

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
2.2	Nucleinsäuren	24
2.2.1	Strukturen	24
2.2.2	Doppelhelix, Basenpaarung und Replikation	27
2.2.3	Translation und Transkription	30
2.2.4	Die Polymerasekettenreaktion	30
2.3	Glycoproteine.....	33
2.3.1	Strukturen	33
2.3.1.1	N-glycosidische Bindung.....	35
2.3.1.2	O-glycosidische Bindung.....	37
2.3.2	Isolierung von Glycoproteinen aus Membranen.....	37
2.3.3	Enzymatische Sequenzierung der Glycane.....	42
2.3.4	Freisetzung der Glycane aus Proteinen.....	45
2.3.4.1	Enzymatische Isolierung.....	45
2.3.4.2	Hydrazinolyse	46
2.3.5	Markieren der Glycane	46
2.3.5.1	Fluoreszenzmarkierung mit 2-AB und BAP	47
2.3.5.2	Radioaktive Markierung	48

2.4	Lipide	49
2.4.1	Strukturen	49
2.4.2	Biosyntheseprozesse	53
2.4.2.1	Cholesterin und Squalen	53
2.4.2.2	Ceramid und Cerebrosid	54
2.5	Literatur	55
3	Präanalytische Methoden	57
3.1	Einführung	57
3.2	Extraktionstechniken	57
3.2.1	Soxhlet-Extraktion	59
3.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion	60
3.2.3	Mikrowellenunterstützte Extraktion	61
3.2.4	Ultraschallunterstützte Extraktion	62
3.2.5	Überkritische Fluidextraktion	62
3.2.6	Headspace- und Purge-and-Trap-Technik	63
3.2.7	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion	65
3.2.8	Festphasenextraktion	66
3.2.8.1	Eigenschaften und Struktur von Silicagelen	66
3.2.8.2	Polymermaterialien	67
3.2.8.3	Prinzip der Festphasenextraktion	68
3.2.8.4	Sorbentien und Trennsysteme in der SPE	72
3.2.8.4.1	SPE mit Normalphasen (Adsorptions-SPE)	72
3.2.8.4.2	SPE mit chemisch gebundenen Phasen	73
3.2.8.4.3	SPE mit Reversed-Phase- Materialien	74
3.2.8.4.4	SPE mit Anionenaustauschern	74
3.2.8.4.5	SPE mit Kationenaustauschern	75
3.2.9	Matrix solid phase dispersion	75
3.2.10	Festphasenmikroextraktion	76
3.3	Reinigung, Anreicherung von Biomolekülen	79
3.3.1	Lysozymbehandlung	79
3.3.2	Aussalzen	80
3.3.3	Lyophilisation	81
3.3.4	Dialyse	82
3.3.5	Ultrazentrifugation	83
3.3.6	Batch-Adsorption	85
3.3.7	Flüssig-Flüssig-Extraktion – Erhalt der biologischen Aktivität	86
3.3.8	Filtration	87
3.3.8.1	Mikrofiltration	88
3.3.8.2	Ultrafiltration	88
3.4	Literatur	89

4 Chromatographie	91
4.1 Einführung und Systematik.....	91
4.2 Säulenflüssigchromatographie.....	92
4.2.1 Grundlagen des Trennprozesses.....	93
4.2.1.1 Darstellung des Trenneffektes in einer Chromatographiesäule.....	93
4.2.1.2 Peakverbreiterung in der Säule und Van-Deemter-Gleichung.....	94
4.2.1.3 Peakverbreiterung außerhalb der Säule.....	97
4.2.1.4 Kenngrößen und Aussagen des Chromatogramms.....	97
4.2.2 Apparativ-methodische Grundlagen.....	101
4.2.2.1 Aufbau einer HPLC-Apparatur.....	101
4.2.2.1.1 Hochdruckpumpen.....	102
4.2.2.1.2 Injektionssysteme.....	104
4.2.2.1.3 Trennsäulen und stationäre Phasen.....	104
4.2.2.1.4 Säulenfülltechnik.....	105
4.2.2.1.5 Detektoren mit Mikrodurchflussküvette.....	107
4.2.2.2 Praktische Probleme der HPLC-Trennungen.....	108
4.2.3 Trennsysteme.....	112
4.2.3.1 Normalphasenchromatographie.....	112
4.2.3.2 Chemisch modifizierte stationäre Phasen.....	112
4.2.3.3 Chirale Trennsysteme.....	114
4.3 Flüssigchromatographie von Ionen.....	116
4.3.1 Ionenausschlusschromatographie.....	117
4.3.2 Ionenaustauschchromatographie.....	118
4.3.3 Ionenchromatographie.....	121
4.3.4 Ionenpaarchromatographie.....	124
4.3.5 Ligandenaustauschchromatographie.....	125
4.3.6 Anionenaustauschchromatographie (HPAEC-PAD).....	127
4.4 Biochromatographie.....	129
4.4.1 Chromatographie an Hydroxylapatit.....	131
4.4.2 Größenausschlusschromatographie.....	132
4.4.3 Ionenaustauschchromatographie.....	134
4.4.4 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie.....	135
4.4.5 Affinitätschromatographie.....	137
4.4.6 Kovalente Chromatographie.....	141
4.4.7 Chromatographie an porösen Glaskugeln.....	144
4.4.8 Perfusionschromatographie.....	144
4.5 Dünnschichtchromatographie.....	145
4.5.1 Trennsysteme.....	145
4.5.2 Probenaufgabe, Entwicklung und Visualisierung.....	146
4.5.3 Auswertung von DC-Chromatogrammen.....	147
4.5.4 Applikationen.....	148

4.6	Gaschromatographie	151
4.6.1	Aufbau eines Gaschromatographen.....	151
4.6.2	Trägergase	152
4.6.3	Injektionssysteme	152
4.6.4	Trennsäulen und stationäre Phasen.....	153
4.6.5	Detektoren	155
4.6.5.1	Flammenionisationsdetektor	157
4.6.5.2	Massenspektrometrischer Detektor.....	158
4.6.5.3	Elektroneneinfangdetektor	158
4.6.5.4	Thermoionischer Detektor	159
4.6.5.5	Wärmeleitfähigkeitsdetektor.....	161
4.6.5.6	GC-Detektoren im Vergleich.....	162
4.6.6	Grundlagen des Trennprozesses	163
4.6.7	Optimierung gaschromatographischer Trennungen	164
4.6.8	Applikationen	165
4.7	Qualitätssicherung in der Analytik (LC, GC)	166
4.7.1	Qualitätsbegriff.....	166
4.7.2	Definitionen zur Qualitätssicherung.....	167
4.7.3	Fehler, Mittelwert, Standardabweichung.....	167
4.7.4	Kenngrößen der Genauigkeit.....	167
4.7.5	Kenngrößen der Kalibrierung und Kalibrierfunktion.....	167
4.7.6	Rückführbarkeit.....	168
4.7.7	Standard-Additionsverfahren	169
4.7.8	Bereichsgrenzen der Methode	170
4.7.9	Trennschärfe.....	171
4.8	Literatur	171
5	Elektrophorese	173
5.1	Einführung und Historisches.....	173
5.2	Theorie der Elektrophorese.....	174
5.3	Slab gel Elektrophorese	175
5.3.1	Trägerfreie versus Slab gel Elektrophorese.....	175
5.3.2	Zonenelektrophorese	177
5.3.3	Serumeiweißelektrophorese.....	178
5.3.4	Disk-Elektrophorese	181
5.3.5	Isotachophorese	183
5.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	184
5.3.7	Isoelektrische Fokussierung	188
5.4	Kapillarelektrophorese.....	190
5.4.1	Apparative Grundlagen	190
5.4.1.1	Aufbau einer Kapillarelektrophorese- Apparatur	190
5.4.1.2	Injektionstechniken.....	191
5.4.1.3	Trennkapillaren.....	192
5.4.1.4	Detektion.....	193

5.4.2	Trennphänomene	194
5.4.2.1	Elektrophoreseprinzip	194
5.4.2.2	Elektroosmotischer Fluss	195
5.4.3	Trennmechanismen	198
5.4.3.1	Kapillaronenelektrophorese	198
5.4.3.2	Kapillargelelektrophorese	198
5.4.3.3	Kapillar-Isotachophorese	199
5.4.3.4	Isoelektrische Fokussierung in Kapillaren	200
5.4.3.5	Micellare Elektrokinetische Chromatographie	201
5.4.4	CE-Applikationen	204
5.5	Kapillar-Elektrochromatographie	206
5.6	Literatur	207
6	Molekülspektroskopie	211
6.1	Einführung in die Spektroskopie	211
6.2	UV/VIS-Spektroskopie	212
6.2.1	Welle-Teilchen-Dualismus des Lichtes	213
6.2.2	Spektralbereiche und Spektrenstrukturen	215
6.2.3	Komplementärfarben und Chromophore	217
6.2.4	Verschiebungen der Wellenlängen im Absorptionsspektrum	220
6.2.5	Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Substanz	222
6.2.6	Lambert-Beer'sches Gesetz	223
6.2.7	Aufbau eines Spektralphotometers	225
6.2.8	Applikationen	227
6.3	Fluoreszenzspektroskopie	229
6.4	Infrarotspektroskopie	231
6.4.1	Historisches	231
6.4.2	Methodische und theoretische Grundlagen	231
6.4.2.1	Infrarotstrahlung im elektromagnetischen Spektrum	232
6.4.2.2	Molekülschwingungen und -rotationen	233
6.4.2.3	Hantelmodell	235
6.4.2.4	Harmonischer vs. anharmonischer Oszillator, Auswahlregeln	236
6.4.2.6	Geräteaufbau und Probenpräparation	238
6.4.3	Fouriertransformspektroskopie (FTIR)	240
6.4.4	Ausgewählte Infrarotspektren	242
6.4.4.1	IR-Spektrum von Paraffin	242
6.4.4.2	IR-Spektrum von Aceton	243
6.4.4.3	IR-Spektren von Ascorbinsäure	244
6.4.4.4	IR-Spektren von Folien	246
6.5	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie	248
6.5.1	Magnetfeld, Kernanregung und Kernspin	248
6.5.2	Resonanzbedingung	252

6.5.3	Relaxation	253
6.5.4	Impulsverfahren	254
6.5.5	Chemische Verschiebung	254
6.5.6	Spin-Spin-Kopplung	255
6.5.7	Aufbau eines NMR-Spektrometers	257
6.5.8	Strukturaufklärung	258
6.6	Massenspektrometrie	261
6.6.1	Aufbau eines Massenspektrometers	261
6.6.1.1	Einlasssystem	262
6.6.1.2	Ionenquelle	263
6.6.1.3	Trennsystem	263
6.6.1.4	Detektor („Auffänger“)	264
6.6.1.5	Massenspektrum	265
6.6.2	Harte Ionisationsarten	266
6.6.3	Weiche Ionisationen	267
6.6.3.1	Thermospray Ionisation	268
6.6.3.2	Chemische Ionisation	268
6.6.3.3	Fast Atom Bombardement	269
6.6.3.4	Feldionisation	270
6.6.3.5	Feldesorption	270
6.6.3.6	Electrospray	270
6.6.3.7	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck ...	271
6.6.3.8	Atmosphärendruck Photoionisation	271
6.6.3.9	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation ...	271
6.6.4	Spektrometertypen	272
6.6.4.1	Magnetfeld-Sektorfeld-Massenspektrometer	272
6.6.4.2	Flugzeitmassenspektrometer	274
6.6.4.3	Quadrupolmassenspektrometer	274
6.6.4.4	Ionenfallen-Massenspektrometer	275
6.6.4.5	Tandemmassenspektrometer	276
6.6.5	Spektrenvergleich zwischen harter und weicher Ionisation	276
6.6.6	Fragmentierungen in der Massenspektrometrie	277
6.7	Laser Desorptions/Ionisations-MS	282
6.7.1	Aufbau von MALDI-TOF-MS-Geräten	283
6.7.2	Probenpräparation	285
6.7.3	Molekulargewichtsbestimmung mittels MALDI-MS	287
6.8	Literatur	288
7	Atomspektroskopie	291
7.1	Einführung in die Atomspektroskopie	291
7.2	Atomemissionsspektroskopie	293
7.2.1	Flammen-Atomemissionsspektroskopie	293
7.2.2	Induktiv-gekoppeltes Plasma-OES	294

7.3	Atomabsorptionsspektrometrie	296
7.3.1	Aufbau eines AAS-Gerätes	296
7.3.1.1	Funktionsweise einer Hohlkathodenlampe	297
7.3.2	Atomisierung	297
7.3.2.1	Flammen-Absorptionsspektrometrie	297
7.3.2.2	Graphitrohr-Technik	298
7.3.2.3	Hydrid-Technik in der AAS	300
7.3.3	Monochromator und Detektor	300
7.3.4	Änderung der Spektrenverläufe in der AAS	301
7.3.5	Qualitative und quantitative Analyse von Elementen	302
7.4	ICP-MS	304
7.4.1	Prinzipieller Aufbau eines ICP-MS-Gerätes	304
7.4.2	Atomisierung im ICP-MS	305
7.4.3	Interface im ICP-MS	306
7.4.4	Quadrupol als Trennsystem im ICP-MS	307
7.4.5	Detektion	307
7.5	Literatur	308
8	Kopplungstechniken	309
8.1	Einführung und Systematik	309
8.2	Probenvorbereitung – Trennmethode	311
8.2.1	Head-space – GC und Purge-and-trap – GC	311
8.2.2	SPE – GC und SPE – LC	311
8.2.3	SPME – GC und SPME – LC	313
8.3	Trennmethode – Trennmethode	314
8.3.1	LC – TLC	314
8.3.2	LC – LC (Säulenschalttechnik)	315
8.3.3	GC – GC (Säulenschalttechnik)	318
8.3.4	IEF – SDS-PAGE	319
8.3.5	MS – MS	320
8.4	Trennmethode - Massenspektrometrie	321
8.4.1	Gaschromatographie – Massenspektrometrie	321
8.4.2	Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie	322
8.4.2.1	„Klassische“ LC-MS-Kopplungen	323
8.4.2.1.1	Moving-Belt Interface	323
8.4.2.1.2	μ-LC-Direkteinlass-MS	324
8.4.2.1.3	LC-Thermospray-MS	325
8.4.2.1.4	LC-Fast-Atom-Bombardement-MS	327
8.4.2.1.5	LC-Particle-Beam-MS	327
8.4.2.2	LC – Atmosphärendruck – MS	329
8.4.2.3	LC – Electrospray – MS	331
8.4.2.4	Applikationen der LC-MS-Kopplungen	333
8.4.3	LC – MALDI – TOF – MS	335
8.4.4	CE – MS	336

8.5	Trennmethode – Spektroskopie	337
8.5.1	LC – DAD	337
8.5.2	LC – pcr – VIS	340
8.5.3	CGC – FTIR	341
8.5.4	LC – NMR	343
8.6	Literatur	345
9	Selektive Bioanalytik	347
9.1	Biosensoren	347
9.1.1	Einführung	347
9.1.2	Lactatsensor	349
9.1.3	Glucosesensor	350
9.2	Immunoassays	351
9.2.1	Einführung	351
9.2.2	Immunoassay versus Immunosensor	351
9.2.3	Radio-Immunoassay	352
9.2.4	Enzyme-Immunoassay	353
9.2.5	Enzymegekoppelter Immunabsorptions-Test	354
9.2.5.1	Kompetitiver ELISA-Test	354
9.2.5.2	Nicht-kompetitiver ELISA-Test	355
9.2.6	HIV-Test	356
9.2.7	Schwangerschafts-Test	357
9.2.8	ELISPOT-Test	358
9.2.9	Drogentest	358
9.3	Proteomics	359
9.3.1	Einführung in die „OMICs“-Techniken	359
9.3.2	Das Proteom und seine Beeinflussung	359
9.3.3	Proteomics versus „klassische“ Proteinanalytik	361
9.3.4	Strategien in der Proteom-Analytik	361
9.3.4.1	Zweidimensionale Elektrophorese	363
9.3.4.2	MALDI – TOF – MS und Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	364
9.3.4.3	LC – ESI – MS/MS	368
9.3.4.4	Ausblick zur Proteomanalytik	371
9.4	Literatur	371
10	Angewandte Bioanalytik	373
10.1	Metallothioneine, Thiolspecies in Zellen	373
10.1.1	Metallothioneine	373
10.1.2	Phytochelatine	375
10.1.3	Glutathion und Thiolspecies	377
10.1.4	Derivatisierung und Detektion von Thiolspecies	379
10.1.4.1	Ellman’s-Reagenz	379
10.1.4.2	Sanger’s Reagenz	380
10.1.4.3	Substituierte Maleimide	380

10.1.4.4	Monobrombiman	381
10.1.4.5	o-Phthalaldehyd	381
10.1.4.6	Elektrochemische Detektion	382
10.1.5	HPLC von Thiolen und Disulfiden.....	383
10.1.5.1	Kovalente Chromatographie	383
10.1.5.2	„Saure“ Reversed-Phase-HPLC.....	385
10.1.5.3	Electrospray-MS von Glutathion und Metaboliten	387
10.1.5.4	Analyse biologischer Matrices.....	388
10.1.6	Kapillarelektrophorese von Thiolen und Disulfiden	390
10.1.7	Kapillarelektrophorese von Phytochelatinen	392
10.2	Nucleobasen und Nucleoside in Zellen und Geweben.....	395
10.2.1	Reversed-Phase- und Ionenpaarchromatographie	396
10.2.2	Kapillarelektrophorese.....	398
10.3	Zucker in Hydrolysaten und Lebensmitteln.....	399
10.3.1	Chromatographie an Aminophasen	399
10.3.2	HPAEC-PAD-Technik	403
10.3.3	Kapillarelektrophorese.....	405
10.4	Säuren in biotechnologischen Prozessen	406
10.4.1	Organische Säuren in Fermentationsmedien	406
10.4.1.1	Ionenaustauschchromatographie von organischen Säuren.....	408
10.4.1.2	Ionenausschlusschromatographie von organischen Säuren.....	410
10.4.2	Fettsäuren in Hefen und Bakterien	412
10.4.2.1	Modifizierungen und Kapillargaschromatographie	414
10.4.2.2	Kapillargaschromatographie – Massenspektrometrie	417
10.5	Enzyme thermophiler Mikroorganismen	418
10.5.1	Isolierung der Enzymfraktionen	418
10.5.2	Biochromatographie	420
10.6	Nucleotide in Geweben und von DNA-Spaltprodukten	423
10.6.1	Ionenpaarchromatographie	425
10.6.2	Kapillargelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	426
10.7	Glycan-Strukturen von Glycoproteinen	430
10.7.1	Profilanalysen der Glycane.....	432
10.7.1.1	Monosaccharid-Mapping mittels HPAEC-PAD....	432
10.7.1.2	N-Glycan-Trennungen mit speziellen HPLC-Methoden.....	433
10.7.2	Strukturanalysen der Glycane.....	435
10.7.2.1	GC-MS und Methylierungsanalyse.....	435
10.7.2.2	Fast-Atom-Bombardement	437
10.7.2.3	LC-Electrospray-MS.....	438
10.7.2.4	MALDI-TOF-MS	438

10.7.2.5	MALDI-PSD-TOF-MS.....	440
10.7.2.6	¹ H-NMR.....	444
10.8	Phospholipide in biologischen Extrakten.....	446
10.8.1	Flüssigchromatographie.....	446
10.8.2	NMR-Spektroskopie.....	450
10.9	Literatur.....	453
	Kapitel 10.1.....	453
	Kapitel 10.2.....	454
	Kapitel 10.3.....	455
	Kapitel 10.4.....	455
	Kapitel 10.5.....	456
	Kapitel 10.6.....	457
	Kapitel 10.7.....	458
	Kapitel 10.8.....	459