

# 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 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.

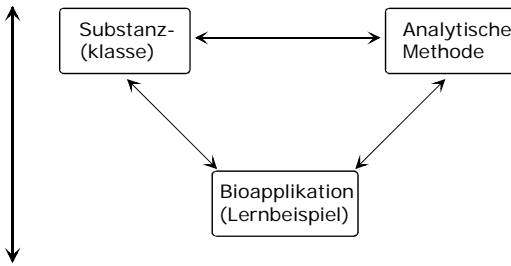
Die Isolierung, Reinigung, qualitative und quantitative Analyse von Proteinen und Enzymen, Glycoproteinen, Oligosacchariden, Nucleinsäuren, Lipiden und anderer biologischer Substanzen ist Gegenstand der Bioanalytik. Das dafür eingesetzte Arsenal an chromatographischen, elektrophoretischen und spektroskopischen 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.

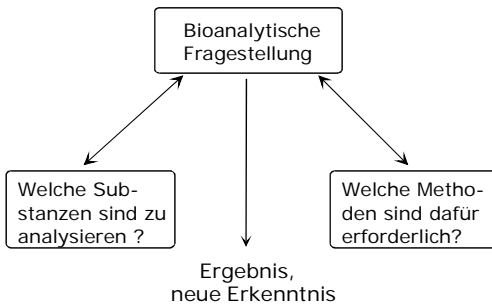
Die Abbildung 1.1 veranschaulicht dieses Konzept und soll als eine Art Leitfaden dienen. Zuerst müssen die theoretischen und praktischen Grundlagen einer Analysenmethode erlernt werden, um sie erfolgreich praktizieren zu können. Dabei soll im ersten Schritt der Methodenanwendung von einer bekannten und 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 unbekanntes 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 ganz 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).

Damit soll dem „Nicht-Biowissenschaftler“ ein erster Einstieg in die einfachen Grundlagen der (analytischen) Biochemie vermittelt werden. Das Lesen und 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, und in Methoden zur Reinigung und Anreicherung von Biopolymeren (Proteinen). An den Beispielen Lysozymbehandlung, Aussalzen, Lyophilisation, Dialyse, Ultrazentrifugation, Batch-Adsorption, Flüssigflüssig-Extraktion und Filtration werden ihre Prinzipien und Funktionsweisen kurz und anschaulich dargestellt. Ohne eine exakte Probenvorbereitung und Probenkonzentrierung ist der Einsatz sehr leistungsfähiger und empfindlicher instrumenteller Analysemethoden meist fehlerhaft, nicht zielführend und oft zwecklos.

Einen besonderen Schwerpunkt bilden die chromatographischen Trennmethode, wobei ein Hauptaugenmerk auf der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC: *high performance liquid chromatography*) liegt. Sie wurde in den 60-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.

Ein Kapitel widmet sich der Flüssigchromatographie von organischen und anorganischen Ionen mit unterschiedlichen Trennsystemen 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.

Zur Analyse von hochmolekularen Biomolekülen wurden zu Beginn der 80-er Jahre geeignete hydrophile Silicagele und Polymere ohne denaturierend wirkende Eigenschaften synthetisiert. Durch die Herstellung dieser „Biopolymer-Trennsäulen“ und mit der Einführung der FPLC (*fast protein liquid chromatography*) wurde innerhalb der Flüssigchromatographie das Gebiet der Biochromatographie („BioLC“) etabliert. 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, die für biologische Substanzen eingesetzt werden, sind die kovalente Chromatographie (CC: *covalent chromatography*), die Perfusionschromatographie oder die Chromatographie an porösen Gläsern.

Das Chromatographie-Kapitel wird durch Darstellungen der Grundprinzipien der Dünnschichtchromatographie (TLC: *thin layer chromatography*) und der Kapillargaschromatographie (CGC: *capillary gas chromatography*) vervollständigt. 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. Schließlich werden noch ausgewählte Methoden und Maßnahmen zur Qualitätssicherung chromatographischer Verfahren (Fokus: HPLC, CGC) kurz dargestellt und erläutert.

Das Gebiet der Elektrophorese 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 Tiselius bekannt wurde, gehört zu den weitverbreitetsten Standardmethoden in der Proteinanalytik und -forschung. Im Mittelpunkt stehen die Serumweißelektrophorese (CAF: „Celluloseacetatfolien“-Elektrophorese), SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) und die IEF (*isoelectric focussing*).

Gegenüber der Kapillarelektrophorese, die seit Ende der 80-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 elektropheretischen 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. Das eigentliche Phänomen der CE, der elektroosmotische Fluss (EOF: *electroosmotic flow*), bewirkt, dass sowohl negativ als auch positiv geladene Moleküle während eines Analysenlaufs innerhalb der Kapillare getrennt und in einem Elektropherogramm aufgezeichnet werden können.

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 funktionelle 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 unbekannt 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  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Techniken sind für die Aufklärung komplizierter Molekülstrukturen unverzichtbar und werden in ihren Grundprinzipien kurz dargestellt.

Im Abschnitt 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 Spektromertypen 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 80-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. Aufbau und die apparativen Unterschiede zwischen einem Linearen TOF- und einem Reflektron-TOF-Gerät werden kurz aufgezeigt.

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

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 u.a. für die Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten und in der Umweltanalytik besonders wichtig ist.

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 „Probenvorbereitung-Trennmethode“ (z.B. 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. Ein weiteres Kapitel ist mit „Selektive Bioanalytik“ überschrieben und dient der Einführung in bereits fest etablierte bioanalytische Methoden (Biosensoren, Immunoassays) und in die zukünftige Bioanalytik der Proteine (Proteomics).

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

Das abschließende Kapitel „Angewandte Bioanalytik“ beinhaltet ausgewählte Applikationen aus den Gebieten „Große Biomoleküle“ und „Kleine Biosubstanzen“, die u.a. aus eigenen analytischen Arbeiten resultieren und aktuell sind.

Innerhalb der niedermolekularen Biosubstanzen werden Analysemethoden zur Bestimmung und strukturellen Charakterisierung von thiolhaltigen Peptiden (Glutathion) und zur Reinigung von Metallothioneinen vorgestellt.

Im zweiten Beispiel werden flüssigchromatographische (RP- und Ionenpaar-HPLC) und kapillarelektrophoretische Trennsysteme für die Nucleobasen und Nucleoside demonstriert. An Hand verschiedener Extrakte aus menschlichen Zellen und Geweben werden die Präsenz und Verteilung dieser biologischen Substanzen gegenübergestellt und diskutiert.

Ein zentraler Abschnitt beinhaltet die Analytik von mono- und oligomeren Kohlenhydraten. Besonders empfindlich und effizient ist die HPAEC-PAD-Technik, aber auch Aminophasen werden weiterhin in der Zuckanalytik von Fermentationsmedien und verschiedenen Nahrungsmitteln sowie innerhalb der Auftrennung isolierter Glycanstrukturen aus Glycoproteinen mit Erfolg eingesetzt.

Das vierte Applikationsgebiet bezieht sich auf die Analytik von organischen Säuren, die im Vergleich zu den Kohlenhydraten mit ähnlichen Trennsystemen bestimmt werden.

Im Kapitel der großen Biomoleküle wird die Isolierung, Konzentrierung und Reinigung von thermostabilen Enzymen, die durch Fermentation mit Hilfe thermophiler Mikroorganismen synthetisiert wurden, beschrieben.

Innerhalb der zweiten Applikation werden flüssigchromatographische (Ionenpaarchromatographie) und kapillarelektrophoretische Trennungen (Kapillargel-elektrophorese) von Oligonucleotiden vorgestellt. An Hand der Analyse verschiedener Restriktionsfragmente aus Sequenzierungsreaktionen von DNA-Molekülen wird die hohe Trenneffizienz der Kapillargelelektrophorese demonstriert. Die Gelelektrophorese besitzt nach wie vor hohe Priorität auf diesem Gebiet und fand vor allem innerhalb der Sequenzierung des menschlichen Genoms (*human genom project*) ein breites Anwendungsgebiet.

Umfangreicher sind die Ausführungen im dritten Abschnitt zur Analytik der Oligosaccharide (Glycane) von Glycoproteinen. Dabei werden die Aussagemöglichkeiten von enzymatischen sowie von chromatographischen (HPLC, SEC, HPAEC-PAD) und strukturanalytischen Methoden (NMR, LC-ESI-MS, GC-MS, MALDI-MS, MALDI-PSD) dargestellt und hinsichtlich ihrer Beiträge und Informationen zur Glycan-Sequenzierung und Strukturaufklärung der Kohlenhydratketten von Glycoproteinen aufgezeigt.

Der vierte Abschnitt beinhaltet neben der Darstellung verschiedener Applikationen zur Analyse von Lipidfraktionen insbesondere Diskussionen über Löslichkeits-, Trenn- und Detektionsprobleme bei der flüssigchromatographischen Bestimmung von Phospholipiden.