

Manfred H. Gey

Instrumentelle Analytik und Bioanalytik

Biosubstanzen, Trennmethoden,
Strukturanalytik, Applikationen

3. Auflage

Springer Spektrum

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	N-glycosidische Bindung	36
2.3.1.2	O-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 Lösungsmittlextraktion	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	Säulenfulltechnik	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 Serumeiweißelektrophorese	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 Elektrophoreseprinzip	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 Oszillator, Auswahlregeln	288
10.4.2.6	Geräteaufbau und Probenpräparation	290
10.4.3	Fouriertransformspektroskopie (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 Feildesorption	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 n-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-per-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	Ort/io-Phthaldialdehyd	430
15.4.3.2	Phenylisothiocyanat	430
15.4.3.3	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid	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-Spaltprodukten	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