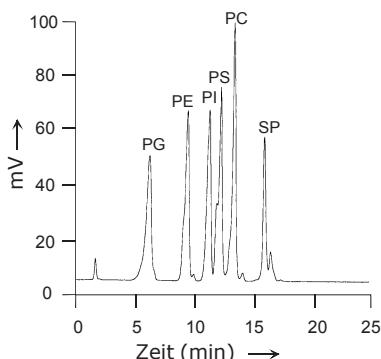


Abb. 15.113 Chromatogramm von Modellsubstanzen.

Vorsäule: 20 · 2,1 mm i.D.,
Hauptäule: 120 · 4,6 mm i.D.,
stationäre Phase: Encapharm 100,
dp = 5 µm,
mobile Phase:
A: CHCl₃/MeOH/NH₄OH 80 : 19,5 : 0,5
V/V/V,
B: CHCl₃/MeOH/H₂O 60 : 34,5 : 5,5
V/V/V,
Gradient: 0 bis 100% B von 0. bis
14. min und zurück auf 0% B
von 23. bis 30. min,
Flussrate: 1,0 ml/min,
Vordruck: 5,5 bis 7,0 MPa,
Detektion: ELSD,
Injektionsvolumen: 20 µl.

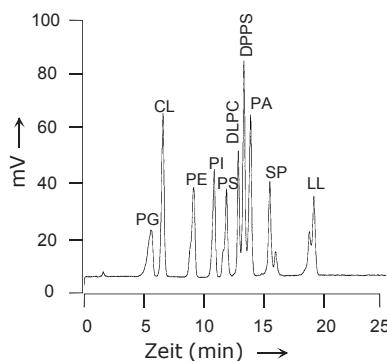


Abb. 15.114 Chromatogramm von Modellsubstanzen.

PG: Phosphatidylglycerol,
CL: Diphosphatidylglycerol,
PE: Phosphatidylethanolamin,
PI: Phosphatidylinositol,
PS: Phosphatidylserin,
DLPC: Dilinoleylphosphatidylcholin,
DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholin,
PA: Phosphatidsäure,
SP: Sphingomyelin,
LL: Lysophosphatidylcholin,
HPLC-Bedingungen wie in Abb. 10.77

Mit freundlicher Genehmigung von
H. Bünger [14].

Ein ELS-Detektor besteht aus einer Lichtquelle, von der mono- oder polychromatisches Licht ausgeht, einer Messkammer, in der der Eluent verdampft wird und einem Photomultiplier (SEV) zur Registrierung. Das aus der HPLC-Säule ausströmende Eluat wird in einer Vernebelungskammer (*Nebulizer*) mit Hilfe eines Gases in ein Aerosol überführt. Der Flüssigkeitsanteil der mobilen Phase wird in einem aufgeheizten Teil der Kammer verdampft. Zurück bleiben feste Probepartikel, die sich innerhalb des zugeführten Gases verteilen und die die Streuung des eingestrahlten Lichtes bewirken. Der gestreute Lichtstrahl, der vom Photomultiplier registriert wird, ist der Probenmenge in der Messkammer proportional und unabhängig vom strukturellen Aufbau (funktionelle Gruppen oder Doppelbindungen) der Probemoleküle.

Im Vergleich zur Detektion mit einem Refraktometer (RI) ist der ELSD unabhängig von der Temperatur und auch für Gradientenelutionen geeignet. Mobile Phasen, die nicht vollständig verdampfbar sind, erhöhen jedoch das Hintergrundrauschen der Detektion und setzen die Empfindlichkeit herab.

Die folgenden Chromatogramme zeigen HPLC-Trennungen von Referenzsubstanzen der Phospholipide mittels ELS-Detektor [14].

In der ersten Testmischung (Abbildung 15.113) sind 6 natürliche Phospholipide mit einer Konzentration von 8 µg pro 20 µl Eluent enthalten.

In der Elutionskurve von Abbildung 15.114 werden Lysophosphatidylcholin (LL), Dilinoleylphosphatidylcholin (DLPC) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), die als weitere Komponenten der Standardprobelösung zugemischt wurden, registriert. LL dient als innerer Standard und DLPC bzw. DPPC sind synthetische Phospholipide, die mit dem Phosphatidylcholin coeluieren. Die Konzentration in dieser Testmischung beträgt 2 µg Phospholipid pro 20 µl mobile Phase.

In Abbildung 15.115 ist das Chromatogramm einer natürlichen Phospholipidfraktion, die aus einem Lungenextrakt stammt, enthalten [14].

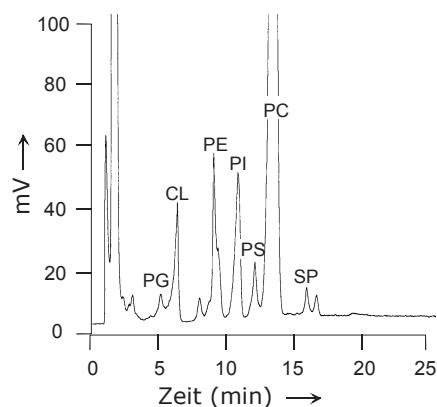


Abb. 15.115 Chromatogramm vom Lungenextrakt
Abkürzungen s. Abbildung 15.114,
HPLC-Bedingungen wie in Abbildung 15.113,
Mit freundlicher Genehmigung von H. Bünger [14].

15.13.2 NMR-Spektroskopie

Für die Aufklärung der komplexen strukturellen Zusammensetzung der Lipidfraktionen (Phospholipide) gewinnen neben massenspektrometrischen Techniken [16, 17] die ^1H -, ^{13}C - und insbesondere die ^{31}P -NMR-Spektroskopie [18, 19] zunehmende Bedeutung. Für die eindeutige Interpretation von NMR-Spektren (s. auch Abschnitt 10.5) sind effiziente chromatographische Vorreinigungsschritte der Lipide erforderlich. Auch für die in Lipidfraktionen enthaltenen isomeren Verbindungen stellt sich die Zuordnung von NMR-Signalen als kompliziert dar.

Einführend werden hier einige strukturelle Informationen, die mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gewonnen werden, kurz beschrieben. Welche Informationen beispielsweise aus einem ^{13}C -NMR-Spektrum abgeleitet werden können, zeigen die folgenden Beispiele der aus humanen Lebergewebe isolierten Lipidextrakte.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum, das aus Abbildung 15.116 hervorgeht, sind fünf unterschiedliche Signalregionen ausgewiesen. Im Bereich von 172,5 bis 173,5 ppm (1) erscheinen die Resonanzlinien der Kohlenstoffatome von Carbonylgruppen. Olefinische Doppelbindungen, die in mono- als auch polyungesättigten Molekülketten enthalten sind, werden zwischen 121 und 141 ppm (2) registriert.

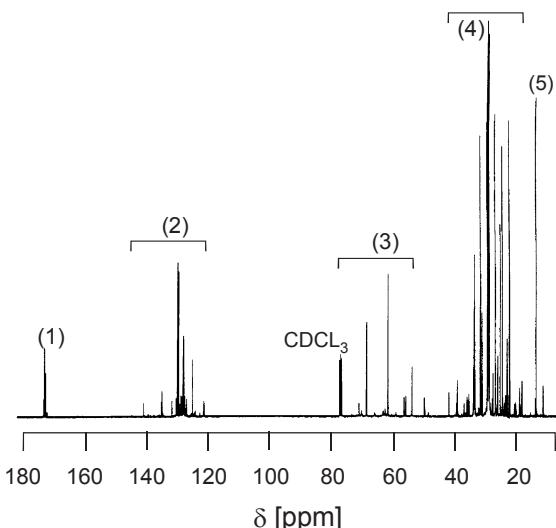


Abb. 15.116 ^{13}C -NMR Protonen-entkoppeltes Spektrum von Lipidextrakten aus Menschenleber und charakteristische Spektralregionen (1) bis (5).

(1): Carbonylgruppen, (2): olefinische Kohlenstoffatome, (3): Kohlenstoffatome, die direkt an eine Hydroxylgruppe oder einen quarternären Stickstoff gebunden sind, (4): Methylenkohlenstoffatome, (5): Methylkohlenstoffatome.

Mit freundlicher Genehmigung von P. Pollesello [17].

Kohlenstoffatome, die direkt an eine Hydroxylgruppe oder an eine quarternäre Aminogruppe gebunden sind, ergeben Resonanzsignale im Bereich von 50 bis 75 ppm (3), während die gesamten Methylenkohlenstoffatome (gebunden an 2 Protonen und 2 Kohlenstoffatome) in der Spektralregion von 20 bis 40 ppm auftauchen (4). Letztlich ergeben die Methylkohlenstoffatome Resonanzsignale zwischen 11 und 15 ppm (5).

In Abbildung 15.117 ist die erweiterte Spektrenregion für den Bereich der Carbonylgruppen (1) dargestellt. Um 173,4 ppm sind die Signale der Carbonylkohlenstoffatome von freien Fettsäuren (FFA) enthalten, während die Peaks zwischen 173,0 bis 173,2 ppm für die Carboxylgruppe von Glycerophospholipiden charakteristisch sind. Daraus ist auch ersichtlich, daß die Carboxylgruppen in Position 1 und 3 bei 173,2 ppm registriert werden, während die in Position 2 das Resonanzsignal bei 173,1 ppm ergeben. Vergleichbares resultiert für die Carboxylgruppen der Triglyceride, für die bei 172,7 ppm (Position 1 und 3) und bei 172,8 ppm die Signalregistrierung erfolgt. Weitere Spektren enthält die Originalliteratur [18].

Vor allem die ^{31}P -NMR-Spektroskopie ist auf Grund der Einfachheit, Schnelligkeit und guten Reproduzierbarkeit eine geeignete Variante für die Analytik von Phospholipiden [19], die auch als alternative Methode zur etablierten HPLC auf diesem Gebiet gilt.

Die quantitative Bestimmung der Komponenten erfordert keine Standardisierung, da die ^{31}P -Signale nicht von den unterschiedlichen Fettsäurestrukturen in den Phospholipiden beeinflusst werden. Von entscheidender Bedeutung sind andere Bedingungen wie z.B. die für die Spektrenaufnahme verwendeten Flüssigkeiten, in denen die Phospholipide gelöst sind.

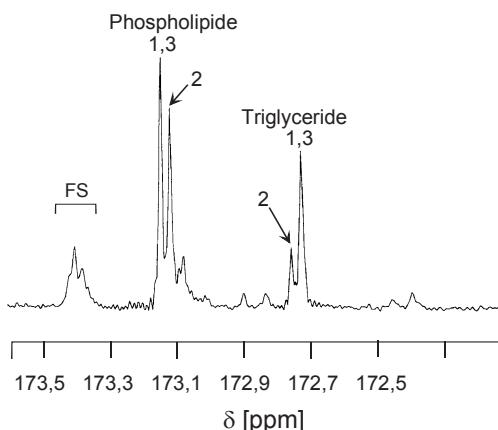


Abb. 15.117 Erweitertes ^{13}C -NMR Protonen-entkoppeltes Spektrum für die Spektralregion (1) der Carbonylgruppen von Lipidextrakten aus Menschenleber. Erläuterungen im Text.

Mit freundlicher Genehmigung von P. Pollesello [18].

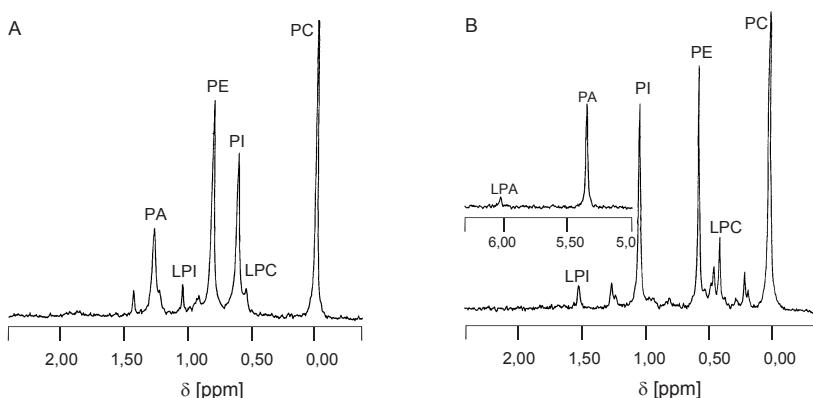


Abb. 15.118 ^{31}P -NMR Spektren von Lecithin in verschiedenen Lösungsmitteln.

A: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ -EDTA 10 : 4 : 1 V/V/V, EDTA: 0,2 M bei pH = 6.
 B: $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}-\text{GH}^+$ 0,3 : 1 V/V, die Konzentration an Guanidiniumchlorid (GH^+) beträgt 77 g/l in der Endlösung.

Mit freundlicher Genehmigung von P. Pollesello [19].

Ein Vergleich zwischen dem in der NMR-Spektroskopie üblichen Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ -EDTA (A) mit dem System $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMF}-\text{GH}^+$ (B) zeigen die Spektren in Abbildung 15.118. In diesem Lösungsmittelgemisch ist der Bereich der chemischen Verschiebung für die ^{31}P -Signale für das untersuchte Lecithin und die analysierten Phospholipide etwa um den Faktor 4 größer. Ein Vorteil dieser NMR-Technik ist auch die separate Identifizierung einzelner Phospholipidklassen und der entsprechenden Lysoverbindungen.

Hat man im Leben 1000 Treffer - man singt,
man lacht, man geht vorbei.

Doch nie vergißt der kleinste Kleffer,
schießt Du ein einzig Mal vorbei.

Oskar G. von Breun

15.14 Literatur

Kapitel 15.1

- Imming P (2013) Arzneibuchanalytik, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Ehlers E (2014) Kurzlehrbuch Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag
- Eger K, Troschütz R, Roth HJ (2005) Arzneistoffanalyse, 5. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag
- Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A (1996) Taschenatlas der Pharmakologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Auterhoff H (1980) Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 10. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Kapitel 15.2

- Wagner H, Bladt S (1983) Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Schild W, Stahl E (1981) Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierung, Gustav Fischer Verlag
- Trachsel D, Richard N (2000) Psychedelische Chemie, Nachschatten Verlag Solothurn Schweiz
- Van Treek B (2004) Drogen- und Suchtlexikon, Schwarkopf & Schwarzkopf Verlag Berlin
- Wirth N (1999) Ecstasy, Econ und List Taschenbuch Verlag

Kapitel 15.3

- Salzer R, Thiele S, Zuern A in:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/dioxine/dioxinanalytik.vlu.html>.
- Ballschmiter K, Bacher R (1996) Anforderungen an die Dioxinanalytik, VCH Verlagsgesellschaft
- Oehme M (1998) Handbuch Dioxin, Spektrum Verlag

Kapitel 15.4

- Lottspeich F, Engels J (2012) Bioanalytik, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Gey MH (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag
- Renneberg R (2009) Bioanalytik für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag
- Barrett GC (1985) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Chapman & Hall London
- Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010) Lebensmittelanalytik, Springer Verlag Berlin Heidelberg

Kapitel 15.5

- [1] Margoshes, M, Valley, BL (1957) J Am Soc 79:4813
- [2] Kägi, JHR, Vallee, BL (1960) J Biol Chem 235:3460
- [3] Kägi, JHR, Vallee, BL (1961) J Biol Chem 236:2435
- [4] Kägi, JHR, Himmelhoch, SR, Whanger, PD, Bethune, JL, Vallee, BL (1974) J Biol Chem 249:3537
- . [5] Hamer, DH (1986) Ann Rev Biochem 55:913
- [6] Kägi, JHR, Kojima, Y (1987) Experientia 52:25
- [7] Merian, E (1991) Metals and their compounds in the environment. occurrence, analysis and biological relevance, VCH-Verlag, Weinheim
- ..[8] Vallee, BL (1991) Methods Enzymol 205:3
- [9] Kägi, JHR (1991) Methods Enzymol 205:613
- [10] Stillmann, MJ, Shaw III CF, Suzuki, KT (1992): Metallothioneins, VCH-Verlag, Weinheim
- [11] Klauser, S, Kägi, JHR, Wilson, KJ (1983) Biochem J 209:71
- [12] Kojima, Y (1991) Methods Enzymol 205:8
- [13] Hunziker, PE (1991) Methods Enzymol 205:244
- [14] Bordin, G, Raposo, FC, Rodriguez, AR (1996) J Liq Chrom & Rel Technol 19:3085
- [15] Murasugi, A, Wada, C, Hayashi, Y (1981) J Biochem 90:1561
- [16] Kondo N, Isobe M, Imai K, Goto T, Marasug, A, Hayashi Y (1983) Tetrah Lett 24:925
- [17] Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH (1985) Science:674
- [18] Steffens JC, Hunt DF, Williams BG (1986) J Biol Chem 261:13879
- [19] Zenk MH (1996) Gene 179:21
- [20] Grill E, Gekeler W, Winnacker E-L, Zenk MH (1986) FEBS Lett 205:47
- [21] Hayashi Y, Nakagawa CW, Mutoh N, Isobe M, Goto T (1991) Biochem Cell Biol 69:115
- [22] Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I (1994) Plant Physiol 104:1325
- [23] Sies H (1989) Naturwissenschaften 76:57
- [24] Meister A (1995) Methods Enzymol 251:3
- [25] Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980) Anal Biochem 106:55
- [26] Keller DA, Menzel DB (1985) Anal Biochem 151:418
- [27] Martin J, White INH (1991) J Chromatogr 568:219
- [28] Winters RA, Zukowski J, Ercal N, Matthews RH, Spitz DR (1995) Anal Biochem 227:14
- [29] Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, De la Asunción JG, Estrela JM, Vina J (1994) Anal Biochem 217:323
- [30] Mills BJ, Richie JP Jr, Lang CA (1994) Anal Biochem 222:95
- [31] Santori G, Domenicotti C, Bellocchio A, Pronzato MA, Marinari UM, Cottalasso D (1997) J Chromatogr 695:427
- [32] Mopper K, Delmas D (1984) Anal. Chem 56:2557
- [33] Martensson J (1987) J Chromatogr 420:152
- [34] Yan CC, Huxtable RJ (1995) J Chromatogr 672:217

- [35] Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Anal Biochem 114:383
- [36] Yang C-S, Chou Su-T, Lin N-Nu, Liu L, Tsai Pi-Ju, Kuo J-S, Lai J-S (1994) J Chromatogr B 661:231
- [37] Luo J-L, Hammarqvist F, Cotgreave IA, Lind C, Andersson K, Wernerma J (1995) J Chromatogr 670:29
- [38] Cavrini V, Gotti R, Andrisano V, Gatti R (1996) Chromatographia 42:515
- [39] Reeve J, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N (1980) J Chromatogr 194:424
- [40] Rabenstein DL, Saetre R (1977) Anal Chem 49:1036
- [41] Kuninori T, Nishiyama J (1991) Anal Biochem 197:19
- [42] Kleinman WA, Richie JP Jr. (1995) J Chromatogr 672:73
- [43] Komuro C, Ono K, Shibamoto Y, Nishidai T, Takahashi M, Abe M (1985) J Chromatogr 338:209
- [44] Takahashi H, Nara Y, Meguro H, Tizimura K (1979) Agric Biol Chem 43:1439
- [45] Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM (1979) Proc Natl Acad Sci (USA) 76:3382
- [46] Kosower EM, Pazhenchovsky B (1980) J Am Chem Soc 102:4983
- [47] Leroy P, Nicolas A, Thioudellet C, Oster T, Wellman M, Siest G (1993) Biomed Chromatogr 7:86
- [48] Brocklehurst K, Carlsson J, Kierstan MPJ, Crook M (1973) Biochem J. 133:573
- [49] Kabzinski AKM (1997) J Chromatogr 766:121
- [50] Kleinman WA, Richie JP Jr (1995) J Chromatogr 672:73
- [51] Piccoli G, Fiorani M, Biagiarelli B, Palma F, Potenza L, Amicucci A, Stocchi V (1994) J Chromatogr 676:239
- [52] O'Shea TJ, Lunte SM (1993) Anal Chem 65:247
- [53] Russell J, Rabenstein DL (1996) Anal Biochem 242:136
- [54] Richards MP, Beattie JH (1993) J Chromatogr 648:459
- [55] Richards MP (1994) J Chromatogr B 657:345
- [56] Virtanen V, Bordin G, Rodriguez A-R (1996) J Chromatogr 734:391
- [57] Torres E, Cid A, Fidalgo P, Abalde J (1997) J Chromatogr 775:339

Kapitel 15.6

- [1] Krauss G-J (1984) Fresenius Z Anal Chem 317:674
- [2] Grune T, Siems W, Gerber G, Tikhonov YV, Pimenov AM, Toguzov RT (1991) J Chromatogr 563:53
- [3] Grune T, Siems WG (1993) J. Chromatogr 618:15
- [4] Metz DP (1987) Gicht, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [5] Gerber G, Siems W, Werner A (1991) in C. Vigo-Pelfrey (Ed.), Membrane liquid oxidation, CRC Press, Boca Raton, CA, 116
- [6] Helfrich G (1961) Nature 189:1001
- [7] Krauss GJ, Krauss G, Reinbothe H (1982) Biochem Physiol Pflanzen 177:769
- [8] Krauss GJ (1986) HRC & CC 9:419
- [9] Grune T, Ross GA, Schmidt H, Siems W, Perrett D (1993) J Chromatogr 636:105

Kapitel 15.7

- [1] Linden CJ, Lawhead CL (1975) J Chromatogr 105:125
- [2] Palmer K (1975) Anal Letter 8:215
- [3] Schwarzenbach R (1976) J Chromatogr 117:206
- [4] Aitzetmüller K (1978) J Chromatogr 156:354
- [5] Cwhite CA, Corran PH, Kennedy JF (1980) Carbohydr Res 87:165
- [6] Boumahraz M, Davydov VYa, Kieselev AV (1982) Chromatographia 15:751
- [7] Gey MH, Müller W (1988) Die Nahrung - Food 32:653
- [8] Stefansson M (1993) J Chromatogr 630:123
- [9] Armstrong DW, Jin HL (1989) J Chromatogr 462:219
- [10] Pastore P, Lavagnini I, Versini G (1993) J Chromatogr 634:47
- [11] Meagher RB, Furst A (1976) J Chromatogr 117:211
- [12] Wells GB, Lester RL (1979) Anal Biochem 97:184
- [13] Gisch DL, Pearson JD (1988) J Chromatogr 443:299
- [14] Koizumi K, Kubota Y, Tanimoto T, Okuda Y (1989) J Chromatogr 464:365
- [15] Gey MH, Unger KK (1996) Fresenius J Anal Chem 356:488
- [16] Bauer H, Voelter W (1976) Chromatographia 9:433
- [17] Binder H (1980) J Chromatogr 189:414
- [18] Brons C, Olieman C (1983) J Chromatogr 259:79
- [19] Gey MH, Rietzschel A, Nattermüller W (1991) Acta Biotechnol 11:105
- [20] Huber CG, Bonn GK (1995) J Chromatogr Libr 58:147
- [21] Gey MH, Unger KK, Battermann G (1996) Fresenius J Anal Chem 356:339
- [22] Scherz H, Bonn G (1998) Analytical chemistry of carbohydrates, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- [23] Oefner PF, Vorndran AE, Grill E, Huber C, Bonn GK (1992) Chromatographia 34:308
- [24] Chiesa C, Horwath C (1993) J Chromatogr 645:337
- [25] Oefner PJ, Chiesa C (1994) Glycobiology 4:397
- [26] Zhou W, Baldwin RP (1996) Electrophoresis 17:319

Kapitel 15.8

- Schleip T (2003) Lactoseintoleranz, TRIAS Verlag
- Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010) Lebensmittelanalytik, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Scherz H, Bonn G (1998) Analytical chemistry of carbohydrates, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Töpel A (1987) Chemie der Milch, 2. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig

Kapitel 15.9

- [1] Palmer J, List DM (1973) J Agric Food Chem 21:903
- [2] Eisenbeiß F, Weber M, Ehlerding S (1977) Chromatographia 10:262
- [3] Turkelson VZ, Richards M (1978) Anal Chem 50:1420

- [4] Stumpf DK, Burris RH (1979) Anal Biochem 95:311
- [5] Schwarzenbach R (1982) J Chromatogr 251:339
- [6] Bonn G, Bobleter O (1984) Chromatographia 18:445
- [7] Vratny P, Mudrik Z (1985) J Chromatogr 322:352
- [8] Gey MH, Müller W (1988) Die Nahrung-Food 32:653
- [9] Gey MH, Weissbrodt E, Stottmeister U (1988) Acta Biotechnol 8:445
- [10] Gey MH, Nagel B, Weissbrodt E, Stottmeister U (1988) Anal Chim Acta 213:227
- [11] Gey MH, Thiersch A, Rietzschel A, Nattermüller W, Stottmeister U, Nagel B (1989) Acta Biotechnol 9:491
- [12] Gey MH, Klossek P, Becker U (1990) Acta Biotechnol 10:459
- [13] Gey MH, Rietzschel A, Nattermüller W (1991) Acta Biotechnol 11:105
- [14] Pohl P, Wagner W (1972) Fette Seifen Anstrichm 74:424
- [15] Pörschmann J, Welsch T, Herzschuh R, Engewald W, Müller K (1982) J Chromatogr 241:73
- [16] Pörschmann J, Pörschmann S, Liebetrau L, Richter K (1985) Acta Biotechnol 5:297
- [17] Pörschmann J, Welsch T, Pörschmann S (1987) Acta Biotechnol 7:469
- [18] Pörschmann S, Pörschmann P, Liebetrau L, Kühn I, Pätz R (1987) Acta Biotechnol 7:479
- [19] Martinez M, Nurok D, Zlatkis A, Mc Quittay D, Evans J (1980) HRC & CC 3:528
- [20] Brondz I, Olsen I (1984) J Chromatogr 308:31
- [21] Firmenzeitschrift (Hewlett-Packard) Peak 8 (1986) 2
- [22] Coldfine H, Panos C (1971) J Lipid Res 12:214
- [23] Dhopeshwarkar GA (1981) Prog Lipid Res 19:107
- [24] Darlington LG (1988) Ann. Rheum. Dis. 47:169
- [25] Dose K (1994) Biochemie, Springer-Verlag Heidelberg
- [26] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GM (1957) J Biol Chem 226:497
- [27] Golovnya RV, Kuzmenko TE (1977) Chromatographia 10:545
- [28] Jensen NJ, Gross ML (1987) Mass Spectrom Rev 6:497
- [29] Haertig, C (2008) J Chromatogr 1177:159

Kapitel 15.10

- [1] Stetter KO (1985) Naturwissenschaften 72:291
- [2] Segerer AH, Huber R, Stetter KO (1991) Biol Unserer Zeit 21:266
- [3] Gey MH, Unger KK (1995) J. Chromatogr. B 666:188
- [4] Barthomeuf C (1989) J Chromatogr 473:1
- [5] Laurent CJCM, Billiet HAH, De Galan L, Buytenhuys FA, Van der Meeden FPB (1984) J Chromatog. 287:45
- [6] Josic' D, Hofmann W, Reutter W (1986) J Chromatogr. 371:43
- [7] Müller W (1990) J Chromatogr. 510:133
- [8] Hashimoto T, Sasaki Y, Auira M, Kato Y (1978) J Chromatogr 160:301
- [9] Engelhardt H, Ahr G (1983) J Chromatogr 282:385
- [10] Unger K (1984) Methods Enzymol 104:154

- [11] Larsson PO (1984) Methods Enzymol 104:212
- [12] Guiochon G, Martin M (1985) J Chromatogr 326:3
- [13] Hjerten S, Yao K, Eriksson K-O, Johansson B (1986), J Chromatogr 359:99
- [14] Schmuck MN, Gooding DL, Gooding KM (1986) J Chromatogr 359:323
- [15] Welling GW, Slopsema K, Welling-Wester S (1986) J Chromatogr 359:307
- [16] Anspach B, Gierlich HU, Unger KK (1988) J Chromatogr 443:45
- [17] Gey MH, Thiem M, Gruel H (1989) Acta Biotechnol 9:69
- [18] Dubin PL, Edwards SL, Mehta MS, Tomalia D (1993) J Chromatogr 635:51

Kapitel 15.11

- [1] Malcolm ADB (1981): The use of restriction enzymes in genetic engineering, In: Williamson R (Ed.): Genetic engineering II. Academic Press New York
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York
- [3] Mullis KB, Faloona F (1987) Methods Enzymol 55:335
- [4] Newton CR, Graham A (1997): PCR, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- [5] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463
- [6] Ansorge W, Voss H, Zimmermann J (1996): DNA sequencing strategies, John Wiley & Sons New York
- [7] Heß D (1992): Biotechnologie der Pflanzen, UTB Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- [8] Sinemus K (1995): Biologische Risikoanalyse gentechnisch hergestellter herbizidresistenter Nutzpflanzen, Verlag Mainz Aachen
- [9] Brem G (1993): Transgenic animals. In: Pühler A (Ed): Genetic engeneering of animals VCH-Verlag Weinheim
- [10] Antonarakis SE (1989) J Med 320:153
- [11] Strachan T (1994): Das menschliche Genom, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg
- [12] Friedman T (1989) Science 244:1275
- [13] Bayertz K, Paslack R, Schmidt KW, Schmidtke J, Scholl U, Schreiber H-L (1995) Somatische Gentherapie - Medizinische, ethische und juristische Aspekte des Gentransfers in menschliche Körperzellen, Medizin-Ethik Band 5, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [14] Watson JD (1990) Science 248:44
- [15] Schmidt RD (1993) Nachr Chem Tech Lab 41:720
- [16] Singer M, Berg P (1991) Gene und Genome, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- [17] Gassen HG, Minol K (1996) Gentechnik, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- [18] Wagner H, Kuhn R, Hofstetter S (1989) In: Wagner H, Blasius E (Hrsg.) Praxis der elektrophoretischen Trennung, Springer-Verlag Heidelberg
- [19] Martin R (1996) Elektrophorese von Nucleinsäuren, Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- [20] Darling DC, Brickell PM (1994) Nucleinsäure-Blotting, Labor im Fokus, Spektrum AkadVerlag Heidelberg
- [21] Eagles J, Javanaud C, Self R (1984) Biomed Mass Spectrom 11:41
- [22] Triolo A, Aramone FM, Raffaelli A, Salvadori P (1997) J Mass Spectrom 32:1186
- [23] Wu KJ, Shaler TA, Becker CH (1994) Anal Chem 66:1637
- [24] Griffin TJ, Tang W, Smith LM (1997) Nature Biotechnol 15:1368

- [25] Paulus A, Ohms JI (1990) *J Chromatogr* 507:113
- [26] Heiger DN, Cohen AS, Karger BL (1990) *J Chromatogr* 516:33
- [27] Cohen AS, Najarian DR, Karger BL (1990) *J Chromatogr* 516:49
- [28] Roed L, Arsky I, Lundanes E, Greibrokk T (1998) *Chromatographia* 47:125
- [29] McKeag M, Brown PR (1978) *J Chromatogr* 152:253
- [30] Perett D (1982) *Chromatographia* 16:211
- [31] Stocchi V, Cucciarini L, Canestrari F, Piacentini MP, Fornaini G (1987) *Anal Biochem* 167:181
- [32] Werner A, Tikhonov YV, Pimenov AM (1987) *J Chromatogr* 421:257
- [33] Grune T, Siems W, Gerber G, Tikhonov YV, Pimenov AM, Toguzov RT (1991) *J Chromatogr* 563:53
- [34] Di Pierro D, Tarazzi B, Perno CF, Bartolini M, Bakstra E, Calio R, Giardina B, Lazzarino G (1995) *Anal Biochem* 231:407

Kapitel 15.12

- [1] Kornfeld R, Kornfeld S (1985) *Ann Rev Biochem* 54:631
- [2] Mulder H, Dideberg F, Schachter H, Spronk BA, De Jonk-Brink M, Kamerling MP, Vliegenthart JFG (1995) *Eur J Biochem.* 232:272
- [3] Hokke CH, Damm JB, Kamerling JP, Vliegenthart JFG (1993) *FEBS Lett* 329:29
- [4] Morelle W, Strecker G (1998) *J Chromatogr B* 706:101
- [5] Kobota A (1979) *Anal Biochem* 199:1
- [6] Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Jaques A, Parekh R (1993) *Biochemistry* 32:679
- [7] Gey MH, Unger KK (1996) *Fresenius J Anal Chem* 356:488
- [8] Parker N, Finnie IA, Raouf AH, Ryder SD, Campbell BJ, Tsai HH, Iddon D, Milton JD, Rhodes JM (1993) *Biomed Chromatog* 7:68
- [9] Townsend RR (1991) *GBF Monographs* 15:147
- [10] Van der Hoeven RAM, Hofte AJP, Tjaden UR, Van der Greef J, Torto N, Gorton L, Marko-Varga G, Bruggink C (1998) *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:69
- [11] Rouse JC, Strang A-M, Yu W, Vath JE (1998) *Anal Biochem* 256:33
- [12] Hakomori S (1964) *J Biochem* 55:205
- [13] Geyer R, Geyer H, Kühnhardt S, Mink W, Stirm S (1982) *Anal Biochem* 121:263
- [14] Hannsson GC, Bouhours J-F, Karlsson H, Carlstedt I (1991) *Carbohydr Res* 221:179
- [15] DellA, Carman NH, Tiller PR, Thomas-Oates JE (1988) *Biomed Environ Mass Spectrom* 16:19
- [16] Dallinga JW, Heerma W (1991) *Biolog Mass Spectrom* 20:99
- [17] Feng R, Konishi Y (1992) *Anal Chem* 64:2090
- [18] Sible EM, Brimmer SP, Leary JA (1997) *J Am Soc Mass Spectrom* 8:32
- [19] Stahl B, Steup M, Karas M, Hillenkamp F (1991) *Anal Chem* 63:1463
- [20] Naven TJP, Harvey DJ, Brown J, Critchley G (1997) *Rapid Commun Mass Spectrom* 11:1681
- [21] Kaufmann R, Wingerath T, Kirsch D, Stahl W, Sies H (1996) *Anal Biochem* 238:117

- [22] Yamagaki T, Ishizuka Y, Kawabata S, Nakanishi H (1997) Rapid Commun Mass Spectrom 11:527
- [23] Garozzo D, Nasello V, Spina E, Sturiale L (1997) Rapid Commun Mass Spectrom 11:1561
- [24] Weber DS, Goux WJ (1992) Carbohydr Res 233:65
- [25] De Beer T, Van Zuylen CWEM, Hard K, Boelens R, Kaptein R, Kamerling JP, Vliegenthart JFG (1994) FEBS Lett 348:1

Kapitel 15.13

- [1] Folch J, Schneider HA (1941) J Biol Chem 137:51
- [2] Feola M, Simoni J, Canizaro P, Tran L, Raschbaum G, Behal F (1988) Surg Gynecol Obstet 166:211
- [3] Hansson P, Caron M, Johnson G, Gustavsson L, Alling C (1997) Alcoholism Clin Exp Res 21:108
- [4] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GM (1957) J. Biol Chem 226:497
- [5] Freeman CP, West D (1966) J Lipid Res 7:324
- [6] Rustenbeck I, Lenzen S (1990) J Chromatogr 525:85
- [7] Aitzetmüller K (1975) J Chromatogr 113:231
- [8] Kuhnz W, Zimmermann B, Nau H (1985) J Chromatogr 344:309
- [9] Gey MH (1988) Acta Biotechnol 8:197
- [10] Heinze B, Kynast G, Dudenhausen JW, Schmitz C, Saling E (1988) Chromatographia 25:497
- [11] Samet JM, Friedman M, Henke DC (1989) Anal Biochem 182:32
- [12] Van der Meeren P, Vanderdeelen J, Huyghebaert G, Baert L (1992) Chromatographia 34:557
- [13] Wieder T, Fritsch M, Haase A, Geilen CC (1994) J Chromatogr 652:9
- [14] Bünger H, Pison U (1995) J Chromatogr 672:25
- [15] Gunnarsson T, Karlsson A, Hansson P, Johnson G, Alling C, Odham G (1998) J Chromatogr 705:243
- [16] Evans JE, McCluer RH (1987) Biomed Environ Mass Spectrom 14:149
- [17] Li C, Yergey JA (1997) J Mass Spectrom 32:314
- [18] Pollesello P, Eriksson O, Höckerstedt K (1996) Anal Biochem 236:41
- [19] Bosco M, Culeddu N, Toffanin R, Pollesello P (1997) Anal Biochem 245:38

Sachwortverzeichnis

A

AAS-Gerät	250
Absorption	246, 264, 266, 276
Acetylsalicylsäure	56
Adenin	26
Affinitätschromatographie	167
Affinitätsmatrix	169
Affinity Chromatography	167
Agarose	159, 168
Albumin	216
Aliphatische Aminosäuren	11
Aminophasen	459
Aminosäureanalytik	426
Aminosäuren	10
Aminosäuresequenz	15, 23
Aminosäurestrukturen	10
Amitriptylin	57
Amphiphiles Molekül	40
Anionenaustausch-LC	156
Antigene	23
Antikörper	23
Aromatische Aminosäuren	11
Arzneimittel	410
Ascorbinsäure	58
Astaxanthin	60
Atomabsorptionsspektrometrie	250
Atomemissionsspektroskopie	247
Atomisatoren	248
Atomisierung	248, 251, 259
Atomlinien	246, 255, 257
Atomspektroskopie	245
Aussalzen	93
Auxochrome	273
Azo-Bindung	61
Azofarbstoffe	59

B

Balanced Density Method	122
Barrel in Needle	85
Basen der Nucleinsäuren	26
Basenpaarung	28 f.
Basische Aminosäuren	10
Basislinientrennung	114
Batch-Adsorption	98
Bathochromie	272
Benzocain	57
Bereichsgrenzen	207
Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	71
Bilirubin	214
Bioanalytik	395, 409
Biochromatographie	158, 485
Biomoleküle	9, 92
Biosensoren	395
Blut	214
Bodenzahl	111
Bromcyan	173
Bubble-Zelle	229

C

Canthaxanthin	60
Celluloseacetat-Folie	215
Ceramid	54 f.
Cerebrosid	54 f.
Chemisch modifizierte stationäre Phasen	128
Chirale Trennsysteme	131
Cholesterin	53 f.
Cholin	52
Chromatographie	107
Chromatogramm	113, 265

Chromatographie-Gele	160	Edman-Abbau	18		
Chromatographische Auflösung	114	Electron Capture Detector	193		
Chromophore	269 f.	Elektroneneinfangdetektor	193 f.		
Citronensäure	58	Elektronenübergänge	267		
Cocain	416, 419	Elektroosmotischer Fluss	230 f.		
Complex-Typ-Glycanketten	38	Elektrophorese	107, 209, 385		
Concanavalin	169	Elektrophoresprinzip	230		
Coomassie	223	ELISPOT-Test	406		
Core Shell Materialien	139	Emission	266		
Covalent Chromatography	172	Emissionsspektrum	255		
Cyclodextrine	132	Enzymgekoppelter Immunabsorptions-Test	402		
Cytosin	26	Enzym-Immunoassay	401		
D					
D- und L-Konfiguration	14	Epitop	24		
Dalton	162	Ethanolamin	52		
DC-Chromatogramm	182	Ethylene Bridged Hybrid	138		
DC-Entwicklungskammer	181	Extraktionstechniken	63		
Deformationsschwingungen	287	F			
Denaturierung	20, 41	Fackel	259		
Detergents	40 f.	Farbstoffe	56		
Dextran	99, 159	Fehler	203		
Dialyse	95	Fermentationsmedien	471, 474		
Dioden-Array-Detektor	278	Festphasenextraktion	72, 74		
Dioxine	420	Festphasenmikroextraktion	82		
Diphenhydramin	57	Fettsäuren	51, 477		
Disk-Elektrophorese	217 f.	Fetuin	504		
Dispersive liquid-liquid		Filmkapillarsäule	189		
microextraction	89	Filtration	100		
Disposable pipette extraction	91	Flammenionisationsdetektor	192		
Disulfidbindung	15	Fließgeschwindigkeit	112		
Disulfidbrücken	221	Flugzeitmassenspektrometer	327		
DNA	25	Fluoreszenz	246		
DNA-Kettenstück	27	Fluoreszenzspektroskopie	281		
DNA-Polymerase	33	Flüssigchromatographie-MS	356		
Doppelhelix	28	Flüssig-Flüssig-Extraktion	66, 99		
Doppelpeaks	126	Folgeionenelektrolyt	219		
Drogen	410	Fouriertransformspektroskopie	292		
Drogen-Analytik	413, 415	Fragmentierungen	331		
Drogentest	406	Frequenz	265		
Dünnschichtchromatographie	180	Fucose	35		
Dünnschichtteilchen	175	Füllapparatur	122		
Durchbruchsfront	124 f.	Fused-Silica-Kapillare	188, 228		
E					
Eddy-Diffusion	111	G			
		Galactose	35		

Gaschromatograph	187	Hydrazinolyse	47
Gaschromatographie	186	Hydrid-Technik	254
Gas-Fest-Chromatographie	186	Hydrophilic Interaction	
Gas-Flüssig-Chromatographie	186	Liquid Chromatography	140
GC-Detektoren	190	Hydrophobchromatographie	165
GC-Kapillar-Säule	188	Hydrophobe Wechselwirkungen	166
Gel	222	Hydrophobe Wechselwirkungs-	
Gelborange	61	Chromatographie	165
Gelpermeationschromatographie	161	Hydrophobic Interaction	
Genauigkeit	204	Chromatography	165
Globuline	216	Hydroxylapatit	160
Glucose	35	Hyperchromie	272
Glucosesensor	398	Hypochromie	272
Glutathion	21, 22, 173, 437	Hypsochromie	272
Glycane	498	I	
Glycane aus Proteinen	46	IEF-Gele	225
Glycan-Markierung	47	Imidazol	172
Glycan-Sequenzierung	43	Immunabwehr	10
Glycerin	51	Immunglobulin G	36
Glycolipide	38	Immunglobuline	24
Glycoproteine	34, 40 f., 495	Immunoassays	399
Goldelekrode	157	Indirekte UV-Detektion	230
Gradientenelution	119	Inductively coupled	
Graphitrohr	252	Plasma - Mass Spectrometry	258
Graphitrohrküvette	253	Induktiv gekoppeltes	
Größenausschluss-		Plasma	248, 258
chromatographie	161, 485	Infrarotspektren	294
Guanin	26	Infrarotspektroskopie	283
H		Infrarotstrahlung	284
Hantelmodel	287	Inositol	52
Harte Ionisationsarten	320	Injektionsventil	120
Headspace	69	Inner-core	37
High Performance Thin		Interface	260
Layer Chromatography	180	Ion Exchange Chromatography	164
High-Mannose-Typ	37	Ionenausschlusschro-	
His-Tag	172	matographie	146, 475
Histidin	171	Ionenaustauschchroma-	
HIV-Test	404	tographie	147, 164, 473
Hochdruckpumpen	118	Ionenchromatographie	150
Hohlkathodenlampe	251, 255	Ionenfallen-Massen-	
Hollow-Fibre LPME	88	spektrometer	328
HPLC-Apparatur	117	I	
HPLC-Trennungen	124	Ionenpaarchroma-	
H-u-Kurve	137	tographie	153, 411, 490
Hybrid-Typ-Glycanketten	37	IR-Banden von Ascorbinsäure	298

IR-Spektrometer	292	Lycopin	60, 271
Isoelektrische Fokussierung	224, 236	Lyophilisation	94
Isoelektrischer Punkt	13, 164, 224	Lysozymbehandlung	92
Isokratische Elution	119	M	
Isotachophorese	219	Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer	326
K		Magnetic Beads	102 f.
Kalibrierung	204	MALDI-TOF-MS-Gerät	336
Kapazitäten schwacher Ionenaustauscher	149	Mannose	35
Kapazitäten starker Ionenaustauscher	148	Massenspektrometer	316
Kapazitätsfaktor	116	Massenspektrometrie	315
Kapillar-Elektrochromatographie	242	Massenspektrum	319
Kapillarelektrophorese	226	Matrix Solid Phase Dispersion	81
Kapillargaschromatographie	188, 479	Matrix unterstützte Laser	
Kapillargelektrophorese	234, 491	Desorption/Ionisation	325
Kapillar-Isotachophorese	235	Membranproteine	39
Kapillarkräfte	181	Metallchelatchromatographie	171
Kapillarzonenelektrophorese	234	Metallothioneine	21, 23, 433
Kernmagnetische Resonanzspektroskopie	300	Methylierungsanalyse	500
Komplementärfarben	269	Micellare Elektrokinetische Chromatographie	237
Kongenere	420	Micellen	40, 239
Kopplungstechniken	343	Microextraction by Packed Sorbents	85
Korngrößenverteilung	121	Mikrobielle Produktsynthese	471
Kovalente Chromatographie	172	Mikrodurchflussküvette	123
Lactatsensor	397	Mikrofiltration	100
Lactoseintoleranz	466	Mikrowellenunterstützte Extraktion	67
Lambert-Beer'sches Gesetz	275	Mittelwert	203
Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie	335	Molecular Imprinting Polymers	104
Lebensmittelfarbstoffe	59	Molekulargewicht	161, 163, 223
Leitelektrolyt	219	Molekülmasse	161
Leitionenelektrolyt	219	Molekülrotationen	285
Lektinchromatographie	169	Molekülschwingungen	285
Lektine	169	Molekülspektroskopie	263
Lidocain	58	Monolithische Trennsäulen	140
Ligandenaustausch-chromatographie	154	N	
Lipide	50	<i>N</i> -Acetylgalactosamin	35
Liquid-Phase Microextraction	87	<i>N</i> -Acetylglucosamin	35
Lokalanästhetika	241	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	35
		Nachsilanisieren	78
		<i>N</i> -glycosidische Bindung	34, 36

Nickel-Chelatchromatographie	171	Polymer	105
Nitriolo-Tri-Essigsäure	171	Polymerasekettenreaktion	31 f.
NMR-Spektrometer	309	Ponceau R	61, 216
Normalphasenchromatographie	128	Poröse Glaskugeln	175
Nucleinsäuren	25	Porous Layer Beads	176
Nucleobasen	455	Post column derivatisation	427
Nucleoside	455	Posttranslationale Modifikationen	382
Nucleotide	27, 488	Potentialsequenz	158
O			
<i>O</i> -glycosidische Bindung	34, 38	Pre Column Derivatisation	429
Oligosaccharide	504	Prinzip der massenspektrometrischen Detektion	193
Omics	381	Probenvorbereitung-Trennmethode	345
Optische Atomemissionsspektroskopie	248	Procain	57
Organische Säuren	471	Proteine	9, 164, 174, 241
Oszillator	288	Proteinstandards	163
P			
Paracetamol	56	Proteinstrukturen	14
Paratop	24	Proteom	382
Peakbasisbreite	114	Proteom-Analytik	383
Peakbreite in halber Höhe	114	Proteomics	381
Peak-Fronting	127	Purge-and-Trap-Methode	69
Peakmaxima	114	Purin	26
Peakprofil	114	Q	
Peak-Tailing	127	Quadrupol	260 f.
Peakverbreiterung	110, 136	Quadrupolmassenspektrometer	328
Peptidbindung	14	Qualitätssicherung	203
Perfusionschromatographie	176	Quanten	266
Pharmaka	56	Quaternärstruktur	18
Pharmaka-Analytik	410-412	Quarzküvette	254
pH-Gradient	225	R	
Phosphatidat	52	Radio-Immunoassay	400
Phosphatidylcholin	52	Redenaturierung	20
Phosphatidylethanolamin	53	Replikation	28, 30
Phosphatidylserin	53	Resonanzlinien	257
Phosphoglyceride	51	Restricted Access Material	103
Phospholipide	51, 511	Retentionszeit	116
Phytochelatine	22, 435	Reversed-Phase-Materialien	130
PIRKLE-Phase	132	Rheodyne-Ventil	120
Plasma	248, 259	RNA	25
Plasma-Flamme	249	Rückführbarkeit	205
Polyacrylamid	221		
Polyaminocarbonsäuren	225		
Polyethylenglycol	99		

S			
Sampler	260	β -Galactosidase	484
Säulenflüssigchromatographie	108	Standardabweichung	203
Säulenfülltechnik	121	Standard-Additionsverfahren	205
Saure Aminosäuren	11	Stir bar sorptive extraction	90
Schwangerschafts-Test	405	Stoffaustauschphänomene	111
SDS-PAGE	220	Streudiffusion	111
SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	220	Strömungsverteilung	111
Sedimentationskoeffizient	97	Strychnin	270
Sekundäre Aminosäure	12	Styrendivinylbenzen	73
Sekundärstruktur	18	Sulfidbindung	15
Selektivität	115, 208		
Sepharose	173	T	
Sequentielle Elution	174	Tandemmassenspektrometer	329
Serin	52	Taq-Polymerase	33
Serum	216	Teilchenfiltration	100
Serumeiweißelektrophorese	214	Teilchengröße	112, 121
Serumproteine	214	Templat	105
Seveso-Dioxin	420	Tertiärstruktur	18
Sialinsäure	35	Tetracain	58
Silicagel	72, 122, 129	Thermoionischer Detektor	194 f.
Single-Drop Microextraction	87	Thermophile Mikroorganismen	483
Size Exclusion Chromatography	162	Thiolhaltige Proteine	174
Skimmer	260	Thiol-Sepharose	174
Slab gel Elektrophorese	211	Thiolspecies	437
Slurry	122	Thymin	26
Sodium Dodecylsulfate	220	Tocopherole	59
Solubilisierung	40	Totzeit	113, 115
Soxhlet-Extraktion	65	Toxizität von Dioxinen	425
Spaltungsspezifität von Proteasen	387	Toxizitätsäquivalentfaktoren	425
Solid Phase Extraction	79 f.	Trägerelektrophorese	213
Spektralbereiche	267	Trägerfreie Elektrophorese	211
Spektrallinien	246	Trägergas	187
Spektralphotometer	277 f.	Transkription	31
Spektroskopie	263	Translation	31
Spektrum	265	Trennimpedanz	116
Spezifität	208	Trennkapillare	228
Sphingomyelin	53	Trennmethode - Massenspektrometrie	355
Sphingosin	51	Trennmethode - Spektroskopie	371
Split/Splitless-Injektion	187	Trennmethode - Trennmethode	348
Squalen	53 f.	Trennphase (HILIC)	141
β -Faltblatt	18	Trennprozess	109
		Trennsäule	120, 122
		Trennschärfe	207
		Trennstufenhöhe	111

U			
Überkritische Fluidextraktion	68	Vitamin E	59
UHPLC-Trennphasen	138	Vitamine	56-59
Ultra Fast HPLC	134		
Ultrafiltration	100	W	
Ultraschallunterstützte		Wärmeleitfähigkeitsdetektor	196
Extraktion	68	Weiche Ionisation	322
Ultrazentrifugation	96	Weizenkeimagglutinin	170
Uracil	26	Wellenlänge	265
UV/VIS-Spektroskopie	264	Wellenzahl	284
V		Welle-Teilchen-Dualismus	265
Van-Deemter-Gleichung	110	Wheatstone'sche	
Van-Deemter-Kurve	112, 137	Brückenschaltung	197
Verbrennungsflammen	252	Wildlachse	60
Verteilungskoeffizient	64		
Viscosity Method	122	Z	
		Zonenelektrophorese	213
		Zuckeranalytik	466