

**Entwicklung  
einer Online-Kopplung der Gelelektrophorese  
mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie  
und deren Anwendung in der Bioanalytik**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Wolfram Brüchert**  
geboren in Bad Kreuznach

Mainz 2007

---

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2003 bis Dezember 2006 am Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie im Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Jörg Bettmer.

Dekan:

████████████████████

1. Berichterstatter:

████████████████

2. Berichterstatter:

██

---

*Mir erscheint es tatsächlich nahezu wie ein Wunder, daß die heutigen Lehrmethoden den heiligen Forschergeist noch nicht zur Gänze erstickt haben; denn gerade dieses zarte Pflänzchen braucht in erster Linie Freiheit, ohne die es unweigerlich zugrundegeht.*

Albert Einstein



---

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Ich danke ...

... meinem Betreuer [REDACTED] für den Freiraum, den er mir in den letzten Jahren gewährt hat, um ein sehr interessantes Thema selbstständig zu bearbeiten sowie seine sehr persönliche und umfassende Unterstützung.

... [REDACTED] für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die nachhaltige Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

... all den Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe, die meinen Weg in den letzten Jahren begleitet haben und von denen jeder auf seine Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

... ganz im Speziellen meinem engsten Vertrauten [REDACTED], dessen Gesellschaft ich in den vielen Stunden im MS-Labor, auf Konferenzen und im privaten Bereich nie missen wollte.

... den Kolleginnen und Kollegen anderer Arbeitsgruppen für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und interessanten Kooperationen, insbesondere [REDACTED] für die Durchführung der Messungen am MALDI-TOF-MS.

... der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“, ohne die Projekte wie das meine nur sehr schwer zu verwirklichen wären.

... meiner Familie für einen Rückhalt, den nur eine so wunderbare Familie wie die meine geben kann.

... meinem Vater für seine grenzenlose Hilfsbereitschaft in all den Jahren meiner universitären Ausbildung und sein Vertrauen, welches ich immer auf meiner Seite wusste.

... meiner wundervollen Frau Daniela für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in den letzten Jahren, die nicht immer einfach waren, aber zu den schönsten meines Lebens zählen.



---

Meiner Mutter  
und  
Daniela





---

## Inhaltsverzeichnis

I	Vorwort .....	1
II	Methodenentwicklung .....	4
II.1	Kopplungstechniken mit der ICP-MS.....	4
II.1.1	Einleitung .....	4
II.1.2	GC-ICP-MS .....	13
II.1.3	LC-ICP-MS.....	14
II.1.4	CE-ICP-MS.....	30
II.1.5	GE-LA-ICP-MS.....	37
II.2	Zielsetzung.....	44
II.3	Beschreibung des Systems .....	45
II.3.1	Konzeption.....	45
II.3.2	Prinzip der kontinuierlichen Elution .....	45
II.3.3	Versuchsaufbau.....	49
II.3.4	Elektrolyte .....	51
II.3.5	Dimensionen des Gels.....	52
II.3.6	Zusammensetzung des Gels.....	53
II.3.7	Das Elutionsmittel.....	54
II.3.8	Die Elutionsfritte .....	54
II.3.9	Die Dialysemembran.....	55
II.3.10	Der Transfer zwischen GE und ICP-MS.....	55
II.3.11	Zerstäuber und Sprühkammer .....	56
II.3.12	Das ICP-MS.....	56
II.3.13	Zusammenfassung der experimentellen Rahmenbedingungen .....	57
II.4	Experimentelles Vorgehen.....	58
II.4.1	Vorbemerkung .....	58

---

II.4.2	Präparation der Gele .....	58
II.4.3	Einbau des Gels in die GE-Apparatur .....	64
II.4.4	Kopplung der GE-Apparatur an das ICP-MS .....	64
II.4.5	Reinigung des Gels .....	65
II.4.6	Herstellung der Proben.....	68
II.4.7	Injektion der Proben.....	69
II.5	Charakterisierung des Systems .....	70
II.5.1	Einführung.....	70
II.5.2	Elutionsprofil.....	70
II.5.3	Effizienz der Trennleistung.....	78
II.5.4	Reproduzierbarkeit .....	92
II.5.5	Empfindlichkeit .....	98
II.5.6	Nachweisgrenze.....	102
II.6	Zusammenfassung .....	106
III	Quantifizierung von DNA-Fragmenten.....	109
III.1	Die DNA und ihre Analytik.....	109
III.1.1	Einführung.....	109
III.1.2	Aufbau der DNA .....	111
III.1.3	Die Notwendigkeit zur Quantifizierung von DNA .....	113
III.1.4	Methoden zur DNA-Quantifizierung.....	115
III.2	Experimentelles Vorgehen .....	120
III.3	Ergebnisse der DNA-Quantifizierung.....	122
III.3.1	Quantifizierung über den Phosphor-Gehalt.....	122
III.3.2	Quantifizierung über externe Kalibration.....	131
III.3.3	Zusammenfassung .....	135
IV	Cisplatin-DNA-Addukte .....	137
IV.1	Cisplatin-DNA-Addukte und ihre Bedeutung .....	137

---

IV.1.1	Einführung.....	137
IV.1.2	Wirkungsweise und Addukte des Cisplatins.....	139
IV.1.3	Analytische Methoden zur Charakterisierung von Cisplatin-DNA-Addukten.....	142
IV.2	Experimentelles Vorgehen.....	145
IV.2.1	Strategie.....	145
IV.2.2	Herstellung der Cisplatin-Oligonukleotid- Addukte.....	146
IV.2.3	Durchführung der MALDI-TOF-MS-Messungen.....	146
IV.3	Ergebnisse der Untersuchungen.....	148
IV.3.1	Trennung von Cisplatin-DNA-Addukten.....	148
IV.3.2	Strukturelle Identifizierung mittels der MALDI- TOF-MS.....	158
IV.3.3	Bestimmung einer Geschwindigkeitskonstanten.....	168
IV.3.4	Quantifizierung mittels der MSIVA.....	172
IV.3.5	Anwendung auf DNA-Fragmente.....	181
IV.3.6	Zusammenfassung.....	183
V	Schlussbetrachtung.....	185
VI	Ausblick.....	189
VII	Anhang.....	191
VII.1	Theoretische Betrachtungen zur Gelelektrophorese.....	191
VII.2	Kurze Einführung der ICP-SFMS.....	194
VII.3	Verwendete Chemikalien.....	200
VII.3.1	Agarosen.....	200
VII.3.2	DNA-Fragmente und Oligonukleotide.....	200
VII.3.3	Puffer-Komponenten.....	200
VII.3.4	Element-Standard-Lösungen.....	200
VII.3.5	Testsubstanzen.....	201

---

VII.3.6	Zertifizierte Referenzmaterialien .....	201
VII.3.7	MALDI-Matrizen und Additive .....	201
VII.3.8	Sonstige .....	202
VII.4	Verwendete Geräte .....	203
VIII	Literatur .....	204

## I Vorwort

„Das kann nicht funktionieren oder es wurde schon von jemand Anderem entwickelt!“. Diesen Satz bekam ich so oder so ähnlich öfter zu hören, als ich vor drei Jahren die Idee einer Online-Kopplung der Gelelektrophorese mit der ICP-MS skizzierte. Nichtsdestotrotz habe ich die Entwicklung eines solchen Systems damals als Gegenstand meiner Dissertationsarbeit in Angriff genommen und nun, drei Jahre später zeigt sich, dass weder das eine noch das andere der Wahrheit entspricht. Das ist es, was ich mit dieser Arbeit im Folgenden belegen möchte.

Durch die Beschäftigung mit dem Einsatz von Kopplungsmethoden in der Elementspeziesanalytik von Biopolymeren während meiner Examensarbeit<sup>1</sup> musste ich feststellen, dass sowohl die Flüssigchromatographie (LC) als auch die Kapillarelektrophorese (CE) erfolgreich zur Untersuchung von Biopolymeren mit der ICP-MS als Detektor einsetzbar sind. Doch die Pionierarbeit auf diesem Gebiet ist geleistet worden, und so ist es nicht weiter verwunderlich, dass in den letzten Jahren eine weitere Trennmethode in den Fokus der bioanorganischen Analytiker geraten ist: die Gelelektrophorese. Da es sich bei der Gelelektrophorese um die Trennmethode der Bioanalytik handelt, war eine solche Entwicklung nur folgerichtig und versprach ein hohes Maß an innovativem Entwicklungspotential. Es war jedoch bis zum Beginn meiner Promotionsarbeit niemandem gelungen, die Gelelektrophorese in einem wirklichen Online-Verfahren, vergleichbar mit den LC- bzw. CE-Kopplungen, mit der ICP-MS zu verbinden und sie damit vollwertig in den Kanon der Kopplungstechniken einzuführen. Zu dem damaligen Zeitpunkt war klar, dass eine solche Kopplung, so sie dann möglich wäre, eine viel versprechende Alternative zu manch anderen Methoden darstellen könnte. Diese Perspektive im Hintergrund, begann ich meine Arbeit an der Entwicklung einer Online-Kopplung der Gelelektrophorese mit der ICP-MS.

Die vielleicht unkonventionelle Gliederung dieser Arbeit spiegelt letztendlich die Genese des Projektes wieder und soll daher kurz erläutert werden. Die Arbeit gliedert sich in drei Hauptteile, jeweils bestehend aus Grundlagen, Experimentellem und Diskussion, die einerseits inhaltlich unabhängig voneinander bestehen können, andererseits eng miteinander verknüpft sind und aufeinander aufbauen.

---

<sup>1</sup> Der Titel der Arbeit lautete „Charakterisierung von Metallothioneinen mit HPLC/ICP-MS-Kopplungstechniken“, wobei es sich bei Metallothioneinen um eine spezielle Form von metallhaltigen Proteinen handelt.

Der erste Teil „Methodenentwicklung“ beschäftigt sich mit dem Prinzip der Kopplung zwischen der Gelelektrophorese und der ICP-MS, deren Realisierung und der Beschreibung der analytischen Eigenschaften des Systems. Da diese neue Kopplungsmethode in den Kanon der bestehenden Kopplungsmethoden eingefügt werden soll und als konsequente Weiterentwicklung verstanden wird, soll die Beschreibung und kritische Diskussion des *status quo* der Kopplungsmethoden mit der ICP-MS Hauptbestandteil der Grundlagen dieses Kapitels sein.

Der zweite Teil schließt nahtlos an den ersten Teil an, wird aber um eine erste konkrete Anwendung der neu entwickelten Kopplung erweitert. Wie in den Grundlagen dieses Teils noch detailliert ausgeführt werden soll, ist die Quantifizierung von DNA nach wie vor eine analytische Herausforderung. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, dass die hervorragenden Quantifizierungseigenschaften der ICP-MS in diesem Bereich wertvolle Erkenntnisse erbringen können, erweiterbar durch die Verwendung der GE als Trennmedium.

Im dritten Teil schließlich soll anhand der Untersuchung von Cisplatin-DNA-Addukten gezeigt werden, welches Potential die neu entwickelte Kopplung für die Aufklärung von biochemisch und medizinisch relevanten Vorgängen hat. Hierzu wird die beschriebene Methode um die Dimension der organischen Massenspektrometrie erweitert, um zusätzlich zur quantitativen Analyse mit der ICP-MS eine Identifizierung durchführen zu können. Cisplatin-DNA-Addukte eignen sich für so gestaltete Untersuchungen in mehrfacher Hinsicht. Erstens besteht noch erheblicher Klärungsbedarf hinsichtlich der vielfältigen Bindungsmechanismen, welche zur Bildung solcher Addukte führen, was unter anderem in den Grundlagen dieses Kapitels beschrieben werden soll. Zweitens zeichnen sich diese Verbindungen durch die simultane Anwesenheit der Elemente Phosphor und Platin aus und sind daher prädestiniert für die Detektion mit der ICP-MS im Spurenbereich. Drittens erlaubt die relative Stabilität dieser Addukte eine massenspektrometrische Identifizierung mittels weicher Ionisierungsmethoden wie der ESI oder der MALDI.

Jeder dieser drei Hauptteile schließt mit einer eigenständigen Diskussion, doch soll im Anschluss an diese drei Teile eine Schlussbetrachtung die entwickelte Methode in ihrer Gesamtheit beleuchten und letztendlich die Frage beantworten, ob die Online-GE-ICP-MS als souveräner Bestandteil der etablierten Kopplungsmethoden gelten kann. Da es sich hierbei um eine vollständig neue Methode handelt und die Zeit einer Doktorarbeit begrenzt ist, möchte ich in einem umfangreichen Ausblick darstellen, wie ich mir die weitere Entwicklung der präsentierten Methode vorstellen könnte.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit habe ich mich dazu entschlossen, theoretische Abhandlungen über die verwendeten Methoden, sofern sie für das Verständnis dieser Arbeit wichtig erscheinen, in einem Anhang beizufügen. So wird der konsequente Fluss dieser Arbeit nicht unterbrochen und die Entscheidung, ob die Theorie der GE sowie der ICP-MS von Interesse ist, kann jeder Leser für sich selbst treffen.

## II Methodenentwicklung

### II.1 Kopplungstechniken mit der ICP-MS

#### II.1.1 Einleitung

Als in den frühen 1960er Jahren die ersten Versuche unternommen wurden, chromatographische Trennmethoden mit einem atomspektroskopischen Verfahren zu koppeln, konnte noch niemand ahnen, welche Erfolgsgeschichte diese Verbindung schreiben würde. Getragen durch die Erkenntnis, dass Elementanalytik im Spuren- und Ultraspurenbereich weit mehr leisten muss als die Bestimmung der Gesamtkonzentrationen bestimmter Elemente, wurden seit dem immer erfolgreichere Anstrengungen unternommen, eine Methodologie zu schaffen, um genau dieses zu bewerkstelligen.

Die Notwendigkeit eines solchen Vorgehens entspringt der Tatsache, dass zwar eine sehr überschaubare Anzahl von verschiedenen chemischen Elementen existiert, diese aber eine schier unendliche Zahl unterschiedlicher Verbindungen bilden können. Was für die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff – also jene, aus welchen organische Materie größtenteils aufgebaut ist – trivial erscheint, gewinnt für die restlichen Elemente des Periodensystems eine gewisse Brisanz. Da die meisten dieser Elemente nur im Spuren- und Ultraspurenbereich an den chemischen Prozessen in der Geosphäre teilnehmen, war die Analytik lange Zeit nicht in der Lage, weder die genaue Rolle dieser Spurenelemente noch deren Reaktionswege zu ermitteln. Zwar konnte bestimmten Elementen eine gewisse Funktion zugeschrieben werden, was mit Hilfe der Elementanalytik mittels atomspektroskopischer Methoden erreicht wurde, doch die Mechanismen mussten im Dunkeln bleiben. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts ist in Tabelle 1 die durchschnittliche elementare Zusammensetzung des menschlichen Körpers angegeben, woraus man erkennen kann, dass vielerlei Elemente in unterschiedlichsten Konzentrationsbereichen an der Konstitution biologischer Materie beteiligt sind.

Aber nicht nur die niedrigen Konzentrationen stellten eine natürliche Erkenntnisbarriere dar, sondern vielmehr auch die Natur dieser Verbindungen. Im Gegensatz zu den organischen Substanzen auf Kohlenstoffbasis, welche sich durch ein hohes Maß an Kovalenz und damit auch thermodynamischer und kinetischer Stabilität ausweisen, bilden viele andere Elemente, allen voran die Metalle, teils labile Komplexe oder zeigen eine variantenreiche Redoxchemie. Dieser Sachverhalt stellt hohe Ansprüche an die Analytik, da neben einer hervorragenden Empfindlichkeit zusätzlich sehr



schonende Analysemethoden entwickelt werden müssen, welche eine Speziesstabilität gewährleisten können.

**Tabelle 1: Durchschnittliche elementare Zusammensetzung des menschlichen Körpers (Auszug) [aus 2]**

Element	Elementsymbol	Masse [g]
Sauerstoff	O	45500
Kohlenstoff	C	12600
Wasserstoff	H	7000
Stickstoff	N	2100
Calcium	Ca	1050
Phosphor	P	700
Schwefel	S	175
Kalium	K	140
Chlor	Cl	105
Natrium	Na	105
Magnesium	Mg	35
Eisen	Fe	4,2
Zink	Zn	2,3
Silicium	Si	1,4
Rubidium	Rb	1,1
Fluor	F	0,8
Zirconium	Zr	0,3
Strontium	Sr	0,14
Kupfer	Cu	0,11
Aluminium	Al	0,10
Antimon	Sb	0,07
Iod	I	0,03
Mangan	Mn	0,02
Vanadium	V	0,02
Selen	Se	0,02
Arsen	As	0,01
Nickel	Ni	0,01
Chrom	Cr	0,005
Cobalt	Co	0,003
Molybdän	Mo	<0,005

---

<sup>2</sup> MERIAN (1984)

In diesem Zusammenhang sehr interessant erscheinen die Halb- und Nichtmetalle, wie Arsen oder Selen, aber auch einige Metalle, wie Blei oder Quecksilber, da diese stabile, kovalente Bindungen zum Kohlenstoff aufbauen können, wodurch die Bildung sehr unterschiedlicher Spezies ermöglicht wird.

Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Art der Elementspezies als erste in den Fokus der Analytiker geraten ist. Kolb et. al. beschreibt 1966 die Kopplung der Gaschromatographie an die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) zur Bestimmung von alkylierten Bleiverbindungen in Benzin<sup>3</sup>. Bemerkenswert an diesem Artikel ist, zusätzlich zu der wissenschaftlichen Leistung, dass bereits der entscheidende Vorteil einer Kopplungsmethode, einer so genannten *hyphenated technique*, gegenüber anderen Analysemethoden explizit beschrieben wird. Diese Passage soll daher im Folgenden zitiert werden.

*„Die Gaschromatographie ist eine ausgezeichnete Trennmethode; es fehlt ihr aber an Aussagekraft für eine sichere Identifizierung der getrennten Komponenten, für die von vornherein die spektroskopischen Methoden besser geeignet sind. Sehr oft ist auch die beste Trennleistung nicht ausreichend, um für eine sichere quantitative Analyse - vor allem für Spuren in Vielkomponentengemischen - eine genügende Abtrennung der interessierenden Komponenten zu gewährleisten. Diese Anforderungen an die Trennleistung sind aber dann nicht erforderlich, wenn es gelingt, selektive Detektoren für die jeweils zu bestimmenden Verbindungen zu finden. Je selektiver dabei ein Detektor ist, desto einfacher gestaltet sich die Analyse, und desto größer ist die Sicherheit der Analyse - aber desto kleiner der Anwendungsbereich. Für eine Vielzahl von unterschiedlichen Problemen sind also eine Vielzahl von selektiven Detektoren erforderlich. Die Anwendung der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) als Detektor für die Gaschromatographie (GC) stellt das selektivste Verfahren dar, um flüchtige Metallverbindungen nach der gaschromatographischen Trennung elementspezifisch nachzuweisen und quantitativ zu analysieren.“ [aus 3]*

Auch wenn Kolb in diesem Artikel die Vorteile einer element-spezifischen Detektion für die Chromatographie aus der Perspektive des Chromatographikers beschreibt, ändert das nichts an der Tatsache, dass die grundlegenden Vorteile einer *hyphenated technique* benannt werden. Durch die Verwendung eines element-selektiven Detektors für die Chromatographie kann zweierlei erreicht werden. Zum einen ist es durch eine selektive Detektion möglich, aus einer Vielzahl von Komponenten in einer Probe nur diejenigen sichtbar zu machen, welche für die entsprechende

---

<sup>3</sup> KOLB et. al. (1966) *Fres. J. Anal. Chem.* **221**, 166-175

analytische Fragestellung von Interesse sind, in diesem Fall bleihaltige Verbindungen. Alle weiteren Komponenten, welche in der Probe enthalten sind, werden durch die element-spezifische Detektion nicht erfasst, wodurch die Interpretation der Analysenergebnisse erheblich erleichtert wird. Dieses führt – aufgrund der überschaubaren Anzahl an Bleiverbindungen in der Probe – zu der Möglichkeit, eine Identifizierung der jeweiligen Komponenten zu erreichen. Dieses Charakteristikum einer *hyphenated technique* gewinnt umso mehr an Bedeutung, je komplexer die Zusammensetzung einer Probe ist, d.h. je mehr unterschiedliche Verbindungen in ihr enthalten sind. Diese Eigenschaft wird im weiteren Verlauf noch ausführlicher beschrieben werden.

Kolb geht mit seiner Aussage aber noch einen Schritt weiter und postuliert den zweiten wichtigen Vorteil der Kopplung einer Separationsmethode an die Atomspektroskopie. Durch die Verwendung eines element-spezifischen Detektors wie der AAS ist es nun möglich eine präzise Quantifizierung der ausgewählten Komponenten durchzuführen. Dies folgt einerseits aus der schon beschriebenen Möglichkeit der Reduzierung analytischer Rohdaten auf das Wesentliche, was nicht nur die Identifizierung erleichtert, sondern natürlich auch eine Quantifizierung ermöglicht. Wesentlich wichtiger aber sind die inhärenten Möglichkeiten der Atomspektroskopie zur Quantifizierung. Zumindest in erster Näherung kann die Signalintensität am Detektor als proportional zur Menge des Elements beschrieben werden, und nicht zur Menge der Elementverbindung. Über die Einschränkungen dieses Prinzips wird später ausführlich diskutiert werden. Als Konsequenz daraus folgt für die quantitative Analyse von unterschiedlichen Elementspezies, dass die Empfindlichkeit für alle Spezies eines Elements gleich und unabhängig von der molekularen Struktur ist. Verglichen beispielsweise mit der UV-Spektroskopie ist es hier nicht notwendig, verbindungsspezifische Korrekturfaktoren einzuführen, welche der Tatsache Rechnung tragen, dass eine Verbindung intensiver absorbiert als die andere. So ist es theoretisch möglich, eine Verbindung zu quantifizieren, ohne die genaue Struktur zu kennen, unter der Voraussetzung, dass bekannt ist, wie viele Atome des analysierten Elements enthalten sind.

Trotz des sehr hohen innovativen Potentials dieser Studie über die GC-AAS-Kopplung durch Kolb et. al. dauerte es noch eine geraume Zeit bis andere Gruppen intensiven Gebrauch von dieser Technik für verschiedene Anwendungen machten. So berichtet beispielsweise Longbottom<sup>4</sup> über die Untersuchung von alkylierten Quecksilberverbindungen, nachdem erkannt

---

<sup>4</sup> LONGBOTTOM (1972) *Anal. Chem.* **44**, 1111

wurde, dass diese hochtoxischen Substanzen biogen durch die Methylierung von anorganischem Quecksilber entstehen können.

Nicht lange danach wurde der Vorteil einer element-spezifischen Detektion auch für die Flüssigchromatographie (LC) erkannt, wodurch ein noch weitaus größeres Spektrum an Möglichkeiten eröffnet wurde. Die mit der GC zu trennenden Analyten müssen leicht flüchtig und thermisch stabil sein, was zu einer starken Einschränkung führt, gerade wenn Elementspezies untersucht werden sollen. Der LC stehen zusätzlich verschiedenste Trennmechanismen zur Verfügung, was, wie sich später noch zeigen wird, sie zu der momentan wichtigsten Trennmethode für die Elementspeziation macht. Die ersten Beschreibungen einer LC-AAS-Kopplung finden sich im Jahre 1973 bei Manahan und Jones<sup>5</sup> sowie bei Yoza und Ohashi<sup>6</sup>. Während die einen mittels Ionenaustausch-LC Komplexe des Kupfers mit verschiedenen organischen Liganden untersuchen, nutzen die anderen die Gelfiltrations-LC zur Bestimmung von EDTA-Komplexen von Natrium und Magnesium.

Nun, da die grundsätzlichen Vorteile einer element-spezifischen Detektion für die Chromatographie erkannt waren, fand die Entwicklung neuer Kopplungsmethoden kein Halten mehr. Es würde den Rahmen sprengen, sämtliche Entwicklungen hier aufzuzeigen, deshalb sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen, wo sich mehrere umfassende Darstellungen diesbezüglich finden<sup>7,8,9,10</sup>. Zwei tiefgreifende Fortschritte in der Genese der *hyphenated techniques* müssen jedoch noch erläutert werden, da sie für alles Folgende von entscheidender Bedeutung sind.

Jede der bis in die Mitte der 1980er Jahre verwendeten Detektionsmethoden war mit einem signifikanten Nachteil behaftet, welcher letztendlich verhinderte, dass sich *hyphenated techniques* grundsätzlich als Analysemethoden durchsetzen konnten. Die bereits beschriebene Flammen-AAS (FAAS) war zwar sehr selektiv, erlaubte aber keine Multi-elementanalysen und zeigte nur eine sehr begrenzte Empfindlichkeit. Durch den Einsatz der Graphitrohr-AAS (GF-AAS) konnte zwar die Empfindlichkeit verbessert werden, jedoch war damit keine Online-Detektion mehr möglich und das Problem der Multi-elementanalyse blieb. Dieses wiederum könnte gelöst werden durch den Einsatz der

---

<sup>5</sup> MANAHAN und JONES (1973) *Anal. Lett.* **6**, 745

<sup>6</sup> YOZA und OHASHI (1973) *Anal. Lett.* **6**, 595

<sup>7</sup> EBDON et. al. (1986) *Analyst* **111**, 1113

<sup>8</sup> LOBINSKI und ADAMS (1997) *Spectrochim. Acta B* **52**, 1865

<sup>9</sup> EBDON et. al. (1987a) *Analyst* **112**, 1

<sup>10</sup> SUTTON et. al. (1997) *J. Chromatogr. A* **789**, 85

Atomemissionsspektroskopie (AES) oder der Atomfluoreszenzspektroskopie (AFS), mit welchen aber wiederum nur eine sehr begrenzte Anzahl an Elementen zugänglich war.

Der Durchbruch gelang erst durch die Entwicklung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) und deren Einsatz als elementselektiver Detektor für die Chromatographie. Die ICP-MS zeichnet sich aus durch eine sehr hohe Empfindlichkeit für eine Vielzahl von Elementen im Periodensystem – typischerweise zwischen 10 und 0,1 µg L<sup>-1</sup>, aber in manchen Fällen auch noch weit darunter -, durch seine Fähigkeit zur Multielementdetektion, einen großen dynamischen Bereich sowie die Möglichkeit der Isotopenanalyse. Zusätzlich lassen sich Separationsmethoden wie die LC oder die GC problemlos an die ICP-MS koppeln, so dass diese als idealer Detektor für *hyphenated techniques* bezeichnet werden kann.

Als erstes erkannten dies Thompson und Houk und publizierten 1986 eine Methode zur Kopplung der LC an die ICP-MS<sup>11</sup>. Anhand von Metall-EDTA-Komplexen und verschiedenen Arsenverbindungen konnten sie zeigen, dass alle Vorteile, welche die ICP-MS ohne vorgeschaltete Trennmethode besitzt, wie die Fähigkeit zu Multielementanalysen und zu Isotopenverhältnismessungen, auch bei einer online-Kopplung zum Tragen kommen. Damit ebneten sie den Weg für die ICP-MS als den wichtigsten Detektor für die Elementspeziesanalyse.

Eine zweite, sehr wichtige Entwicklung innerhalb der *hyphenated techniques* muss an dieser Stelle skizziert werden, da sie in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund rückte und für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung ist. Neben den instrumentellen Entwicklungen zeichnet sich nämlich ein ganz klarer Trend auf der Seite der Analytssysteme ab, welche mittels *hyphenated techniques* untersucht werden.

Wie bereits erwähnt, waren es zunächst die alkylierten Metallverbindungen, welche im Fokus der Elementspeziation standen, da diese aufgrund ihrer Stabilität relativ problemlos zu analysieren waren. Auch ist diesen Verbindungen eine hohe Relevanz bezüglich biogener und anthropogener Umweltprozesse zuzuschreiben und, damit eng verknüpft, sind sie von toxikologischem Interesse. Überhaupt bestimmten umweltrelevante Fragestellungen die *hyphenated techniques* bis weit in die 1990er Jahre, bis zu dem Punkt, wo zweierlei erkannt wurde: Zum einen musste konstatiert werden, dass die analytischen Methoden zur Bestimmung von

---

<sup>11</sup> THOMPSON und HOUK (1986) *Anal. Chem.* **58**, 2541

Organometall- und Organometalloidverbindungen in der Umwelt teilweise so ausgereift waren und die Untersuchungsgegenstände einen Grad der Spezialisierung erreicht hatten, dass dieser Bereich nun weniger in der Analytischen Chemie anzusiedeln ist, als vielmehr in den Geo- und Umweltwissenschaften<sup>12</sup>.

Zum anderen, und diese Entwicklung ist wesentlich tief greifender, wurde erkannt, dass *hyphenated techniques* in einem ganz anderen Bereich umfassend einsetzbar sind, ja geradezu eine notwendige Erweiterung des Kanons darstellen. Hier ist von dem komplexen und stark expandierenden Bereich der modernen Bioanalytik die Rede<sup>13</sup>.

Es war schon lange bekannt, dass das Funktionieren von biologischen Systemen zwingend mit dem Wirken vieler Spurenelemente – vor allem Metallen wie Kupfer und Zink, aber auch Halbmetallen wie Selen – verbunden ist, wohingegen sich andere Elemente, beispielsweise Arsen, durch ein komplexes toxikologisches Profil auszeichnen. Und dann gibt es natürlich noch Elemente, für welche sowohl das eine wie auch das andere zutrifft, wofür das Element Chrom einen repräsentativen Vertreter darstellt.

Der Metabolismus – worunter Aufnahme, Akkumulation, Transport, Deposition und Ausscheidung zu verstehen ist - sowohl der essentiellen als auch der toxischen Elemente ist aus chemischer Sicht geprägt durch die Bildung mehr oder minder stabiler Komplexe mit organischen Liganden oder, im Fall der Metalloide, durch die kovalente Bindung an dieselben. Die Vielfalt dieser Liganden in biologischen Systemen ist es, was die Speziationsanalyse einerseits notwendig macht, andererseits die Sache doch sehr kompliziert. Zusammengenommen mit dem teils labilen Charakter der auftretenden Bindungen werden so neue Herausforderungen an die Analytik gestellt, welchen mit der Entwicklung neuer Methoden begegnet werden muss, aber davon später mehr. Zunächst muss aber festgehalten werden, dass die Bestimmung der Gesamtkonzentration eines Elements in einem Organismus zu einem sehr falschen Verständnis, den Metabolismus, die Bioverfügbarkeit und die Toxizität dieses Elements betreffend, führen kann. Die Möglichkeiten der Interaktion eines Elements in der komplexen chemischen Umgebung eines Organismus sind so vielfältig, dass Spezies mit den unterschiedlichsten Eigenschaften und Wirkungen entstehen können.

Natürlich trug die Bioanalytik diesem Umstand auch schon vor der Einführung der *hyphenated techniques* durch die Einbeziehung speziations-

---

<sup>12</sup> LOBINSKI (1998) *Spectrochim. Acta B* **53**, 177

<sup>13</sup> SZPUNAR (2000) *Analyst* **125**, 963

analytischer Methoden Rechnung, auch wenn diese hauptsächlich zur Identifizierung herangezogen wurden<sup>14</sup>. Nach der Isolierung und Aufreinigung natürlich vorkommender Metallkomplexe und Metalloidverbindungen wurde mit Hilfe spektroskopischer Methoden, wie der Mössbauer Spektroskopie, der Röntgen-Spektroskopie und der Kern-Resonanz-Spektroskopie (NMR), Strukturaufklärung betrieben. Der Nachteil dieser Methoden liegt auf der Hand. Da für diese Methoden meist eine recht große Menge an sorgfältig aufgereinigtem Probenmaterial zur Verfügung stehen muss, eignen sich diese nur sehr begrenzt für die Untersuchung mäßig stabiler Elementspezies im Spuren- und Ultraspurenbereich. Zusätzlich besteht bei der Verwendung dieser Methoden das Problem der Quantifizierung, so dass quantitative Aspekte in der Bioanalytik nach wie vor meist über die Gesamtkonzentration abgehandelt werden. So geht man bei der Bestimmung von Zink im Blut beispielsweise davon aus, dass dieses Zink ausschließlich an zinkbindende Serumproteine gebunden vorliegt, was, wie sich gezeigt hat, zu krassen anamnetischen Fehlinterpretationen führen kann<sup>15</sup>.

Dass diese Lücke gewinnbringend für beide Seiten – sowohl für die Bioanalytik als auch die Elementspeziesanalytik – durch *hyphenated techniques* gefüllt werden kann, wurde eigentlich schon recht früh erkannt. Lässt man die Anwendungen außer Acht, wo offline nach der Trennung eine Gehaltsbestimmung mittels Atomspektroskopie durchgeführt wurde, finden sich die ersten Veröffentlichungen, den Einsatz von *hyphenated techniques* zur Untersuchung von biologischen Proben betreffend, Anfang der 1980er Jahre. So berichtet beispielsweise Morita et. al. über die Kopplung der Gelpermeationschromatographie an die ICP-AES zur Multielement-Bestimmung in Vitaminen und Proteinen<sup>16</sup>. Es dauerte aber noch eine geraume Zeit, bis das Potential der *hyphenated techniques* für die Beantwortung biochemischer Fragestellungen erkannt wurde, und interessanterweise fällt diese Erkenntnis zusammen mit dem Gebrauch der ICP-MS als Detektor für die Chromatographie.

Dieser Umbruch zeigt sich deutlich an zwei Publikationen aus dem Jahre 1987. In der ersten Publikation werden die Vorteile einer LC-AAS-Kopplung zur Bestimmung von protein-gebundenen Metallionen beschrieben<sup>17</sup>. Im gleichen Jahr erschien eine Publikation, in welcher ebenfalls zur Untersuchung von Metalloproteinen die Möglichkeiten einer LC-ICP-MS-

---

<sup>14</sup> WILLIAMS (1990) *Coord. Chem. Rev.* **100**, 573

<sup>15</sup> OWEN et. al. (1996) *Biochem. Soc. Transact.* **24**, 947

<sup>16</sup> MORITA et. al. (1980) *Anal. Chem.* **52**, 349

<sup>17</sup> EBDON et. al. (1987b) *Analyst* **112**, 437

Kopplung vorgestellt wird<sup>18</sup>. Konnte man zu jener Anfangsphase noch von einer gleichberechtigten Koexistenz der element-spezifischen Detektoren AAS, AES und ICP-MS sprechen, so stellte sich in der Folgezeit heraus, dass die ICP-MS den anderen Detektionsmethoden zur Bestimmung von Spurenelementspezies in biologischen Proben klar überlegen war<sup>19,20,21</sup>. Daher ist es nicht verwunderlich, dass *hyphenated techniques* mit der ICP-MS als Detektor in der Gegenwart sozusagen das Rückgrat bildet für Elementspeziation und darüber hinaus gehende Untersuchungen von biologisch und medizinisch relevanten Proben<sup>22,23</sup>. Und dieser Prozess ist bei weitem noch nicht abgeschlossen<sup>24</sup>. Wie in den folgenden Kapiteln durchaus zu erkennen ist, befindet sich die bioanorganische Speziation mittels *hyphenated techniques* noch in einem Stadium der prosperierenden Entwicklung<sup>25</sup>. Dies hängt natürlich einerseits mit der Natur biologischer Systeme zusammen, welche sich, wie bereits gesagt, durch eine schier unendliche Komplexität auszeichnen. Andererseits, und damit teils zusammenhängend, müssen für diese neuen Fragestellungen auch neuartige Methoden entwickelt werden, um adäquate Analysestrategien anbieten zu können. Da eben eine solche Neuentwicklung Gegenstand dieser Arbeit ist, soll die Notwendigkeit für eine solche fundiert werden durch die kritische Auseinandersetzung mit der aktuellen Methodologie, gegliedert nach der Separationsmethode, welche an die ICP-MS gekoppelt ist. Hierbei soll nur eingegangen werden auf solche Entwicklungen, welche von bioanalytischer Relevanz sind.

Bevor damit jedoch begonnen wird, muss ein letzter Aspekt der *hyphenated techniques* zumindest erwähnt werden, da die Darstellung des *status quo* sonst nur sehr unvollständig wäre. Die eben erwähnte Komplexität biologischer Systeme kann selbst bei der Verwendung eines element-selektiven Detektors dazu führen, dass bei der Vielzahl der unterschiedlichen Spezies eine Identifizierung über entsprechende Standards nicht mehr stattfinden kann. Daher wurde die Notwendigkeit erkannt, komplementäre Detektionsmethoden zur Identifizierung der einzelnen Verbindungen heranzuziehen<sup>26</sup>. Hierbei sind vor allem die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) sowie die matrixunterstützte Laserdesorptions/-ionisations

---

<sup>18</sup> DEAN et. al. (1987) *J. Anal. At. Spectrom.* **2**, 607

<sup>19</sup> HEITKEMPER et. al. (1989) *J. Anal. At. Spectrom.* **4**, 279

<sup>20</sup> CREWS et. al. (1989) *Analyst* **114**, 895

<sup>21</sup> UDEN (1995) *J. Chromatogr. A* **703**, 393

<sup>22</sup> SANZ-MEDEL et. al. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 236

<sup>23</sup> JAKUBOWSKI et. al. (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 1

<sup>24</sup> MICHALKE (2002) *Tr. Anal. Chem.* **21**, 154

<sup>25</sup> RAY et. al. (2004) *J. Chromatogr. A* **1050**, 3

<sup>26</sup> MEIJA et. al. (2006) *Tr. Anal. Chem.* **25**, 44



Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) zu nennen<sup>27,28,29</sup>. Da im dritten Teil dieser Abhandlung das Arbeiten mit diesen Methoden ebenfalls Gegenstand der Darstellungen sein wird, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

Abschließend zu diesen einleitenden Ausführungen sei eine Graphik gezeigt, in welcher das aktuelle Bild der *hyphenated techniques* umfassend dargestellt ist.

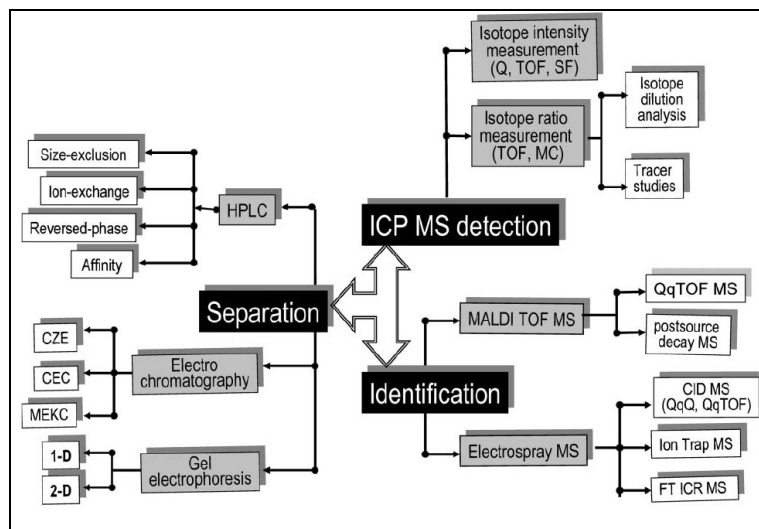


Abbildung 1: Status quo der *hyphenated techniques* [aus 28]

## II.1.2 GC-ICP-MS

Es liegt in der Natur gaschromatographischer Systeme, dass ihr Einsatz zur Trennung von biologisch relevanten Molekülen sehr limitiert ist. Um mittels der Gaschromatographie getrennt zu werden, müssen Moleküle vor allem zwei Eigenschaften erfüllen: sie müssen flüchtig und thermisch stabil sein. Damit ist einerseits eine Grenze hinsichtlich des Molekulargewichts gesetzt, da mit zunehmendem Molekulargewicht die Flüchtigkeit von Molekülen generell abnimmt und eine gaschromatographische Trennung damit erschwert ist. Was für umweltrelevante Fragestellungen kaum ein Problem darstellt, da hier eine Vielzahl niedermolekularer Spezies das Geschehen

<sup>27</sup> WIND und LEHMANN (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 20

<sup>28</sup> SZPUNAR (2005) *Analyst* **130**, 442

<sup>29</sup> LOBINSKI et. al. (2006) *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 255

bestimmt, begrenzt den Einsatz der GC in der Bioanalytik erheblich, da hier makromolekulare Biopolymere eine entscheidende Rolle spielen. Sofern dies nicht der Fall ist und niedermolekulare Spezies analytisch interessant sind, so sind diese meist durch den Faktor der thermischen Stabilität limitiert. Von einigen Schwefel-, Selen und Arsen-haltigen Verbindungen abgesehen, handelt es sich um Metallkomplexe, deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen schon nicht ausreicht, um eine Analyse durchzuführen. Daher spielt die GC-ICP-MS für bioanalytische Fragestellungen im Vergleich zu den anderen Kopplungstechniken eine eher untergeordnete Rolle und findet höchstens in der Analyse von alkylierten Metallverbindungen eine wenig charakteristische Anwendung<sup>30,31</sup>. In dem hier avisierten Zusammenhang soll aber nicht weiter darauf eingegangen werden.

### II.1.3 LC-ICP-MS

Die Flüssigchromatographie (LC), oder vielmehr die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), kann momentan als die wichtigste Trennmethode - in der Kombination mit der ICP-MS - für biologisch relevante Spezies betrachtet werden<sup>32</sup>. Wie kaum eine andere Methode zeichnet sie sich durch eine große Anzahl an Variationsmöglichkeiten aus, welche es zulassen, Analyten mit den unterschiedlichsten Eigenschaften zu trennen. Darauf soll später genau eingegangen werden. Zusätzlich wird die ICP-MS als idealer Detektor für die HPLC propagiert, was aber bei genauerer Betrachtung als durchaus kritisch zu bewerten ist, wovon später noch ausführlich die Rede sein wird. Nichtsdestotrotz bilden HPLC-ICP-MS-Kopplungen den wichtigsten Bereich innerhalb der aktuellen *hyphenated techniques* in der Bioanalytik.

Prinzipiell ist eine flüssigchromatographische Trennung bestimmt durch die Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase einerseits und der mobilen Phase andererseits. Während die stationäre Phase vorgegeben ist durch die Art der chromatographischen Säule, obliegt die Wahl der mobilen Phase, in Abhängigkeit der zu untersuchenden Analyten, dem Experimentator und ist damit Hauptbestandteil der Optimierung einer chromatographischen Separation. Daher wird die Einteilung chromatographischer Separationsmethoden durch die Beschaffenheit der stationären

---

<sup>30</sup> BOUYSSIÈRE et. al. (2002) *Spectrochim. Acta B* **57**, 805

<sup>31</sup> HIRNER (2006) *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 555

<sup>32</sup> FERRARELLO et. al. (2002a) *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 412

Phase bestimmt, von denen hauptsächlich drei in der Bioanalytik mittels *hyphenated techniques* gebräuchlich sind: *Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Umkehrphasen-Chromatographie*. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt und im Hinblick auf ihre Möglichkeiten hinsichtlich der Bioanalytik mittels *hyphenated techniques* kritisch beleuchtet werden. Erweitert werden soll diese Betrachtung durch die Beschreibung von Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet, namentlich der *Mehrdimensionalen Chromatographie* sowie der *Kapillar- und Nano-LC*.

### *Größenausschluss-Chromatographie (SEC)*

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) – auch als Gelpermeations-, Gelfiltrations- oder einfach Gelchromatographie bezeichnet – basiert auf einem umgekehrten Siebeffekt auf molekularer Ebene und erlaubt die Trennung von in Lösung befindlichen Molekülen in Abhängigkeit von ihrer Größe, genauer gesagt, von ihrer räumlichen Gestalt. In erster Näherung ist Trennung damit auch abhängig von dem Molekulargewicht, welches zur Kalibration solcher SEC-Säulen in der Regel herangezogen wird. Diese Säulen sind gefüllt mit porösen Partikeln definierter Porengrößenverteilung. Je nach Größe der Analyten können diese ganz oder teilweise in diese Poren eindringen und werden dadurch stark retardiert. Moleküle, welche zu groß sind, um in die Poren einzudringen, erfahren idealerweise keine Retardation und gelangen ungehindert durch die Säule. Ein praktisches Problem der SEC ist, dass neben diesem Siebeffekt auch andere, in diesem Fall störende, Wechselwirkungen mit der stationären Phase auftreten können. Elektrostatische Effekte, Adsorptionen und hydrophobe Wechselwirkungen lassen sich aufgrund der chemischen Natur der porösen Partikel nicht vollständig unterdrücken und führen zu einem teils erheblich abweichenden Verhalten der Analyten auf der Säule. Für die Speziesanalyse ist dies von besonderem Interesse, da zwar von der Theorie her die SEC ein besonders schonendes Trennverfahren darstellt, eben wegen der Annahme, dass zwischen dem Analyten und der stationären Phase keine den Aufbau des Analyten beeinflussenden Wechselwirkungen stattfinden. In der Praxis zeigen sich jedoch auch bei der SEC Speziesumwandlungen oder –destruktionen auf der Säule, besonders wenn es sich um labile Metallkomplexe handelt.

Die Elution wird in der SEC isokratisch durchgeführt, was als Vorteil hinsichtlich der Kopplung mit der ICP-MS angesehen werden kann. So werden durch das Elutionsmittel bedingte Schwankungen in der Ionisierungseffizienz und damit der Detektor-Empfindlichkeit vermieden. Andererseits kann das Elutionsmittel durchaus zu einem Problem in diesem Zusammenhang werden, wenn durch dessen Zusammensetzung

vorgenannte Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase verhindert werden sollen. Es wird beschrieben, dass durch eine Erhöhung der Ionenstärke der Eluenten in der SEC unerwünschte Interaktionen der Analyten mit dem Packungsmaterial minimiert werden können<sup>33</sup>. Doch dieses Vorgehen ist aus zweierlei Hinsicht sehr kritisch zu bewerten. Einerseits, da durch hohe Salzfrachten das Plasma und der Interface-Bereich des ICP-MS stark beansprucht werden und andererseits, da durch eine hohe Ionenstärke labile Metallkomplexe zerstört werden können. Je nach Applikation werden unterschiedliche Zusätze wie EDTA oder  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Eluenten empfohlen, um genau diesen Effekt zu vermeiden<sup>34</sup>. Auch wenn die Wahl des Eluenten in der SEC also auf den ersten Blick einfach erscheint, so muss doch immer wieder mit Sorgfalt geprüft werden, welcher Eluent in dem speziellen Fall ein Optimum an Separations- und Detektionsleistung sowie Speziesstabilität gewährleistet.

Die SEC hat sich zur Fraktionierung von biologisch relevanten Makromolekülen bewährt, ist aber in der Regel, als alleiniger Trennmechanismus eingesetzt, nicht sonderlich aussagekräftig. Begründet durch die mäßige Trennleistung – eine Basislinientrennung kann maximal bei einem Unterschied in den Molekulargewichten um den Faktor Zwei erreicht werden – ist es schwierig, Fraktionen zu erhalten, welche nur einer Spezies zuzurechnen sind. Diesem praktischen Problem kommt hinzu, dass die Einordnung eines Moleküls in einen weiten Größenbereich nur ein wenig spezifisches Kriterium für seine Identität darstellt. So könnten in einer SEC-Fraktion tausende verschiedene Verbindungen enthalten sein, ohne dass dies aus den chromatographischen Daten ersichtlich wäre, selbst wenn ein element-spezifischer Detektor zum Einsatz kommt.

Daher wird die SEC in den modernen *hyphenated techniques* für zweierlei eingesetzt: (i) um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, in welchen Größenbereichen verschiedene Elementspezies zu finden sind, und (ii) zur Abtrennung eines Teils der Analyten aus einer Probe zur weiteren analytischen Bearbeitung. Der Punkt (ii) ist die Grundlage für den Einsatz der SEC als 1. Dimension in einer mehrdimensionalen Chromatographie, über die später berichtet wird. Der alleinige Einsatz als Trennmedium nach (i) ist aufgrund der bisher geschilderten Eigenschaften der SEC durchaus sehr vorsichtig zu bewerten, was die Aussagekraft solcherlei Studien anbelangt. Nichtsdestotrotz finden sich auch in der aktuellsten Literatur Beispiele für ein solches Vorgehen.

---

<sup>33</sup> MICALLEF et. al. (1992) *Talanta* **39**, 1073

<sup>34</sup> TAKATERA und WATANABE (1992) *Anal. Sci.* **8**, 469

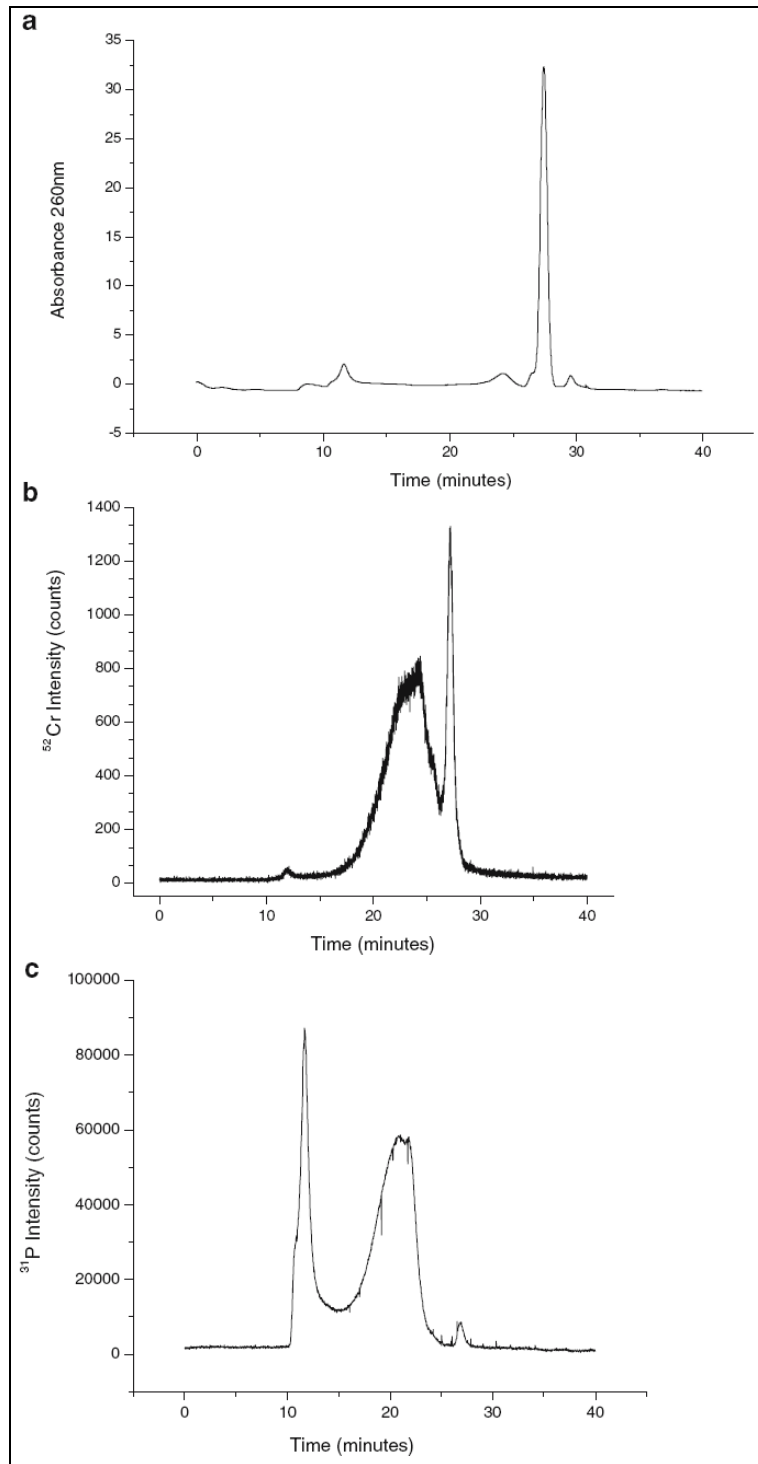
So berichten Li et. al. über die Verwendung einer solchen SEC-ICP-MS-Kopplung zur Bestimmung der Elementverteilung auf Elementspezies unterschiedlichen Molekulargewichts in biologischen Proben<sup>35</sup>. Zwar benennen die Autoren eine Reihe von Unsicherheiten, welche aus den Eigenschaften der SEC für ihre Studie hervorgehen, doch ändert das nichts an der Tatsache, dass über die Aussagefähigkeit solcher Ergebnisse allgemein eine kritische Diskussion erfolgen muss.

Ähnlich verhält es sich mit einem weiteren Beispiel, nämlich einer Untersuchung über das Bindungsverhalten von Chrom an DNA in kontaminierten Böden<sup>36</sup>. Die Informationen, welche hier aus der SEC-ICP-MS-Kopplung erhalten werden, sind unterstützend angereichert mit einigen selektiven Probenvorbereitungsschritten, um deren spezifische Aussagekraft zu untermauern. Doch müssen Zweifel bleiben, ob in einem so komplexen System, wie einem Boden, dieses Vorgehen alleine ausreicht, um die von den Autoren gezogenen Schlüsse nachzuvollziehen. In Abbildung 2 ist ein Ausschnitt der erwähnten Arbeiten dargestellt.

---

<sup>35</sup> Li et. al. (2005) *J. Chromatogr. B* **814**, 83

<sup>36</sup> MUELLER-SPITZ et. al. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 142



**Abbildung 2:** SEC-Chromatogramm eines DNA-spezifischen Extraktes einer mit Chrom kontaminierten Bodenprobe mit UV-Detektion (a) sowie ICP-MS-Detektion für Chrom (b) und Phosphor (c) [aus 36]

Für anders geartete Fragestellungen aber kann die SEC durchaus sehr wertvolle Dienste leisten, wie das Beispiel von Boulyga et. al. zeigt<sup>37</sup>. Hier wird die SEC-ICP-MS dazu eingesetzt, um in Schilddrüsengewebe von an Krebs erkrankten Menschen die Verteilung von Spurenmetallen auf bestimmte Molekulargewichtsfractionen zu bestimmen, um diese mit der von gesunden Individuen zu vergleichen. Da es hierbei weniger um eine genaue Zuordnung als vielmehr um eine phänomenologische Einordnung geht, entfallen die zuvor getätigten Einwände.

### *Ionenchromatographie (IC)*

Die Ionenchromatographie (IC) erlaubt es, wie der Name schon sagt, Ionen voneinander zu trennen, wobei jeweils nur Kationen oder Anionen voneinander getrennt werden können. Die IC erfreut sich nicht nur in der Bioanalytik einer außerordentlichen Beliebtheit, was durch die vielseitige Einsetzbarkeit dieser Chromatographie-Art zu erklären ist. Der Mechanismus, welcher der Trennung zugrunde liegt, kann vereinfacht als eine Konkurrenzreaktion der Ionen der mobilen Phase mit den Analytionen um Bindungsplätze an der stationären Phase beschrieben werden. Ionen der mobilen Phase und Analytionen besitzen daher die gleiche Ladung, welche der der stationären Phase entgegengesetzt ist. Die Retention der Analytionen ist bestimmt durch die Stärke der Wechselwirkung mit der stationären Phase, welche abhängig ist von der Natur derselben sowie dem pH-Wert und der Ionenstärke der mobilen Phase. Zusätzlich lassen sich, neben diesen reinen Ladungseffekten, bei organischen Molekülen hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Kohlenstoffgerüst der stationären Phase beobachten, so dass die Trennmechanismen einer Mischung aus IC und Umkehrphasenchromatographie (RPC) entsprechen, welche weiter unten besprochen wird. Dieses gereicht der Trennung durch die IC aber in der Regel nicht zum Nachteil, sondern erweitert die Möglichkeiten derselben zur Trennung verschiedener Biopolymere.

Problematisch stellen sich bei der IC die Elutionsbedingungen hinsichtlich der Kopplung an die ICP-MS dar. Die Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase sind, da auf vollen Ladungen basierend, recht stark, was zur Folge hat, dass teils drastische Elutionsbedingungen gewählt werden müssen, um die Analyten wieder zu mobilisieren. Dies bedeutet in der Praxis, dass Elutionsmittel mit hoher Ionenstärke oder extremen pH-Werten zum Einsatz kommen müssen. So werden beispielsweise in der

---

<sup>37</sup> BOULYGA et. al. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 198

Anionenchromatographie Gradientenelutionen mit wässrigen Pufferlösungen durchgeführt, wobei die Konzentration derselben leicht  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  übersteigen kann. Daraus können leicht Probleme im Interface-Bereich des ICP-MS entstehen, welche einen dramatischen Verlust an Empfindlichkeit bewirken. Weiterhin besteht durch die Verwendung solch konzentrierter Eluenten die Gefahr der Speziestransformation bzw. -destruktion, wie es bereits bei der SEC beschrieben wurde.

Trotz alledem hat sich die IC in der Trennung und Analyse von biologisch aktiven Spezies bewährt. Die Trennmechanismen sind wesentlich selektiver als bei der SEC, so dass eine 1-dimensionale Trennung mittels der IC ausreichen kann, um aussagekräftige Resultate zu erzielen. Eindrucksvoll wird dies demonstriert durch del Castillo Busto et. al. anhand der Trennung von verschiedenen Transferrin-Isoformen<sup>38</sup>. Diese Isoformen unterscheiden sich nur durch kleine chemische Modifikationen (zusätzliche Säure- und Glycangruppen), deren Größe im Verhältnis zur Gesamtgröße des Moleküls vernachlässigbar ist. Mit der entwickelten Methode lassen sich diese Isoformen aus einem komplexen Proteingemisch heraus trennen und mittels der ICP-MS analysieren. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass Transferrin bis zu zwei Eisenionen binden kann, was bei einem Überschuss an Eisen auch quantitativ vonstatten geht.

---

<sup>38</sup> DEL CASTILLO BUSTO et. al. (2005) *Anal. Chem.* **77**, 5615



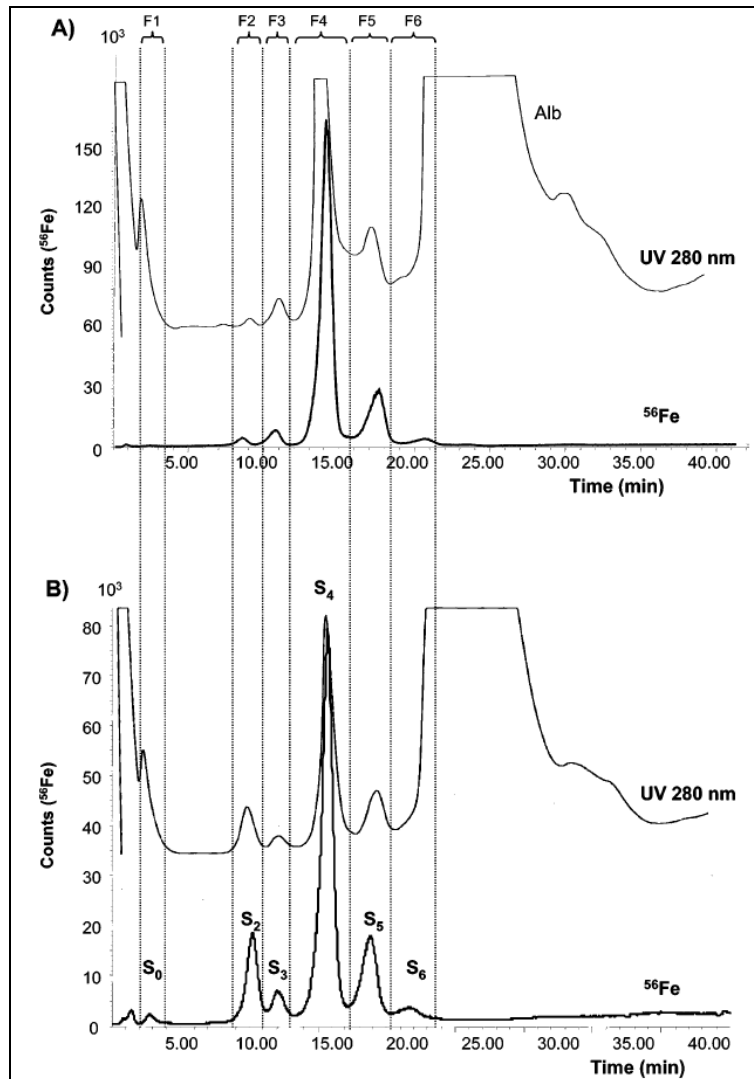


Abbildung 3: Chromatographische Trennung von verschiedenen Transferrin-Isoformen mittels der IC in Serum-Proben verschiedener Individuen über die Detektion des gebundenen Eisens sowie paralleler UV-Detektion [aus 38]

In der Abbildung 3 sind zwei Resultate dieser Untersuchungen dargestellt, welche sehr eindrücklich die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode unterstreichen. Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten darf ein überragender Vorteil der Verwendung der ICP-MS als Detektor nicht unerwähnt bleiben. Die Fähigkeit der ICP-MS zur Isotopenanalyse erlaubt die sehr präzise Bestimmung von Isotopenverhältnissen, wodurch das Prinzip der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) zur Quantifizierung Anwendung finden kann<sup>39</sup>. Mittels der MSIVA lassen

<sup>39</sup> HEUMANN (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 318

sich sehr präzise und vor allem richtige Mengenbestimmungen durchführen, was im Bereich der Bioanalytik als einzigartiger Vorteil gesehen werden kann<sup>40</sup>. Del Castillo Busto et. al. wendeten diese MSIVA für die quantitative Bestimmung eben jener Transferrin-Isoformen an, wobei wiederum das gebundene Eisen als Träger der quantitativen Information genutzt wurde<sup>41</sup>.

Neben dieser 1-dimensionalen Anwendung der IC, besteht natürlich weiterhin die Möglichkeit die IC als Teil einer mehrdimensionalen chromatographischen Trennung zu verwenden, wie es weiter unten beschrieben wird.

### *Umkehrphasenchromatographie (RPC)*

Bei der Umkehrphasenchromatographie (RPC) befinden sich die Analyten in einer polaren mobilen Phase – hier kommen in der Regel wässrige Pufferlösungen, Methanol und Acetonitril sowie Mischungen daraus zum Einsatz -, welche eine relativ unpolare stationäre Phase passiert. Auf der Oberfläche der stationären Phase befinden sich durch chemische Modifikation angebrachte Kohlenwasserstoffreste unterschiedlicher Länge (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>) und Art (Alkyl-, Phenyl-). Die Trennung basiert daher auf der unterschiedlichen Hydrophobizität der Analyten und lässt sich durch verschiedene Parameter gezielt beeinflussen. Hier seien genannt: funktionelle Gruppen der stationären Phase, pH-Wert und Polarität der mobilen Phase, Zusatz von Ionenpaarreagenzien. Diese Vielfalt an Variationsmöglichkeiten gepaart mit einer teils enormen Trennleistung sowie einer hervorragenden Reproduzierbarkeit machen die RPC zu dem wichtigsten chromatographischen Werkzeug in der Bioanalytik mittels *hyphenated techniques*.

Doch, wie sollte es auch anders sein, sind all diese Vorteile zum Teil teuer erkaufte. Ein Hauptproblem bei der Kopplung der RPC an die ICP-MS stellt der hohe Anteil an organischen Lösungsmitteln im Eluenten dar. Die Stabilität des Plasmas wird dadurch stark in Mitleidenschaft gezogen, was im schlimmsten Fall zum Erlöschen der Plasmafackel führen kann. Selbst wenn dies vermieden werden kann, so führt der hohe Anteil an organischen Lösungsmitteln zu einer drastischen Verminderung der Detektorempfindlichkeit durch verringerte Ionisierungsraten im Plasma. Hierbei sind praktische Aspekte, wie Verschmutzung und Verstopfung der Konen durch Kohlenstoffablagerungen noch nicht mit einbezogen. Gemindert, aber nicht

---

<sup>40</sup> SCHAUMLÖFFEL und LOBINSKI (2005) *Int. J. Mass Spectrom.* **242**, 217

<sup>41</sup> DEL CASTILLO BUSTO (2006) *Anal. Chem.* **78**, 8218

vollständig unterdrückt, werden können diese Effekte durch den Einsatz von Desolvatisierungseinheiten oder den Zusatz von Sauerstoff zum Zerstäubergas<sup>42</sup>.

Hinsichtlich der Speziesstabilität besonders von makromolekularen Metallkomplexen wie Metalloproteinen bietet die RPC wiederum einen Vorteil. Dadurch, dass durch den unpolaren Charakter der stationären Phase keine Wechselwirkung mit Metallionen stattfinden kann, zeigen auch labile Komplexe in der RPC eine für die Analyse ausreichende Stabilität<sup>43</sup>. Es verwundert daher nicht, dass die RPC ein gängiges Trennmedium zur Untersuchung von Metalloproteinen darstellt<sup>44</sup>. In diesem Zusammenhang muss jedoch gesagt werden, dass für solche Analyten die alleinige Nutzung der RPC nicht mehr dem aktuellen Stand der Forschung entspricht, da hierzu in der Regel mehrdimensionale chromatographische Systeme zum Einsatz kommen, über welche noch berichtet werden soll.

Für andere Applikationen im bioanalytischen Bereich hingegen kann die RPC auch in 1-dimensionaler Anwendung wertvolle Dienste leisten, was an zwei Beispielen aus der aktuellsten Forschung demonstriert werden soll. Eine Gruppe der Universität Graz, welche sich schon seit langen Jahren mit der interessanten und hochkomplexen Biochemie des Arsens beschäftigt, berichtet in einer aktuellen Veröffentlichung über die Analyse von Thioarsenverbindungen mittels RPC-ICP-MS unter anderem in zertifizierten Referenzmaterialien biologischen Ursprungs<sup>45</sup>. Anhand der publizierten Resultate, welche stellvertretend stehen für eine Vielzahl ähnlich hervorragender Leistungen, ist zu ersehen, welches hohe Potential die RPC in der Trennung von biologisch relevanten Arsenverbindungen hat. Gleiches gilt natürlich für den vergleichbaren Bereich der Selenverbindungen<sup>46</sup>.

---

<sup>42</sup> MAKAROV und SZPUNAR (1999) *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1323

<sup>43</sup> VAN BEEK und BAARS (1988) *J. Chromatogr.* **442**, 345

<sup>44</sup> LOBINSKI et. al. (1999) *Talanta* **46**, 271

<sup>45</sup> RAML et. al. (2006) *J. Chromatogr. A* **1128**, 164

<sup>46</sup> POLATAJKO et. al. (2006) *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 639

In der Abbildung 4 ist zu sehen, welche hervorragende Trennleistung mittels der RPC für die ausgewählten Arsenverbindungen erreicht werden kann.

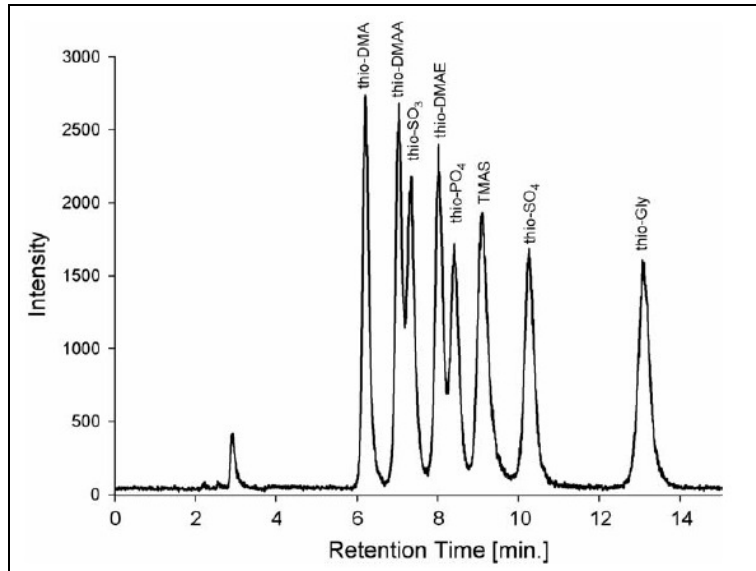


Abbildung 4: Chromatographische Trennung von 8 Thioarsen- Metaboliten mittels der RPC [aus 45]

Eine weitere beeindruckende Anwendung der 1-dimensionalen RPC in Verbindung mit der ICP-MS findet sich in dem Bereich der Proteinanalytik. Krüger et. al. demonstrieren anhand der Untersuchung von tryptischen Protein-Verdauen die hervorragende Trennleistung der RPC in Kombination mit der Multielementdetektion durch die ICP-MS und deren Potential zur Aufklärung biochemischer Fragestellungen<sup>47</sup>. Durch die Auftrennung der aus dem Verdau hervorgegangenen Oligopeptide und die Bestimmung des Gehalts an Phosphor und Schwefel in denselben, kann eine Aussage über den Grad der Phosphorylierung getätigt werden. Die in diesem Zusammenhang zum Einsatz gekommene  $\mu$ LC soll später genauer besprochen werden.

---

<sup>47</sup> KRÜGER et. al. (2006) *Anal. Chem.* **78**, 1987

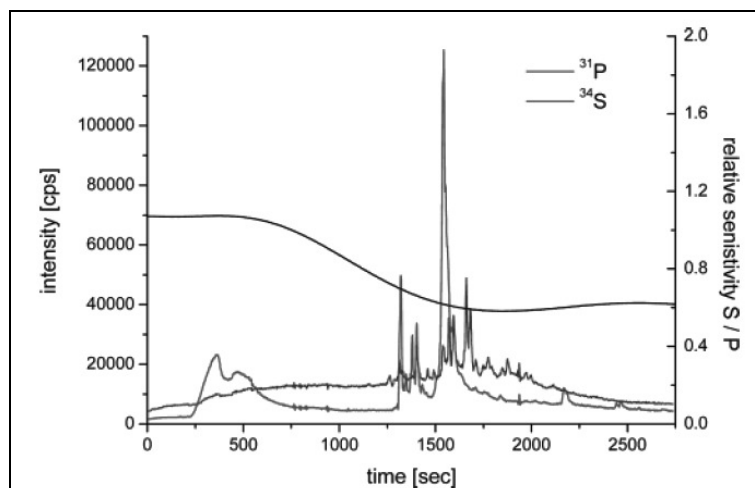


Abbildung 5: Chromatographische Trennung phosphor- und schwefel-haltiger Oligopeptide mittels der RPC und simultaner Detektion der Elemente Phosphor und Schwefel [aus 47]

Die hier präsentierten Beispiele zeigen nur einen kleinen Ausschnitt von dem, was mit der RPC in 1-dimensionaler Anordnung alles möglich ist. Nichtsdestotrotz besteht auch für die Anwendung der RPC zunehmend die Notwendigkeit, neuartige Methoden zu entwickeln, um den gestiegenen Anforderungen seitens der Bioanalytik gerecht zu werden. Über zwei Möglichkeiten, wie dieses geschehen könnte, soll im Folgenden die Rede sein.

### *Mehrdimensionale Chromatographie*

Wie bereits mehrfach erwähnt, kommen in den bioanalytisch ausgerichteten *hyphenated techniques* verstärkt Kombinationen aus verschiedenen chromatographischen Systemen zum Einsatz<sup>48,49</sup>. Der Grund hierfür ist primär in dem Untersuchungsgegenstand zu suchen. Die komplexe chemische Natur biologischer Systeme erlaubt es nur in wenigen Fällen, die Trennung der Analyten in einer Probe nur auf einem Mechanismus basieren zu lassen, selbst wenn ein so selektiver Detektor wie das ICP-MS eingesetzt wird. Jede Art der Chromatographie bezieht sich auf eine eingeschränkte Anzahl von Eigenschaften eines Analyten und kann nie dazu dienen, die Trennung aller in einer Probe vorkommenden Analyten zu gewährleisten. Selbst bei einer gezielten Untersuchung einer definierten Gruppe von Analyten ist es mitunter notwendig, zunächst eine Abtrennung

<sup>48</sup> SZPUNAR und LOBINSKI (2002) *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 404

<sup>49</sup> BOUYSSIERE et. al. (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 196

von störenden Probenbestandteilen durchzuführen, bevor mit der eigentlichen Analyse begonnen werden kann.

Wie eine solche mehrdimensionale *hyphenated technique* mittels flüssigchromatographischer Methoden aussehen kann, sei hier an dem, zugegebenermaßen extremen, Beispiel der Analyse von Metalloproteinen mittels 3-dimensionaler Chromatographie dargestellt<sup>50</sup>.

Als 1. Dimension in der mehrdimensionalen Chromatographie kommt in der Regel die SEC zum Einsatz. Hiermit lässt sich zum einen feststellen, welche Elemente in welchen Molekulargewichtsfractionen gebunden sind. Zum anderen wird hierdurch eine erste Aufreinigung der Probe erreicht, da störende Matrixbestandteile wie freie oder niedermolekular gebundene Metallionen von den höhermolekularen Fraktionen abgetrennt werden. In dem hier geschilderten Beispiel wurde die SEC nicht online an die ICP-MS gekoppelt, sondern das fraktionierte Eluat mittels Fließinjektion auf die interessierenden Elemente hin untersucht. So konnten die Fraktionen von Interesse direkt für die weitere Analyse durch die IEC genutzt werden. Mittels der IEC ist es nun möglich, Proteine, welche sich in der entsprechenden Molekulargewichtsfraction der SEC befanden, nach ihren unterschiedlichen Ladungseigenschaften aufzutrennen. Da dies aber für einige Protein-Isoformen noch nicht ausreicht, wurde als komplementäre Chromatographie-Art die RPC eingesetzt. Wiederum nach Fraktionierung des Eluats aus der IEC wurden die betreffenden Fraktionen mittels der RPC untersucht und dabei weitere Spezies gefunden.

Zunächst muss natürlich gesagt werden, dass ein solches Vorgehen ein höchstes Maß an Selektivität gewährleistet und eine beachtliche analytische Leistung darstellt. Doch sind solche mehrdimensionalen chromatographischen Systeme auch durchaus kritisch zu betrachten.

Da wäre zum ersten das Problem der Verdünnung zu nennen. In jeder gesammelten Fraktion nach der Chromatographie findet sich der Zielanalyt in einer weitaus niedrigeren Konzentration wieder als in der Ausgangsprobe. Dieser Effekt vervielfacht sich mit der Anzahl der chromatographischen Methoden, welche hintereinander geschaltet werden. So steht nach drei chromatographischen Durchläufen nur noch ein Bruchteil der Konzentration zur Verfügung, welche in der ursprünglichen Probe zu finden war. Dieses stellt kein Problem dar, solange die ursprüngliche Konzentration hoch genug und die letztlich verwendete Detektionsmethode empfindlich genug ist, was aber nur selten der Fall ist. Zur Lösung dieses Problems werden zwischen

---

<sup>50</sup> FERRARELLO et. al. (2002b) *Spectrochim. Acta B* 57, 439

den einzelnen chromatographischen Schritten Aufkonzentrationen der gesammelten Fraktionen durchgeführt, beispielsweise durch Gefrier-trocknung.

Hier setzt aber dann das nächste Problem an, welches mit mehrdimensionalen Trennungen verbunden ist. Je intensiver eine Probe behandelt wird, desto größer ist die Gefahr, dass Speziestransformationen oder -destruktionen stattfinden. So ist die Aussagekraft dessen, was nach drei chromatographischen Trennungen und Aufkonzentrationsschritten letztlich gefunden wird, im Hinblick auf den Ursprungszustand in der Probe, als sehr fragwürdig einzustufen, gerade wenn es sich, wie in dem vorliegenden Fall, um Metallkomplexe handelt.

Als weiteres, mehr praktisches Problem dieser multidimensionalen Chromatographie kann der zeitliche und apparative Aufwand benannt werden. Es sei dahingestellt, dass für wenige, sehr spezielle Fragestellungen ein solches Vorgehen gerechtfertigt erscheint, doch für die Analyse von Probenbündeln, wie sie bei biochemischen oder medizinischen Studien anfallen, eignet sich dieses alleine aus Zeitgründen nicht.

Es bleibt daher abzuwarten, ob sich diese Entwicklung auf lange Sicht für die routinefähige Analytik durchsetzen wird.

### *Kapillar-LC und Nano-LC*

Die Notwendigkeit chromatographische Methoden zu etablieren, welche es ermöglichen kleinste Probenmengen zu analysieren – als Beispiele seien hier Proteinverdauung aus der 2D-Gelelektrophorese oder Einzelzell-Lysate genannt – sowie die Suche nach immer effizienteren Trennmethode resultiert in einem Trend hin zu neuartigen Mikro- und Nanotechniken<sup>51,52</sup>. Durch Verkleinerung der Innendurchmesser chromatographischer Säulen und, damit einhergehend, der Verringerung der Flussraten ist es gelungen, die HPLC tauglich für die Mikroanalyse zu machen und die Trennleistung im Vergleich zu herkömmlichen Techniken signifikant zu verbessern. Als Beispiel sei hier die Trennung von Selenopeptiden mittels der RPC angeführt, woran sehr deutlich die Unterschiede zwischen herkömmlicher, Kapillar- und Nano-LC zu erkennen sind<sup>53,54</sup>.

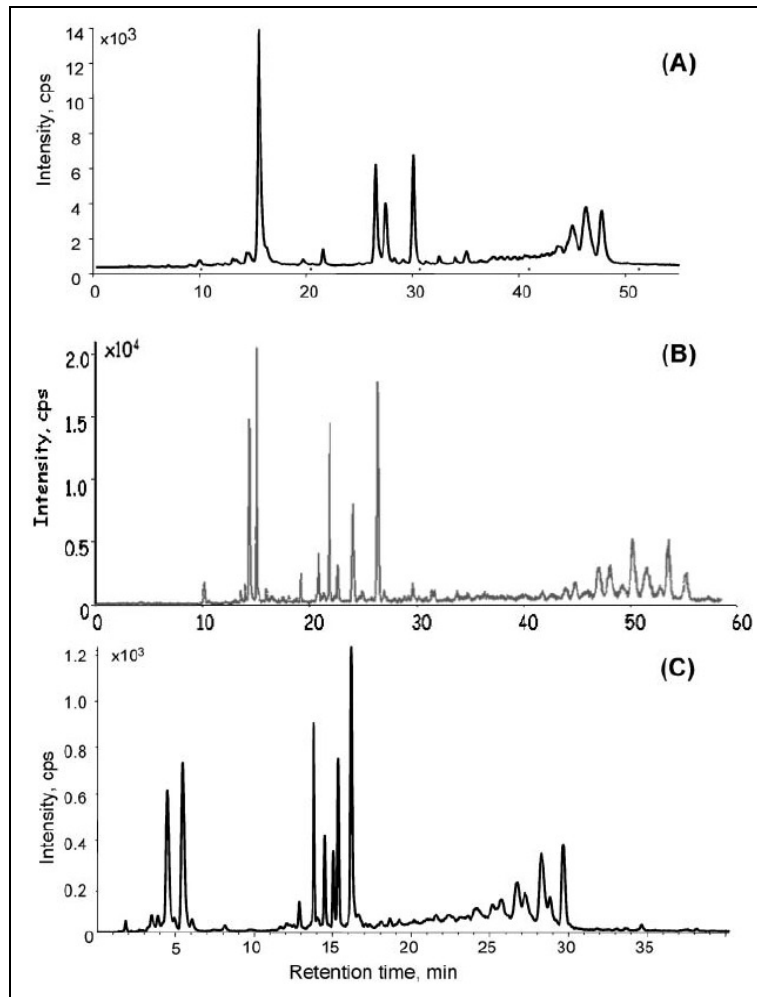
---

<sup>51</sup> WIND et. al. (2001a) *Anal. Chem.* **73**, 29

<sup>52</sup> WIND et. al. (2001b) *Anal. Chem.* **73**, 3006

<sup>53</sup> SCHAUMLÖFFEL et. al. (2003) *Anal. Chem.* **75**, 6837

<sup>54</sup> GIUSTI et. al. (2005) *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 1101



**Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Resultate einer Trennung von aus Selenhefe extrahierten Selenopeptiden mittels normaler RPC (A), Kapillar-RPC (B) und Nano-RPC (C) [aus 28]**

Die Verwendung solcher Niedrigfluß-Systeme bringt aber auch einige Nachteile mit sich, was sich bereits bei der Kopplung an das ICP-MS zeigt. Konventionelle Zerstäubersysteme für die ICP-MS sind nicht für die in der Kapillar- bzw. Nano-LC ( $\sim 0,5\text{-}10 \mu\text{L min}^{-1}$ ) vorkommenden Flussraten geeignet, da diese um den Faktor 100-1000 niedriger sind als in der herkömmlichen LC ( $\sim 0,7\text{-}1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ). Daher mussten zunächst neuartige Zerstäubersysteme entwickelt werden, um überhaupt eine Konnexion kapillar-basierender LC-Methoden an die ICP-MS zu realisieren. Mittlerweile sind verschiedene Systeme auf dem Markt zu finden, deren Praxis-tauglichkeit sich aber erst noch bewähren muss.

Ein weiteres Problem allgemeinerer Art bei der Verwendung solcher Kapillarsysteme betrifft die relativen Nachweisgrenzen, welche damit erreicht werden können. So ist das maximal mögliche Injektionsvolumen



direkt abhängig von den Dimensionen der verwendeten Trennsäule sowie den entsprechenden Flussraten. Damit sind die Injektionsvolumina ebenfalls um einen Faktor 100-1000 niedriger als in der herkömmlichen LC, was bei der Kopplung an die ICP-MS – als massenfluss- und nicht konzentrationsempfindlichen Detektor - zu einer Erhöhung der relativen Nachweisgrenzen um näherungsweise jenen Faktor führt. Näherungsweise, da sich durch verbesserte Trennbedingungen auch ein besseres Signal-Untergrund-Verhältnis einstellen kann, was einen positiven Effekt auf die Nachweisgrenzen hat. Nichtsdestotrotz kann dieses Phänomen als einer der größten Nachteile dieser kapillar-basierenden Trennmethode benannt werden, wie es später auch noch bei der Kapillarelektrophorese getan werden muss<sup>55</sup>.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma können Aufkonzentrations-Schritte vor der eigentlichen chromatographischen Trennung durch 2D-LC-Systeme bieten, wie es beispielsweise von den Vorreitern auf diesem Gebiet um Ryszard Lobinski vorgeschlagen wird<sup>56</sup>. Es muss aber gesagt werden, dass ein solches Vorgehen das ohnehin schon sehr empfindliche und technisch anspruchsvolle System einer Nano-LC zusätzlich verkompliziert, so dass abgewartet werden muss, inwieweit sich dieser Trend durchsetzen wird.

Zusätzlich steht die Kapillar-LC noch vor dem Problem, dass nur eine sehr begrenzte Anzahl an verschiedenen Phasen zur Verfügung steht. Die Variationsmöglichkeiten sind daher bei Weitem nicht so vielfältig wie in der etablierten herkömmlichen LC.

Zusammenfassend für dieses Kapitel der Möglichkeiten einer LC-ICP-MS-Kopplung lassen sich folgende Vor- und Nachteile formulieren.

### Vorteile

Die LC offeriert eine breite Palette von unterschiedlichsten Trennmechanismen, welche alle sinnvoll in der Bioanalytik einsetzbar sind.

Hinsichtlich der Analyten, welche mit der LC untersucht werden können, besteht nahezu keine Limitierung.

Die Trennleistung der LC hängt stark ab von der jeweilig verwendeten Methode, kann aber für einige Analytensysteme als hervorragend bezeichnet werden.

---

<sup>55</sup> PELZING und NEUSÜß (2005) *Electrophoresis* **26**, 2717

<sup>56</sup> GIUSTI et. al. (2006) *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 26

Durch die Kombination von verschiedenen LC-Methoden können auch komplexe Systeme analytisch bearbeitet werden.

Eine verbesserte Trennleistung kann durch die Verwendung kapillar-basierender Systeme erreicht werden.

### Nachteile

Die Zusammensetzung des Elutionsmittels, welche *a priori* mit einer effizienten chromatographischen Trennung verbunden ist, führt zu vielerlei Problemen bei der Kopplung an das ICP-MS, vor allem hinsichtlich der Quantifizierung.

Die Speziesstabilität kann durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase gefährdet sein.

Eine verbesserte Trennleistung durch kapillar-basierende Systeme führt zu einer drastischen Verschlechterung der relativen Nachweisgrenzen.

### II.1.4 CE-ICP-MS

Die Kapillarelektrophorese (CE) erfreut sich in der Bioanalytik – und darüber hinaus - einer außerordentlichen Beliebtheit<sup>57,58,59</sup>. Dies verwundert nicht, wenn man betrachtet, welche Analyten mit der CE getrennt und analysiert werden können: freie Metallionen und niedermolekulare Komplexe, organische Säuren und Alkaloide, Vitamine und Pharmaka, Peptide und Proteine, Lipide und Saccharide, Nukleotide und DNA- bzw. RNA-Fragmente, ganze Zellen, Bakterien und Viren. Diese Liste ließe sich noch um ein Vielfaches erweitern, wenn der Einsatz der CE über die Bioanalytik hinaus beschrieben werden würde. Was aber mit dieser Aufzählung verdeutlicht werden soll, ist die Tatsache, dass mit der CE letztendlich der gesamte Größenbereich chemischer Verbindungen in biologischen Systemen erfasst werden kann.

Ein Grund für dieses breite Anwendungsspektrum der CE ist, dass diese ähnlich wie die LC konstituiert wird aus einer Reihe unterschiedlicher kapillarelektrophoretischer Methoden. Namentlich sind dies:

---

<sup>57</sup> SHEN und SMITH (2002) *Electrophoresis* **23**, 3106

<sup>58</sup> HERNÁNDEZ-BORGES et. al. (2004) *Electrophoresis* **25**, 2257

<sup>59</sup> SIMPSON und SMITH (2005) *Electrophoresis* **26**, 1291

die Kapillarzonenelektrophorese (CZE),  
die Isotachophorese (ITP),  
die Kapillaraffinitätselektrophorese (CAE),  
die Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC),  
die Kapillargelelektrophorese (CGE),  
die Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF),  
die Kapillarelektrochromatographie (CEC).

Jede dieser unterschiedlichen Methoden kann als eine Variation des kapillarelektrophoretischen Prinzips verstanden werden, welches in der CZE seine ursprüngliche Verwirklichung findet. Daher, und aus dem Grunde, dass diese bisher ausschließlich in den *hyphenated techniques* Anwendung findet, soll hier detailliert nur auf diese eingegangen werden.

Die Trennung in der CE basiert, wie bei allen elektrophoretischen Trennmethoden, auf einem unterschiedlichen Migrationsverhalten der Analyten im elektrischen Feld. Da bei der CZE diese Migration in einer mit Lösungsmittel gefüllten Kapillare stattfindet und – im Gegensatz beispielsweise zur Gelelektrophorese – keine weitere Phase in dieser enthalten ist, kann die Ionenbeweglichkeit als Funktion der Ionenladung und -größe beschrieben werden. Die Formel für diese so genannte Elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$  ist hier gegeben.

**Formel 1: Elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$**

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

$\mu_e$  : Elektrophoretische Mobilität  
 $q$  : Ionenladung  
 $r$  : Ionenradius  
 $\eta$  : Viskosität des Mediums

Eigentlich sollte anstelle der Ionenladung- und -größe die entsprechende effektive Ladung und Größe eingesetzt werden, welche lösungsmittel- und stoffspezifisch sind, da die Ionen in wässrigen Elektrolyten hydratisiert oder mit anderen Elektrolytbestandteilen komplexiert vorliegen. Eine solche theoretische Herangehensweise erscheint jedoch aufgrund der Vielzahl an

Möglichkeiten nicht praktikabel, daher obliegt es dem Experimentator, die optimalen Trennbedingungen für die entsprechenden Analyten zu finden.

Dieser Optimierungsprozess wird verkompliziert durch einen weiteren Trenneffekt, welcher in der CZE zu beobachten ist, aber maßgeblich zu den hervorragenden Separationsleistungen der CZE beiträgt: dem elektroosmotischen Fluss (EOF).

Kapillarelektrophoretische Trennungen werden meist in fused-Silica-Kapillaren durchgeführt, auf deren Oberfläche sich dissoziationsfähige Silanolgruppen (-SiOH) befinden. Je nach pH-Wert des eingebrachten Elektrolyten findet diese Dissoziation statt, was zu einer negativen Aufladung der Kapillarwand führt, welche auf der Lösungsmittelseite durch positive Ladungen kompensiert wird. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung ergibt sich durch diese Doppelschicht und den entsprechenden Potentialabfall ein Impuls auf das Lösungsmittel, was zu einer Bewegung desselben in Richtung der Kathode führt. Diese Bewegung wird als elektroosmotischer Fluss bezeichnet und kann durch verschiedene Faktoren, wie pH-Wert und Ionenstärke des Elektrolyten, Temperatur und Beschichtung der Kapillarwand, gezielt beeinflusst werden. So ist beispielsweise der EOF bei basischen pH-Werten höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen, was dazu führt, dass unter solchen Bedingungen sowohl Kationen als auch Anionen und Neutralteilchen kathodenseits detektiert werden können. Der EOF bewirkt zusätzlich ein stempelförmiges Flussprofil in der Kapillare, was sich im Vergleich zum parabolförmigen Flussprofil in der HPLC positiv auf die Auflösung einer CZE-Trennung auswirkt (siehe Abbildung 7).

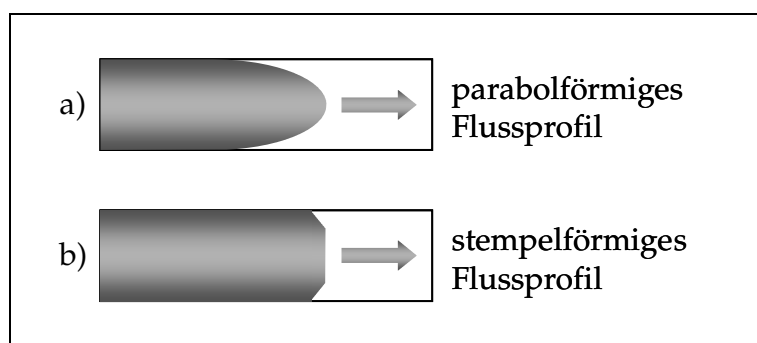


Abbildung 7: Flussprofile der LC (a) und der CE (b) im Vergleich

Dies alles zusammengenommen macht die CZE zu einer hervorragenden Trennmethode für die Bioanalytik und bereitet auch keine Probleme

hinsichtlich der Detektion mittels spektroskopischer Methoden, welche auf Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen durch die Kapillare hindurch basieren. Bei der Kopplung mit einer massenspektrometrischen Technik jedoch müssen die Analyten aus der Kapillare heraus in das Massenspektrometer geführt werden, was zu folgenden drei Hauptproblemen führt:

- i. der elektrische Stromkreis muss geschlossen werden, ohne dass es zu einer Entladung der Analyten an den Elektroden kommen kann,
- ii. der EOF darf nicht durch den Saugeffekt eines Zerstäubers beeinflusst werden, da hierdurch die elektrophoretische Auflösung verschlechtert würde,
- iii. und der effektive Eintrag sehr niedriger Probenflüsse in das Massenspektrometer muss gewährleistet sein.

Für die Kopplung der CZE an die ICP-MS wurde ein Interface, welches diese Probleme einigermaßen zufrieden stellend löst, erstmals von Olesik et. al. im Jahre 1995 beschrieben<sup>60</sup>. Seit dem wurde eine Anzahl von verschiedenen Optimierungsvorschlägen gemacht, doch die Mehrzahl der heutigen erfolgreichen Anwendungen basiert auf dem Design von Prange und Schaumlöffel<sup>61</sup> und soll daher hier stellvertretend auch für andere kurz beschrieben werden.

Der elektrische Stromkreis wird geschlossen durch einen zusätzlichen Elektrolytfluss (sheathflow), welcher die CE-Kapillare umspült und mit der Gegenelektrode in Kontakt steht. Durch diesen sheathflow wird eine zusätzliche Erhöhung des Gesamtflusses erreicht, auch wenn dieser auf ein Minimum reduziert wird, um Verdünnungseffekte klein zu halten. Der Eintrag dieses immer noch sehr kleinen Flusses in das Plasma wird durch die Verwendung eines Mikrozerstäubers ( $5 \mu\text{L min}^{-1}$ ) und einer Sprühkammer mit sehr kleinem Totvolumen gewährleistet. Das spezielle Design des Zerstäubers verhindert auch eine Beeinflussung des EOF in der Kapillare. Das gesamte Interface ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

---

<sup>60</sup> OLESIK et. al. (1995) *Anal. Chem.* **67**, 1

<sup>61</sup> SCHAUMLÖFFEL und PRANGE (1999) *Fres. J. Anal. Chem.* **364**, 452

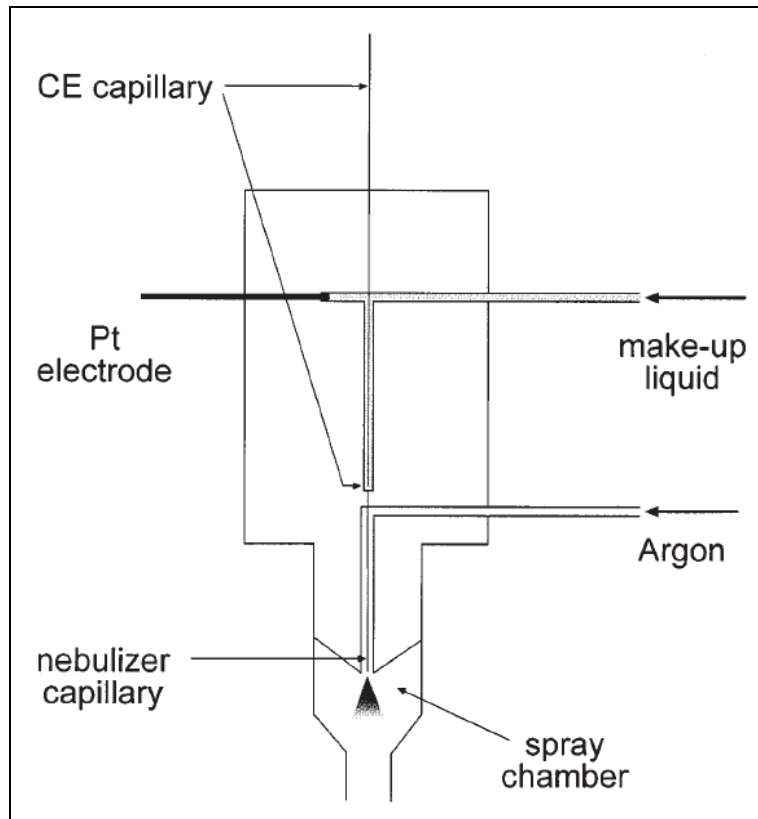


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Interfaces für eine CE-ICP-MS-Kopplung nach Schaumlöffel und Prange [aus 61]

Obwohl es mit der Entwicklung solcher Interfaces möglich ist, die hervorragende Trennleistung der CE für die *hyphenated techniques* nutzbar zu machen, kann eine solche Kopplung in manchen Punkten durchaus als problematisch bezeichnet werden. Das Hauptproblem, mit welchem die CE-ICP-MS zu kämpfen hat, wurde schon im Zusammenhang mit den kapillar-basierenden chromatographischen Methoden genannt und besitzt für die CE in besonderem Maße Gültigkeit. Begründet durch die sehr niedrigen Injektionsvolumina (wenige Nanoliter), welche bei der CE appliziert werden können, verschlechtern sich die relativen Nachweisgrenzen bei der Kopplung an einen massenflussempfindlichen Detektor, wie es das ICP-MS einer ist, erheblich. Die Anwendung einer solchen Kopplung also für die Spurenanalyse von biologisch relevanten Verbindungen ist ohne vorherige Anreicherung der Analyten nur sehr eingeschränkt möglich. Eine sorgfältige Aufreinigung der Probe für die CE hingegen ist unerlässlich, wenn in ihr hohe Salzkonzentrationen enthalten sind, da sich diese sehr negativ auf eine effektive und vor allem reproduzierbare Trennung auswirken können.

Nichtsdestotrotz kann das Potential einer solchen CE-ICP-MS-Kopplung für die Bioanalytik anhand von zahlreichen Beispielen belegt werden, wie

der aktuellen Literatur zu entnehmen ist<sup>62,63,64</sup>. Ein Beispiel soll hier jedoch kurz vorgestellt werden, da es in besonderem Maße die Möglichkeiten eine CE-ICP-MS-Kopplung demonstriert. Es handelt sich hierbei um die Trennung der Isoformen einer bestimmten Klasse von Metalloproteinen mittels der CZE und der Bestimmung des Metallgehalts in den einzelnen Isoformen durch die ICP-MS<sup>65</sup>.

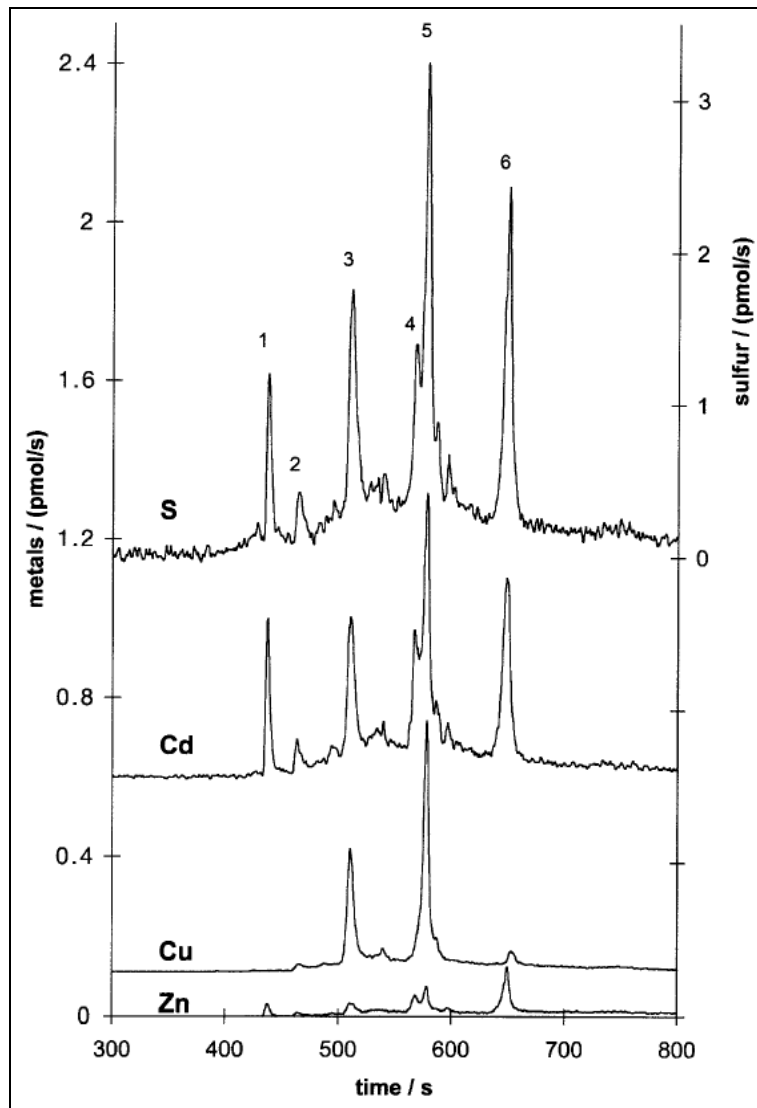


Abbildung 9: Elektropherogramm verschiedener MT-Isoformen mittels CZE-ICP-MS [aus 65]

<sup>62</sup> BAKER und MILLER-IHLI (2000) *Spectrochim. Acta B* **55**, 1823

<sup>63</sup> KANNAMKUMARATH et. al. (2002) *J. Chromatogr. A* **975**, 245

<sup>64</sup> PRANGE und PRÖFROCK (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 372

<sup>65</sup> SCHAUMLÖFFEL et. al. (2002) *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 155

Bei den hier untersuchten Metalloproteinen handelt es sich um so genannte Metallothioneine (MT), welche sich durch einen hohen Anteil an der Aminosäure Cystein auszeichnen, worin die Fähigkeit dieser Proteine begründet liegt, bis zu sieben verschieden Metallionen binden zu können. Die Familie der MTs wird aus unterschiedlichen Isoformen gebildet, wobei sich die Sequenzen dieser Isoformen zum Teil nur in einer Aminosäure unterscheiden. Diese Isoformen zu trennen und die Metallzusammensetzung darin zu bestimmen kann als große analytische Herausforderung gesehen werden. In diesem konkreten Beispiel ist es gelungen, mehrere Isoformen voneinander zu trennen (siehe Abbildung 9) und mittels der MSIVA eine Aussage über die gebunden Metallionen zu treffen (siehe Abbildung 10).

MT (Fig. 6)	Molar ratio S:Cu:Zn	Suggested formula
Peak 3	21:5:4:0	Cd <sub>5</sub> Cu <sub>4</sub> -MT
Peak 4	21:5:1:1	Cd <sub>5</sub> Cu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> -MT-1
Peak 5	21:7:5:1	(probably a mixture of MT-1 subisoforms)
Peak 6	21:6:0:1	Cd <sub>6</sub> Zn <sub>1</sub> -MT-2

**Abbildung 10: Molares Metall-Schwefel-Verhältnis in einzelnen MT-Isoformen und die entsprechende Verhältnisformel [aus 65]**

Abschließend zu diesem Kapitel seien die Vor- und Nachteile der CE-ICP-MS-Kopplung kurz dargestellt.

### Vorteile

Die CE erlaubt die schnelle und effektive Trennung unterschiedlichster Analyten mittels verschiedener Trennmechanismen.

Die Separationsleistung der CE kann als hervorragend bezeichnet werden und nimmt einen Spitzenplatz in den Trenntechniken ein.

Mittels der CE können in besonderem Maße labile Komplexe untersucht werden, da keine störenden Wechselwirkungen mit einer stationären Phase stattfinden können.

Durch isokratische Elutionsbedingungen werden veränderte Bedingungen im Plasma während eines elektrophoretischen Laufs verhindert, wodurch eine externe Quantifizierung erleichtert wird.



### Nachteile

Bedingt durch das niedrige Injektionsvolumen können nur sehr mittelmäßige relative Nachweisgrenzen erreicht werden.

Sowohl die Trennung mittels der CE als auch deren Kopplung an das ICP-MS reagiert sehr empfindlich auf äußere Einflüsse und kann daher als nicht sonderlich robust bezeichnet werden.

### II.1.5 GE-LA-ICP-MS

Die Gelelektrophorese (GE) kann als die bioanalytische Trennmethode schlechthin angesehen werden<sup>66</sup>. Keine andere Methode ist so verbreitet in biochemischen, medizinischen oder molekularbiologischen Laboratorien wie die GE. Sie stellt seit Jahrzehnten das Standardverfahren zur Trennung von Biopolymeren wie Proteinen und DNA-Fragmenten dar und hat maßgeblich zur Aufklärung entscheidender Fragestellungen in den Lebenswissenschaften beigetragen<sup>67</sup>.

Dabei kann die GE im Vergleich zu den anderen Trennmethoden als die apparativ einfachste bezeichnet werden, was aber sicherlich auch maßgeblich zu ihrem Erfolg beigetragen hat. Während die bereits beschriebenen chromatographischen und elektrophoretischen Trennmethoden für spezielle Applikationen durchaus ihre Anwendung finden, stellt die GE das Arbeitspferd in bioanalytischen Laboratorien dar. Neben ihrer apparativen Einfachheit zeichnet sich die GE durch eine hervorragende Trennleistung bezüglich biologisch relevanter Makromoleküle sowie einer sehr komplexen methodischen Vielfalt aus.

Diese Vielfalt bezieht sich einerseits auf die unterschiedlichen Trennmechanismen, welche verschiedenen gelelektrophoretischen Trennungen zugrunde liegen können und andererseits auf die vielen Parameter, welche bei der GE durch den Experimentator selbst zu bestimmen sind. Letzteres hängt damit zusammen, dass das Trennmedium, das Gel, in der Regel selbst hergestellt wird, wodurch die Möglichkeit besteht, die Trennbedingungen genau den Zielanalyten anzupassen. Dieses ist ein erster, grundlegender Unterschied zu den bereits beschriebenen Trennmethoden, wo im überwiegenden Maße auf kommerziell erhältliche Produkte, wie

---

<sup>66</sup> RIGHETTI (2004) *Electrophoresis* **25**, 2111

<sup>67</sup> GARFIN (2003) *Tr. Anal. Chem.* **22**, 263

HPLC-Säulen und CE-Kapillaren, zurückgegriffen werden muss. Zwar setzt sich auch bei der routinemäßigen GE der Trend zu kommerziellen Fertiggelen durch, doch bleibt das selbst präparierte Gel die Basis für die GE in weiten Teilen der Forschung.

Ein weiterer, ganz grundlegender Unterschied der GE zu den beschriebenen chromatographischen und elektrophoretischen Methoden besteht in der Art der Detektion. Während, abseits der *hyphenated techniques*, auch bei den anderen Methoden die Detektion online nach der Trennung dominiert, ist ein solches Vorgehen bei der GE nicht zu finden. Dieses hängt natürlich hauptsächlich mit dem Aufbau einer GE-Apparatur zusammen. Die Trennung erfolgt in der Regel in Gelplatten, wobei mehrere Proben gleichzeitig in einer Platte aufgetrennt werden können, was jedoch nur für die 1-dimensionale GE gilt. Erst nach abgeschlossener Elektrophorese setzen die Detektionsmethoden an, welche zum Teil im Gel stattfinden, zum Teil aber auch nach einem Transfer der getrennten Analyten auf eine Membran („Blotting“). Letztendlich werden die Analyten durch mehr oder minder spezifische chemische Reaktionen als getrennte Banden oder Flecken sichtbar gemacht. Je nach der Spezifität der Reaktion reicht der Aussagewert von einer groben Größeneinordnung des entsprechenden Moleküls bis hin zu seiner Identifizierung<sup>68,69</sup>.

All diesen Detektionsmethoden ist jedoch gemeinsam, dass es sich um indirekte Nachweismethoden handelt und keine Identifizierung im chemischen Sinne erlaubt. Die zu diesem Zweck einsetzbare Massenspektrometrie findet zwar immer mehr ihren Platz in diesem Bereich, wird aber auch offline nach der Trennung verwandt. So werden die Analyten zunächst aus dem Gel heraus präpariert und dann mittels der organischen Massenspektrometrie charakterisiert. Die nach dem gleichen Schema nutzbare ICP-MS zur Aufklärung elementanalytischer Fragen, beispielsweise im Bereich der Metalloproteine, findet kaum Anwendung.

Vielmehr wurde über einen anderen Weg versucht, die hervorragenden bioanalytischen Eigenschaften der GE mit der ICP-MS in Verbindung zu bringen. Ende der 1990er Jahre leisteten Neilsen et. al. Pionierarbeit durch die Entwicklung einer auf der Laserablation (LA) basierenden Methode zur direkten Analyse von Analyten aus dem Gel heraus mittels der ICP-MS<sup>70</sup>. Mittels der Laserablation, welche bis dahin nur zur Analyse von anorganischen Festkörper- oder Pulverproben in Verbindung mit der ICP-

---

<sup>68</sup> PATTON (2000) *Electrophoresis* **21**, 1123

<sup>69</sup> JIN und CHOI (2004) *Electrophoresis* **25**, 2429

<sup>70</sup> NEILSEN et. al. (1998) *Spectrochim. Acta B* **53**, 339

MS eingesetzt wurde, war es möglich, orts aufgelöst aus dem Gel heraus eine Elementinformation zu erhalten. Das Grundprinzip der GE-LA-ICP-MS besteht darin, dass nach erfolgter Elektrophorese das Gel mit einem Laser abgerastert und das ablatierte Material zur elementspezifischen Analyse mittels eines Argonstroms direkt in das ICP-MS transportiert wird. So kann eine orts aufgelöste Information über die Elementzusammensetzung in dem Gel erhalten werden, aus welcher sich Rückschlüsse über die Beschaffenheit der getrennten Analyten ziehen lassen können. Zusätzlich ist der Gedanke hinter dieser Kopplung, dass durch die Verwendung der ICP-MS als Detektor eine präzise Quantifizierung der Analyten durchgeführt werden kann, ein Ziel, was mit den herkömmlichen Detektionsmethoden für die GE nur leidlich zu verwirklichen ist.

Obwohl es sich bei der GE-LA-ICP-MS um eine Offline-Kopplung handelt, wird sie zur Zeit gleichberechtigt in den *hyphenated techniques* gesehen, was dadurch zu erklären ist, dass noch keine wirkliche Online-Kopplung der GE mit der ICP-MS existiert. So finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele, wo versucht wird, die GE-LA-ICP-MS als bioanalytische Methode zu etablieren. Hierbei fokussiert sich das Interesse hauptsächlich auf selenhaltige Proteine<sup>71</sup>, Phosphoproteine<sup>47,72</sup> und metallbindende Proteine<sup>73</sup> sowie auf systematische Untersuchungen zur GE-LA-ICP-MS<sup>74,75</sup>. Zwei Beispiele sollen das Anwendungsspektrum der GE-LA-ICP-MS verdeutlichen.

Die Bestimmung des Phosphorylierungs-Grades von Proteinen ist von hohem biochemischem Interesse und kann als analytische Herausforderung bezeichnet werden. Hierbei kann die ICP-MS durch die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Schwefel und Phosphor in einem Protein wertvolle Erkenntnisse bringen, da in der überwiegenden Mehrzahl der Proteine eine bekannte Menge an Schwefel – in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin – gebunden ist. Hierzu ist es jedoch notwendig, dass die Proteine isoliert voneinander analysiert werden können, was durch die GE gewährleistet werden kann. Eine solche Analyse wurde von Krüger et. al. mittels der GE-LA-ICP-MS durchgeführt<sup>47</sup>.

---

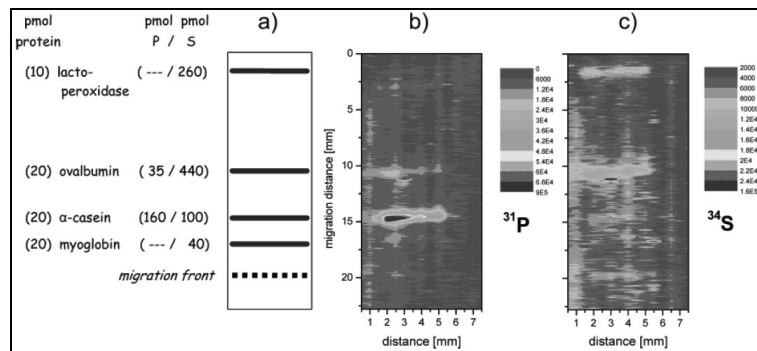
<sup>71</sup> CHÉRY et. al. (2003) *Electrophoresis* **24**, 3305

<sup>72</sup> WIND et. al. (2003) *Electrophoresis* **24**, 1276

<sup>73</sup> BECKER et. al. (2005a) *Anal. Chem.* **77**, 5851

<sup>74</sup> CHÉRY et. al. (2006) *Pure Appl. Chem.* **78**, 91

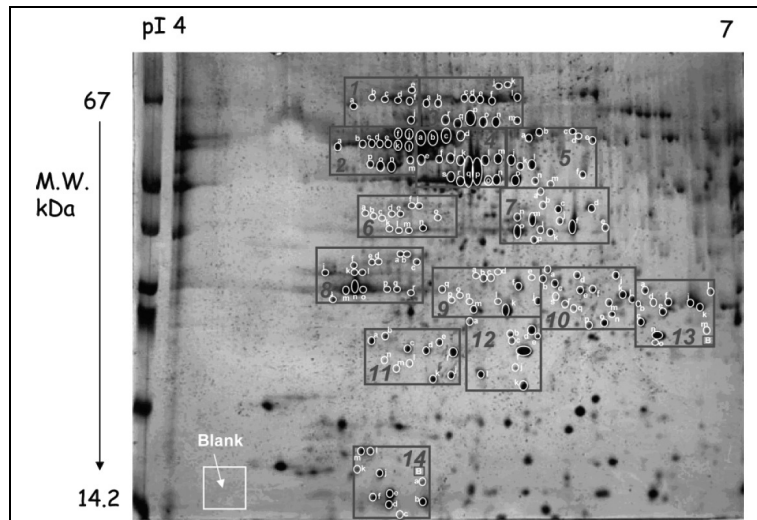
<sup>75</sup> MA et. al. (2004) *Electrophoresis* **25**, 2469



**Abbildung 11: Gelelektrophoretische Trennung von vier Proteinen (schematisch a) mit anschließender Bestimmung der Elemente Phosphor (b) und Schwefel (c) aus einer Blotting-Membran [aus 47]**

Aus verschiedenen Gründen, welche später diskutiert werden sollen, wurden die Proteine nicht direkt aus dem Gel heraus ablatiert, sondern aus einer Membran, auf welche die Proteine zuvor übertragen wurden („Blotting“). Wie zu erkennen ist, kann mittels der GE-LA-ICP-MS eine Bestimmung des Schwefel/Phosphor-Verhältnisses durchgeführt werden, ohne dass eine weitere Aufarbeitung der Proteine, beispielsweise durch enzymatischen Verdau, durchgeführt werden muss.

Ein weiteres Beispiel zur Anwendung der GE-LA-ICP-MS bezieht sich auf die Untersuchung von metallbindenden Proteinen und wurde publiziert von J. Sabine Becker et. al., welche auf diesem Gebiet Pionierarbeit geleistet hat. Wurde in dem vorangehenden Beispiel die 1-dimensionale GE anhand von Standard-Proteinen verwandt, so zeigt dieses Beispiel die Möglichkeit zur Verwendung der 2-dimensionalen GE und deren Einsatz zur Untersuchung von komplexen Proteinmixturen isoliert aus humanen Realproben. Bei der 2D-GE wird zunächst in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt und anschließend mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-GE (SDS-PAGE) weiter getrennt. In Abbildung 12 ist das Ergebnis einer solchen Trennung gezeigt, wobei die Proteine mittels *silver staining* sichtbar gemacht wurden.



**Abbildung 12: 2-Dimensionale gelelektrophoretische Trennung einer komplexen Protein-Mischung aus humanem Gehirn-Gewebe [aus 73]**

Die markierten Punkte wurden nun mittels der LA-ICP-MS auf ihre Elementzusammensetzung hin qualitativ sowie quantitativ untersucht. Es würde den Rahmen sprengen, die Resultate dieser Untersuchungen hier darzustellen. Doch sei gesagt, dass in einer Vielzahl der Protein-Spots die Elemente Phosphor, Zink, Kupfer und sogar Uran nachgewiesen werden konnten, mit zum Teil recht niedrigen Nachweisgrenzen ( $10 \text{ ng g}^{-1}$  für Uran).

Die beiden Beispiele demonstrieren auf den ersten Blick das hohe Potential der GE-LA-ICP-MS für die Bestimmung der qualitativen und quantitativen elementaren Zusammensetzung von Proteinen aller Art. Doch gerade bei dieser Art der Kopplung ist eine kritische Diskussion zwingend notwendig.

Die Vorteile, welche sich bei der Verwendung der GE als Trennmedium ergeben, liegen auf der Hand. Gerade für die als labil geltenden Metalloproteine bietet die GE die Möglichkeit, durch sehr schonende Trennbedingungen eine Trennung durchzuführen, ohne den nativen Zustand der Proteine zu verändern. Doch gilt dies nur solange, wie keine denaturierenden Detergenzien wie SDS eingesetzt werden. Zwar kann die Trennleistung durch solcherlei Zusätze erheblich verbessert werden, doch führen diese unweigerlich zur Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine, welche aber maßgeblich für die spezifischen Metallbindungseigenschaften derselben verantwortlich ist. Vor diesem Hintergrund erstaunt es doch sehr, dass die SDS-PAGE zur Charakterisierung von Metalloproteinen ihren Einsatz findet, wie es in dem zweiten Beispiel geschildert wurde. Davon unberührt bleibt die Analyse von Seleno- bzw. Phosphoproteinen, da das

detektierbare Heteroelement hier kovalent an das Protein gebunden ist und daher nicht durch denaturierende Detergenzien beeinflusst wird.

Gerade bei der Ablation direkt aus dem Gel heraus, aber auch bei der Blotting-Technik, ergibt sich ein weiteres Problem. Durch die Laserablation gelangt nicht nur der Analyt in den Detektor, sondern auch das Gel bzw. das Membranmaterial. Dieses Problem spielt vor allem eine Rolle bei der Detektion der Elemente Schwefel und Phosphor und führt zu einem relativ hohen Untergrund, was quantitative Untersuchungen im Spurenbereich erheblich erschwert<sup>76</sup>.

Überhaupt kann das Problem der Quantifizierung bei der GE-LA-ICP-MS zum jetzigen Zeitpunkt als noch nicht gelöst betrachtet werden. Es ist schwer vorzustellen, dass der Ablationsprozess, gerade bei einer so empfindlichen Substanz wie einem Gel, reproduzierbar zu bewerkstelligen ist, was aber für eine exakte Quantifizierung zwingen notwendig wäre. Um dieses Problem in den Griff zu bekommen wird vorgeschlagen, die erhaltenen Signale auf einen im Gel vorzufindenden internen Standard zu normieren<sup>77</sup>. Doch der Beweis, dass der interne Standard gleichmäßig über das ganze Gel verteilt ist, steht noch aus. Weiterhin hat das Gel natürlich eine 3-dimensionale Struktur, was bedeutet, dass zu einer vollständigen Charakterisierung einer Fraktion im Gel die gesamte Tiefe des Gel-Spots analysiert werden muss. Diesem Problem wurde durch den Transfer der Analyten auf sehr dünne Membranen versucht Herr zu werden. Wiederum muss gesagt werden, dass hiermit eine exakte Quantifizierung zusätzlich problematisiert wird, da zunächst der vollständige Transfer der Analyten auf die Membran sichergestellt werden muss.

Weitere Lösungsansätze für die Quantifizierung mittels der GE-LA-ICP-MS wurden präsentiert<sup>78,79</sup>, doch ist allen eines gemein: der Beweis anhand von exakt quantifizierten Standards, dass sie zu richtigen Resultaten führen können, wurde bisher nicht erbracht. Vielmehr wurden direkt Realproben zur Untersuchung herangezogen, so dass keine Verifizierung der Resultate möglich ist.

Der GE-LA-ICP-MS soll hier nicht das Potential zu einer effektiven analytischen Methode abgesprochen werden, doch müssen zum jetzigen Zeitpunkt berechnete Zweifel bestehen, dass die Probleme dieser Methode in absehbarer Zeit seriös gelöst werden.

---

<sup>76</sup> KRAUSE-BUCHHOLZ et. al. (2006) *Int. J. Mass Spectrom.* **248**, 56

<sup>77</sup> BECKER et. al. (2003) *Int. J. Mass Spectrom.* **228**, 985

<sup>78</sup> BECKER et. al. (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 149

<sup>79</sup> BECKER et. al. (2005b) *Int. J. Mass Spectrom.* **242**, 135

Abgesehen davon handelt es sich bei der GE-LA-ICP-MS um eine Offline-Methode mit all ihren Nachteilen. So ist der Zeitaufwand für einen analytischen Durchlauf erheblich größer, als bei den klassischen Online-Methoden. Dieses gilt in besonderem Maße für die 2-dimensionale GE, da hier die Elektrophorese nur einer Probe bis zu 24 Stunden und darüber betragen kann. Hinzu kommen noch die Zeit für die Vorbereitung der Laserablation und der Laserablation selbst, was durchaus auch mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann. Zusätzlich bedingen die verschiedenen Arbeitsschritte, welche bei der GE-LA-ICP-MS bis zur eigentlichen Analyse durchgeführt werden müssen, immer die Gefahr des Eintrags von Kontaminationen.

Das System der GE-LA-ICP-MS sei hier nun kurz bezüglich der Vor- und Nachteile beschrieben.

### Vorteile

Die GE bietet vielseitige Möglichkeiten zur effektiven Trennung von Biopolymeren unterschiedlicher Art.

Die praktische Handhabung der GE ist im Vergleich zu anderen Separationsmethoden als sehr unkompliziert zu bezeichnen.

Native Bedingungen in der GE können die Trennung von labilen Metall-Komplexen zulassen.

Mittels der GE-LA-ICP-MS ist es möglich, die 2D-GE mit der ICP-MS zu kombinieren.

### Nachteile

Die GE-LA-ICP-MS ist eine klassische Offline-Kopplung mit allen damit einhergehenden Problemen.

Die Quantifizierung mittels der GE-LA-ICP-MS muss als sehr problematisch bezeichnet werden.

Bezüglich der Speziesstabilität müssen unter denaturierenden Bedingungen erhebliche Zweifel bleiben.

## II.2 Zielsetzung

Wie aus dem bis hierher Gesagten hervorgehen sollte, bieten Kopplungstechniken mit der ICP-MS herausragende Möglichkeiten für die moderne Bioanalytik. Es sollte aber auch verdeutlicht werden, dass weiterhin der Bedarf besteht, neue und innovative Methoden in diesem Bereich zu entwickeln, da jede bestehende Methode mit individuellen Nachteilen behaftet ist. Dieses gilt insbesondere für die zuletzt angesprochene Verwendung der GE in Kombination mit der Laserablation. Der Nutzung der GE als Separationsmethode in Verbindung mit der ICP-MS als Detektor wird dennoch ein hohes Potential für die Aufklärung bioanalytischer Fragestellungen zugesprochen.

Dieser Problematik entspringt die Zielsetzung dieser Arbeit. Es soll eine Methode entwickelt werden, welche die hervorragenden Trenneigenschaften der Gelelektrophorese mit den überragenden Detektionseigenschaften der ICP-MS in einem Online-Verfahren verbindet.

Die neu zu entwickelnde Methode soll die Nachteile der GE-LA-ICP-MS überwinden und zugleich die bestehende Methodologie der *hyphenated techniques* bereichernd erweitern.

Die Methode muss sich hinsichtlich ihrer analytischen Eigenschaften mit den bestehenden Kopplungstechniken messen lassen können und sich im Vergleich mit diesen bewähren. Sie sollte neue Aspekte der Analysemöglichkeiten in den bestehenden Arbeitsweisen einbringen können.

Die Praxistauglichkeit der Methode soll durch die Untersuchung verschiedener, relevanter Analytsysteme bewiesen werden.



## **II.3 Beschreibung des Systems**

### **II.3.1 Konzeption**

Das Grundproblem, welches sich stellt, will man eine gelelektrophoretische Trennung mit einer massenspektrometrischen Detektion in einem wirklichen Online-Verfahren koppeln, ist, dass die im Gel getrennten Analytmoleküle während der laufenden Elektrophorese aus dem Gel heraus gelöst werden müssen. Bei den bisher beschriebenen Verfahren handelte es sich ausschließlich um Offline-Verfahren, da die Analyten bis zur abgeschlossenen Elektrophorese im Gel verbleiben und erst dann in weiteren Arbeitsschritten im Gel detektiert werden oder zur weiteren Analyse aus dem Gel heraus präpariert werden müssen. Da diese Offline-Verfahren das Bild der Gelelektrophorese maßgeblich geprägt haben, scheint der Gedanke einer Online-Kopplung zunächst recht abwegig.

Doch ändert sich dieses Bild sofort, wenn nicht die – zugegebenermaßen wichtigere - analytische Gelelektrophorese betrachtet wird, sondern die präparative Gelelektrophorese. Bereits früh wurde erkannt, dass die Gelelektrophorese nicht nur für analytische Zwecke in der Biochemie genutzt werden kann, sondern auch zur Aufreinigung bzw. Präparation von Biopolymeren in unterschiedlichsten Mengenmaßstäben. Neben der bereits beschriebenen Möglichkeit, offline nach der abgeschlossenen Elektrophorese die entsprechenden Bereiche des Gel manuell zu trennen und dann die Analyten aus den einzelnen Gelsegmenten zu eluieren, wird hier ein Prinzip beschrieben und experimentell verwirklicht, welches es erlaubt, während der laufenden Elektrophorese die Analyten aus dem Gel heraus zu eluieren. Wir wollen es hier das Prinzip der kontinuierlichen Elution nennen, welches im nächsten Abschnitt genau beschrieben werden soll.

### **II.3.2 Prinzip der kontinuierlichen Elution**

Das Grundprinzip der klassischen Gelelektrophorese bleibt bei dem System der kontinuierlichen Elution unverändert. Das Trenngel befindet sich zwischen den beiden mit Elektrolyt gefüllten Elektrodenräumen. Für die kontinuierliche Elution wird jedoch ein Effekt genutzt, welcher in der klassischen Elektrophorese tunlichst vermieden werden soll. Das elektrische Feld, in welchem die Analyten wandern, reicht prinzipiell von der einen Elektrode bis zur anderen. Dazwischen befinden sich in der Regel das Gel, aber auch die freien Elektrolytlösungen, in welche die Elektroden eintauchen und welche den Kontakt zu dem Gel gewährleisten. Hat ein Analytmolekül

nun aufgrund des angelegten elektrischen Feldes das Gel durchlaufen und erreicht das Ende des Gels, migriert es ungehindert weiter in das darauf folgende Elektrolytreservoir in Richtung der entsprechenden Elektrode. Da es das Gel in diesem Moment verlässt, steht es für die herkömmlichen Detektionsmethoden in der Gelelektrophorese nicht mehr zur Verfügung, da diese ausschließlich die Analyten im Gel erfassen. Daher wird bei der klassischen GE der Elektrophoresevorgang gestoppt, bevor die interessierenden Analyten das Gel verlassen, was in der Regel durch den Einsatz von Farbstoff-Markern erreicht wird.

Nun wird genau dieser Umstand, dass die Analytmoleküle das Gel auch wieder verlassen können, ausgenutzt, um eine Elution während der laufenden Elektrophorese zu verwirklichen (siehe Abbildung 13). Die Grundidee ist, einen Kanal zwischen dem Ende des Gels und dem anschließenden Elektrolytreservoir bzw. in dem Gel zu installieren, welcher kontinuierlich von einem Elutionsmittel durchströmt wird (a). Hierbei wurde angenommen, dass die Analytmoleküle, welche in dem Gel migrieren (b), dieses auch wieder verlassen und in den Kanal eintreten (c). Allein durch die Strömung des Elutionsmittels sollten diese aus dem elektrischen Feld herausgelöst werden können, um somit zu verhindern, dass sie weiter in die Richtung der Elektrode wandern. Um nun präparativ zu arbeiten, ist nichts weiter notwendig, als das Eluat fraktioniert zu sammeln (d).

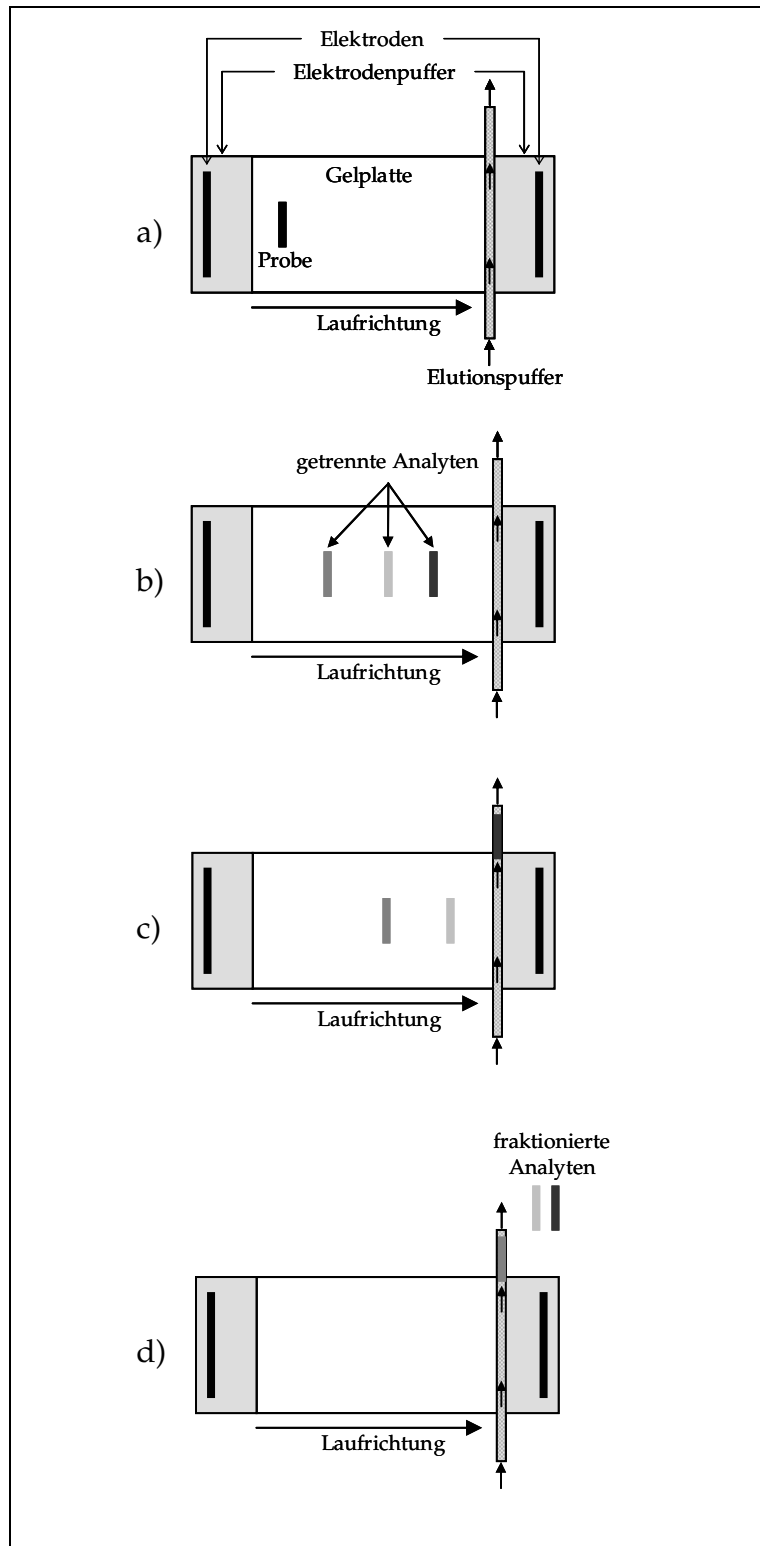


Abbildung 13: Grundprinzip der kontinuierlichen Elution in der Gelelektrophorese

Die ersten apparativen Verwirklichungen dieses Prinzip adaptieren relativ genau die beschriebene Grundidee, sind aber mit einigen Nachteilen behaftet.

So führt die unvorteilhafte Geometrie der Elutionskammer zur Mischung der getrennten Komponenten, welche das Gel verlassen, woraus eine starke Bandenverbreiterung resultiert. Wird die Kammer jedoch relativ klein gehalten, besteht die Gefahr, dass die Analyten weiter in die Richtung der entsprechenden Gegenelektrode wandern und damit für weitere Experimente nicht mehr zur Verfügung stehen. Nichtsdestotrotz konnten mit dieser Technik interessante Resultate erzielt werden, vor allem durch eine kontinuierliche Optimierung der apparativen Seite.

So wurde diese Technik zunächst eingesetzt, um Proteine mittels unterschiedlicher Gelsysteme zu trennen, sie fraktionierend zu sammeln und anschließend weiter zu analysieren. Hierbei kamen kontinuierliche und diskontinuierliche Gelsysteme auf Polyacrylamid-Basis zum Einsatz, um Plasmaproteine wie Hämoglobin<sup>80</sup> oder Thyroglobulin und auch Hormone<sup>81</sup> zu untersuchen. Duesberg et. al. untersuchten, inwieweit unterschiedliche Puffersysteme zur Optimierung der präparativen Trennung von Proteinen einen Einfluss haben können<sup>82</sup>. Der Einsatz von SDS als Denaturierungsreagenz sowie der Einsatz einer Elutionsfritte, ähnlich wie in dieser Arbeit beschrieben, erlaubte die präparative Aufarbeitung komplexerer Proteinmischungen.

Aber auch die Untersuchung und Präparation von DNA wurde mit dem Prinzip der kontinuierlichen Elution verwirklicht. Mittels einer horizontalen Anordnung, direkt angelehnt an die klassische Plattengel-Elektrophorese, findet sich eine Beschreibung zur Aufreinigung von genomischer DNA, realisiert durch die Einführung eines Reservoirs in das Gel, in welchem sich DNA-Fragmente sammeln konnten<sup>83</sup>.

Mit der meist verwendeten vertikalen Anordnung wurden unter anderem DNA-Fragmente isoliert und mittels UV-Absorption quantifiziert<sup>84</sup>, sowie größere Mengen an RNA präpariert<sup>85</sup>.

Der Schritt von diesen präparativen Methoden hin zu analytischen Arbeiten ist jedoch nicht weit. Bereits bei einigen präparativen Anwendungen wurde das Eluat zunächst durch einen UV-Detektor geleitet, um zu erkennen, wann eine neue Fraktion gesammelt werden muss. Ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom kann aber genauso in das

---

<sup>80</sup> JOVIN et. al. (1964) *Anal. Biochem.* **9**, 351-369

<sup>81</sup> LEWIS et. al. (1963) *Anal. Biochem.* **6**, 303-315

<sup>82</sup> DUESBERG und RUECKERT (1965) *Anal. Biochem.* **11**, 342-361

<sup>83</sup> POLSKY et. al. (1978) *Anal. Biochem.* **87**, 397-410

<sup>84</sup> ROSSI (1978) *Anal. Biochem.* **85**, 291-294

<sup>85</sup> HAGEN (1979) *Anal. Biochem.* **93**, 299-305

Zerstäubersystem eines ICP-MS geführt werden, wodurch eine Online-Detektion der Elementzusammensetzung der jeweils eluierenden Fraktionen möglich sein sollte. Natürlich müssen alle Größenverhältnisse einer solchen Elektrophoreseapparatur für analytisches Arbeiten mit einer Online-Detektion angepasst sein. Hierbei kommt der Elutionsregion eine entscheidende Bedeutung zu. Durch deren Geometrie und Aufbau muss gewährleistet sein, dass die durch die GE getrennten Moleküle effektiv aus der Elektrophoresezelle heraustransportiert werden, ohne dass zusätzliche Diffusionseffekte die Auflösung einer Trennung verschlechtern.

Weiterhin muss der Flussrate des Elutionsmittels geeignet für eine effektive Produktion eines Aerosols im Zerstäuber-System des ICP-MS sein, wodurch letztendlich die gesamten Größenverhältnisse der Elutionsregion vorgegeben sind. Zusätzlich muss das Elutionsmittel natürlich möglichst konstant fließen, um eine Reproduzierbarkeit etwaiger Trennergebnisse zu gewährleisten.

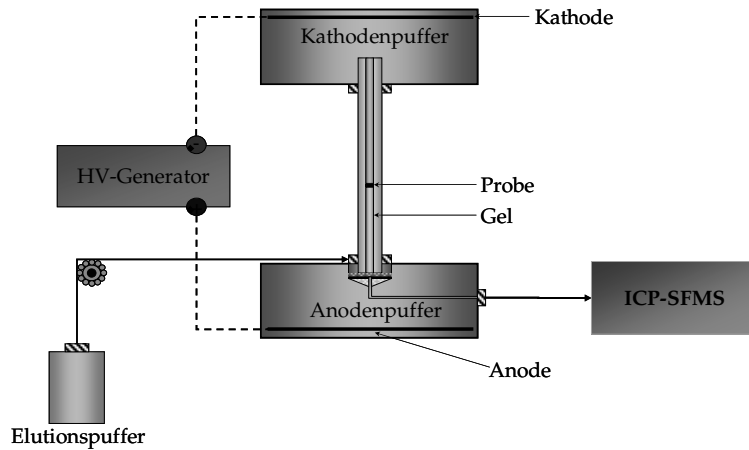
Eine wichtige Rolle spielt auch die Gesamtdauer einer Analyse. Gelelektrophoretische Trennungen, ob nun in der klassischen analytischen Anordnung oder in der präparativen, nehmen in der Regel einen längeren Zeitraum in Anspruch, im Extremfall mehrere Stunden. Eine solche Analysendauer wäre für eine Online-Kopplung mit einem Detektor wie dem ICP-MS wenig praktikabel, und es muss sich zeigen, ob mittels der GE auch effektive Trennungen in kürzerer Zeit erreicht werden können. Hierbei sollten die Dimensionen des Gels eine entscheidende Rolle spielen, welche daher für das analytische Arbeiten optimiert werden müssen.

All diese Anforderungen wurden in dem Versuchsaufbau, welcher im Folgenden beschrieben werden soll, weitestgehend berücksichtigt.

### **II.3.3 Versuchsaufbau**

Das verwendete Gelelektrophorese-System ist zwar für präparatives Arbeiten konzipiert, konnte aber durch leichte Modifikationen für analytische Zwecke genutzt werden.

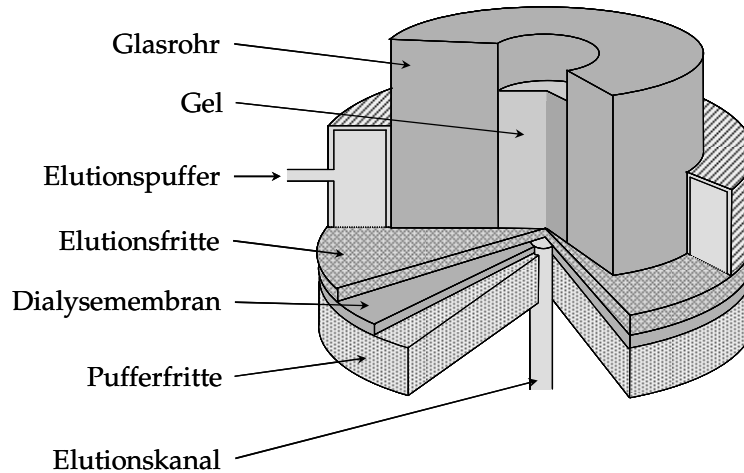
In Abbildung 14 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.



**Abbildung 14: Prinzipieller Aufbau der GE-ICP-MS-Kopplung**

Das Gel befindet sich in einem Glasröhrchen, welches vertikal zwischen den beiden mit Elektrolyt gefüllten Elektrodenräumen angeordnet ist. Der Elektrolyt der oberen Elektrodenkammer – in der Regel der Kathodenraum – steht in direktem Kontakt zu dem oberen Ende des Gels. Da das Gel nie die volle Länge des Glasröhrchens ausfüllt, ist der restliche Teil des Röhrchens daher mit dem Elektrolyt aufgefüllt.

Am unteren Ende des Glasröhrchens schließt das Gel bündig mit dem Röhrchen ab, was für die effiziente Elution der Analyten aus dem Gel von entscheidender Bedeutung ist, da es sich hier um die Elutionsregion handelt. Ebenfalls bündig um das untere Ende des Röhrchens befindet sich eine Gummimanschette, welche aus praktischen Gründen der Dichtigkeit dort angebracht ist. Diese Konstruktion aus Gel/Glasröhrchen/Manschette sitzt mit einem gewissen Druck fest auf einer porösen Glasfritte (siehe Abbildung 15), welche von außen nach innen mit dem Elutionsmittel durchflossen wird und damit den beschriebenen Elutionskanal darstellt. Die Verwendung einer Fritte bringt einige Vorteile mit sich, welche später noch genauer ausgeführt werden sollen.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Elutionsregion**

Direkt unterhalb dieser Elutionsfritte befindet sich eine dünne Dialysemembran, welche zum einen die untere Begrenzung des Elutionskanals darstellt, zum anderen verhindern soll, dass Makromoleküle weiter in die Richtung der unter Elektrode wandern. In der Mitte dieser Dialysemembran befindet sich eine kleine Öffnung, durch welche das Elutionsmittel aus der Elutionsfritte abfließen kann.

Der Bereich Elutionsfritte/Dialysemembran wird von unten stabilisiert durch eine weitere Fritte, welche zum einen mechanische Stabilität verleiht, andererseits – und das ist viel wichtiger – durch den Kontakt mit dem Elektrolyt des unteren Elektrodenraums den elektrischen Stromfluss gewährleistet. In der Mitte dieser Fritte befindet sich ebenfalls ein kleiner Kanal, der am oberen Ende direkt an die Öffnung in der Dialysemembran anschließt und an dessen unterem Ende eine Schlauchverbindung das Elutionsmittel aus der Elektrophoresezelle heraus führt.

Mittels einer peristaltischen Pumpe, welche an diese Schlauchverbindung angeschlossen ist, wird das Elutionsmittel aus einem Reservoir durch die Elutionsregion gezogen und direkt in das Zerstäubersystem des ICP-MS transportiert.

### II.3.4 Elektrolyte

Prinzipiell können mit der beschriebenen Versuchsanordnung alle in der Gelelektrophorese gebräuchlichen Puffersysteme eingesetzt werden. Darüber

hinaus wurden Puffersysteme eingesetzt, welche in der GE normalerweise keine Anwendung finden, für die Kopplung mit dem ICP-MS jedoch von Vorteil waren. Die Hauptaufgabe der Elektrolyte muss es sein, einen stabilen Stromfluss bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des pH-Werts zu gewährleisten. Der eingesetzte Puffer kann in drei Variablen verändert werden: der Zusammensetzung, der Konzentration und dem pH-Wert. Wie später noch genauer beschrieben werden wird, kann allen drei Variablen ein Einfluss auf die Trennleistung zugeschrieben werden, wobei auch Effekte außerhalb der GE zu berücksichtigen sind. Systematische Arbeiten in diesem Zusammenhang wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. In Tabelle 2 sind einige Puffersysteme, welche für die GE zu verwenden sind, angegeben.

**Tabelle 2: Gebräuchliche und weniger gebräuchliche (\*) Puffer-Systeme in der GE**

<b>Abkürzung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pH-Wert</b>
TBE	Tris Borsäure EDTA	7,3-9,3
TAE	Tris Essigsäure EDTA	7,0-9,0
TE	Tris EDTA	6,6-8,6
TG	Tris Glycin	7,3-9,3
SB*	Natronlauge Borsäure	7,5-9,5
AA*	Essigsäure Ammoniak	8,0-10,0

### II.3.5 Dimensionen des Gels

Die Dimensionen der Gelsäule sind durch die Abmessungen der einsetzbaren Glasröhrchen begrenzt. Deren Länge beträgt aus apparativen Gründen 13 cm, womit auch die Obergrenze für die Gellänge von höchstens 12,5 cm gegeben ist, da noch ein Freiraum zum Auftrag der Probe verbleiben muss. Nach unten hin ist die Länge des Gels theoretisch nicht begrenzt, doch sollte sie mindestens 0,5 cm betragen, um eine minimale mechanische



Stabilität zu gewährleisten. Zudem soll das Gel auch eine Trennwirkung erzielen können. Der Durchmesser des Gels kann je nach Innendurchmesser des Glasröhrchens variabel eingestellt werden, wobei für präparatives Arbeiten seitens des Herstellers Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 7 mm vorgesehen sind. Da dieses für die analytischen Fragestellungen jedoch nicht angemessen erschien, wurden Röhrchen mit Innendurchmessern von 1,2, 2,2 und 3 mm angefertigt. Die Verwendung kleinerer Innendurchmesser ist möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert.

Der Einfluss der Geldimensionen, also Länge und Durchmesser, auf die Trennleistung wurde im Rahmen dieser Arbeit systematisch untersucht.

### **II.3.6 Zusammensetzung des Gels**

Grundsätzlich kann in der GE-Apparatur sowohl Agarose (AG) als auch Polyacrylamid (PA) als Gelmaterial dienen. Die Wahl des entsprechenden Materials ist nur abhängig von den entsprechenden Zielanalyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fast ausschließlich Agarose-Gele verwendet, da diese für die Trennung der untersuchten Analyten sehr gut einsetzbar waren. Ein Vorteil der Agarose gegenüber Polyacrylamid als Gelmaterial ist eher praktischer Natur und betrifft die Toxizität. Die zur Herstellung von PA-Gelen benötigten Monomere Acrylamid und Bisacrylamid sind als giftig (T+) sowie kanzerogen eingestuft, was das Arbeiten mit diesen Substanzen erschwert. Zusätzlich stehen mittlerweile Agarosen zur Verfügung, welche sich durch ein außerordentlich gutes Trennvermögen in Größenbereichen auszeichnen, die bislang nur durch PA-Gele zugänglich waren. Daher bildet in vielen Fällen die vollkommen ungiftige, hochauflösende Agarose eine gute Alternative zu Polyacrylamid.

Maßgeblich für die Trennung ist die Porengröße in dem Gel, welche durch die Konzentration des Monomers bestimmt ist. Bei PA-Gelen kommt zusätzlich noch der Grad der Vernetzung hinzu. Die Wahl der richtigen Gelkonzentration ist eine entscheidende Variable bei der zielgerichteten Optimierung einer Trennung und war im Rahmen dieser Arbeit Bestandteil zahlreicher systematischer Untersuchungen.

### II.3.7 Das Elutionsmittel

Es ist von Vorteil, aber nicht zwingend erforderlich, wenn das Elutionsmittel die gleiche oder zumindest eine ähnliche Zusammensetzung aufweist, wie die restlichen Elektrolyten in der GE-Apparatur. Zum einen muss es natürlich auch den elektrischen Kontakt gewährleisten, da es an der Verbindung zwischen Gel und unterem Elektrodenraum vorbei fließt. Zum anderen vereinfacht es die Optimierung einer Trennung, da bei einer abweichenden Zusammensetzung des Elutionsmittels von den restlichen Elektrolyten zusätzliche Konzentrations- und pH-Wert-Gradienten in der Elutionsregion auftauchen würden. Prinzipiell ist dies aber möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch untersucht.

Ein Unterschied zwischen dem Elutionsmittel und den anderen Elektrolyten jedoch ist, dass dem Elutionsmittel ein interner Standard zugesetzt wurde. Dieser diente der Kontrolle des gleichmäßigen Flusses aus der GE-Apparatur in das ICP-MS und wurde zusätzlich genutzt, um Empfindlichkeitsschwankungen des Detektors während eines elektro-phoretischen Laufs auszugleichen. Als interner Standard kam Rhodium (Rh) in einem Konzentrationsbereich von 1-10 ng g<sup>-1</sup> zum Einsatz.

### II.3.8 Die Elutionsfritte

Die Elutionsfritte besteht aus einem porösen Glasmaterial und erfüllt zweierlei Funktion. Zum einen verhindert sie, dass das Gel durch die Wirkung des Elutionsmittelflusses in den Elutionskanal hinein gesaugt wird, was unweigerlich zu einer Verstopfung desselben führen würde. Diese Gefahr würde vor allem bei niedrig konzentrierten Agarose-Gelen bestehen, da diese nur eine sehr begrenzte mechanische Stabilität aufweisen. Zum anderen minimiert der Einsatz einer Fritte die Gefahr der Vermischung bereits getrennter Komponenten in der Elutionsregion. Würde das Elutionsmittel frei unter dem Gel entlang fließen, könnte es leicht zu Turbulenzen kommen, welche die Auflösung der Trennung verschlechtern würden. Die Fritte kontrolliert in gewissem Maße den Fluss des Elutionsmittels und trägt so zu einer verbesserten Trennleistung bei.

### II.3.9 Die Dialysemembran

Die Dialysemembran besteht aus Celluloseacetat und ist charakterisiert durch die Ausschlussgrenze („cut-off“) von 3 kDa, was heißt, dass Moleküle größer als 3000 Da diese Membran nicht passieren können. Der Sinn der Verwendung einer solchen Dialysemembran an dieser Stelle liegt auf der Hand. Da in der Regel Makromoleküle mit dieser Apparatur getrennt werden sollen, wird so verhindert, dass diese nach dem Verlassen des Gels weiter zur entsprechenden Gegenelektrode wandern. Wie aber im Laufe dieser Arbeit noch gezeigt werden wird, reicht allein die Geschwindigkeit des Elutionsmittelflusses aus, um diesen Effekt zu vermeiden. Ansonsten wäre es nicht möglich, kleinere Moleküle, welche aus dem Gel heraus migrieren, wie beispielsweise Phosphat, zu detektieren.

### II.3.10 Der Transfer zwischen GE und ICP-MS

Das Elutionsmittel wird mittels einer peristaltischen Pumpe aus einem Reservoir heraus durch die Elutionsregion hindurch und weiter in das Zerstäubersystem des ICP-MS gepumpt. Sie befindet sich also zwischen dem Ausgang der GE-Apparatur und dem ICP-MS. Eine solche Anordnung ist natürlich mit einem entscheidenden Nachteil verbunden. Das große Totvolumen zwischen der Elutionsregion und dem Detektor führt unweigerlich zu Dispersionseffekten und, damit verbunden, zu einer Verschlechterung der elektrophoretischen Auflösung. Leider war es aufgrund apparativer Gegebenheiten nicht möglich, diesen Nachteil zu beheben. Um wenigstens das Totvolumen zu minimieren, wurden möglichst kurze Schlauchverbindungen mit kleinen Innendurchmessern für die Verbindung zwischen GE und ICP-MS gewählt.

Sowohl die Schlauchverbindungen aus der GE und in den Zerstäuber als auch der Saugschlauch der peristaltischen Pumpe besaßen einen Innendurchmesser von 0,4 mm. Bei einer Gesamtlänge von 40 cm ergab sich daraus ein Totvolumen zwischen dem Ausgang der Elutionsregion und dem Eingang des Zerstäubers von 50  $\mu\text{L}$ .

Mittels der peristaltischen Pumpe wurde ein Fluss von 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  eingeregelt, was der Vorgabe des Herstellers der GE-Apparatur entsprach als auch durch initiale Experimente als optimale Flussrate bestätigt werden konnte.

### II.3.11 Zerstäuber und Sprühkammer

Als Zerstäuber kam ein Micromist 100 (AHF, Tübingen) zum Einsatz, da dieser für die notwendige Flussrate von  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  eine optimale Zerstäubung gewährleisten konnte. Dieser Zerstäuber wurde mit einer doppelwandigen Scott-Sprühkammer versehen.

### II.3.12 Das ICP-MS

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer (Element 2, Thermo Finnigan) genutzt. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung von DNA-Fragmenten lag, musste ein solches Massenspektrometer eingesetzt werden, um das Element Phosphor interferenzfrei bestimmen zu können. Dies ist bei einer Massenauflösung ( $m/\Delta m$ ) von 4000, welche dieses Gerät gewährleistet, problemlos möglich. Die Alternative eines ICP-MS mit Quadrupol-Massenfilter und Reaktions-/Kollisionszelle ausgestattet, stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Es ist aber ohne weiteres möglich die entwickelte Kopplung auf andere ICP-MS zu übertragen, was für andere Fragestellungen in der Arbeitsgruppe auch bereits getan wurde.

Die genauen Einstellungen des ICP-MS waren Bestandteil täglicher Optimierungsmaßnahmen. Diese Maßnahmen wurden mittels der den jeweiligen Trennbedingungen angepassten Standardlösungen durchgeführt und im Hinblick auf ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis gestaltet.

### II.3.13 Zusammenfassung der experimentellen Rahmenbedingungen

In der Tabelle 3 sind alle experimentellen Parameter festgehalten, sofern sie in dieser Arbeit Anwendung fanden.

**Tabelle 3: Experimentelle Parameter**

<b>GE-System</b>	<b>MiniPrepCell, Biorad</b>
Gelmaterial	Agarose
Gel-Länge	25 – 60 mm
Gel-Innendurchmesser	3,0 – 1,2 mm
Elektrolyte	TBE, SB, AA
Elutionsmittel	Elektrolyt + interner Standard (10 ng g <sup>-1</sup> Rh)
Injektionsvolumen	1 – 5 µL <sup>-1</sup>
Spannung	50 – 500 V
Flussrate Elutionsmittel	100 µL min <sup>-1</sup>
<b>ICP-MS</b>	<b>Element 2, Thermo</b>
Massenauflösung (m/Δm)	4000
Plasmaleistung	~ 1300 W
Kühlgas (Ar)	~ 16 L min <sup>-1</sup>
Hilfsgas (Ar)	~ 1,1 L min <sup>-1</sup>
Zerstäubergas (Ar)	~ 0,9 L min <sup>-1</sup>
Zerstäuber	Micromist 100
Sprühkammer	Scott-Typ
Mass window	80%
Points per peak	20
Dwell time	10 ms
Scan type	E-scan
Repetitions	30
Detection mode	Pulse counting

## II.4 Experimentelles Vorgehen

### II.4.1 Vorbemerkung

In diesem Abschnitt soll dargelegt werden, welche Arbeitsschritte zum erfolgreichen Analysieren einer Probe mittels der GE-ICP-MS-Kopplung notwendig sind. Von den Optimierungsmaßnahmen bei der Untersuchung neuartiger Analytsysteme abgesehen, besteht das Vorgehen aus: der Präparation des Gels, Einbau des Gels in die GE-Apparatur, Kopplung an das ICP-MS, Vorreinigung des Gels und schließlich dem Auftrag der Probe. Da mit einem Gel natürlich mehrere Proben untersucht werden können, fallen die ersten vier Arbeitsschritte nur an, wenn ein frisches Gel präpariert werden muss.

### II.4.2 Präparation der Gele

Der sorgfältigen Herstellung der Trenngele kommt eine entscheidende Bedeutung bei dem Einsatz der beschriebenen Elektrophoresekammer zu. Die Gele müssen selbst hergestellt werden, was den Vorteil mit sich bringt, dass für jede Applikation ein spezielles Gel konzipiert werden kann. Der Länge des Gels sowie der Porengröße, welche durch die Konzentration des Gelmaterials in der Lösung eingestellt wird, kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Da für die hier beschriebenen Applikationen nur Agarose als Gelmateriale genutzt wurde, soll auch nur die Herstellung von Agarose-Gele beschrieben werden.

Prinzipiell funktioniert die Gelherstellung für diese Art der Elektrophorese genauso wie für die klassische Elektrophorese. Eine bestimmte Menge an Agarose wird in einer bestimmten Menge des zu verwendenden Puffers geschmolzen, abhängig von der zu erreichenden Endkonzentration. Die noch heiße Agarose-Schmelze wird in eine Form gefüllt, welche der gewünschten Form des fertigen Gels entspricht. Nach dem Abkühlen erstarrt die Agarose/Puffer-Mischung zu einem Gel mit der konzentrationsabhängigen Porengröße.

In der klassischen Platten-Gelelektrophorese ist dieser Vorgang des Gel-Gießens trotz der teils hohen Viskosität der Agarose-Schmelzen recht unproblematisch. Auch für den bestimmungsmäßigen Gebrauch der Elektrophoresezelle zur präparativen Aufreinigung von Proteinen spielt dieser Umstand keine Rolle, da Glasröhrchen mit einem größeren Innendurchmesser (> 6 mm) vorgesehen sind. Soll die heiße Agarose-

Schmelze hingegen gleichmäßig in ein Glasröhrchen kleineren Innendurchmessers (< 3 cm) eingebracht werden, so tauchen gleich mehrere Probleme auf. Im Folgenden sollen die Probleme, welche bei der Herstellung analytische nutzbarer Gele für die verwendete Elektrophoresezelle auftraten, kurz skizziert werden, um den Lösungsansatz, welcher in diesem Zusammenhang erarbeitet wurde, verständlicher zu machen.

### Problem: Mangelnde Haftung Agarose-Glas

Die polare Oberfläche der Glasröhrchen verhindert, dass die recht unpolaren Agarosegele an der Oberfläche haften bleiben und sie damit nicht in den Glasröhrchen fixiert sind. Dies hat einerseits zur Folge, dass das Gel durch die mechanischen und thermischen Belastungen in der Zelle deformiert wird, bzw. komplett innerhalb des Glasröhrchens bewegt wird. Während das eine zu einer Veränderung der Trennleistung führt, resultiert das andere in dem vollständigen Verlust derselben. Andererseits begünstigt die mangelnde Haftung des Gels an der Glasoberfläche die Bildung von Hohlräumen, welche mit Flüssigkeit gefüllt eine weitere Schicht zwischen Gel und Glasoberfläche bilden. Es konnte beobachtet werden, dass nach Auftrag einer Probe ein Teil derselben aufgrund des geringeren Widerstands eine „Abkürzung“ durch diese Schicht nimmt, was verständlicherweise zu einer verminderten elektrophoretischen Auflösung führt.

### Lösung: Beschichtung der Glasoberfläche

Durch ein relativ einfaches Verfahren lässt sich die Oberfläche von normalem Glas so behandeln, dass Agarosegele darauf haften bleiben. Wird die Glasoberfläche mit heißer Agaroseschmelze in Kontakt gebracht und der Film, welcher nach dem Kontakt zurückbleibt, zügig eingetrocknet, so bildet sich auf der Glasoberfläche eine unpolare Agaroseschicht. Ein Gel, welches auf dieser behandelten Oberfläche erzeugt wird, bleibt darauf haften und zeigt eine hohe mechanische Stabilität.

### Problem: Luftblasen im Gel

Es muss streng darauf geachtet werden, dass in dem gesamten Gel in dem Röhrchen keine Gasblasen verbleiben, da ansonsten die Trennergebnisse, welche mit einem solchen Gel erzielt werden können, recht mäßiger Natur sind. Eine größere Luftblase über den ganzen Innendurchmesser des Röhrchens wirkt als Isolator, das heißt es kommt zu überhaupt keiner Trennung, da kein elektrischer Strom fließt. Kleinere Luftbläschen im Gel bewirken eine lokale Verzögerung der Ionenfront, woraus eine verminderte

elektrophoretische Auflösung resultiert. Da es zum gleichmäßigen Schmelzen der Agarose aber notwendig ist, die Lösung zu rühren, kommt es zwangsläufig dazu, dass in der Schmelze Luftbläschen inkorporiert sind. Je höher die Konzentration der Schmelze und damit verbunden auch deren Viskosität, umso problematischer ist es, diese Bläschen effektiv aus der Schmelze zu entfernen.

### Lösung: Ruhezeit bei erhöhter Temperatur

Der Vorteil bei der Verwendung von Agarose als Gelmedium ist, dass eine präparierte Schmelze fast beliebig lange in diesem Zustand aufbewahrt werden kann, ohne dass der Gelierungsprozess einsetzt. So kann die Schmelze so lange bei einer Temperatur über dem Schmelzpunkt der verwendeten Agarose ruhen, bis alle Luftblasen ohne weiteres Zutun die Schmelze verlassen haben.

### Problem: Vorzeitiges Gelieren beim Befüllen der Röhren

Zum Befüllen der Glasröhren mit dem Gelmedium ist es seitens des Herstellers vorgesehen, das Glasröhrchen an einem Ende zu verschließen, um es dann durch das andere Ende mit einer Spritze zu befüllen<sup>86</sup>. Bei Röhren mit größerem Innendurchmesser (> 6 mm) und niedrig konzentrierten Agaroseschmelzen (< 2%) ist dies auch kein weiteres Problem. Gerade aber bei höher konzentrierten Agaroseschmelzen (> 2%) besteht die Gefahr, dass die Schmelze noch in der Spritze, bzw. frühzeitig in dem engen Röhren erstarrt. Eine erfolgreiche Präparation hochprozentiger Gele mit kleinem Innendurchmesser ist mit dieser Methode daher sehr problematisch bis unmöglich.

### Lösung: Befüllen der Röhren von unten

Durch Eintauchen der Glasröhren in die frisch hergestellte Agaroseschmelze dringt dieselbe in das Röhren ein, ohne dass es zu einem vorzeitigen Erstarren kommt. Der Arbeitsschritt, die Schmelze aus dem Gefäß in welchem sie präpariert wird, in das Röhren zu überführen, wird dadurch vermieden. Nach dem Erstarren der Schmelze können die mit Gel gefüllten Röhren nun einfach aus dem überschüssigen Gel herausgezogen werden.

---

<sup>86</sup> BioRad Instruction Manual MiniPrepCell



### Problem: Meniskus an der Geloberfläche

Durch Adhäsion an der beschichteten Glasoberfläche bildet sich am oberen Ende des Gels ein Meniskus aus. Da die Probe auf diese Seite des Gels aufgetragen wird, führt dieser im Vergleich zu einer ebenen Geloberfläche zu einer zusätzlichen Dispersion.

### Lösung:

In der Literatur wird eine Möglichkeit beschrieben, wie die Ausbildung eines solchen Meniskus vermieden werden kann<sup>87</sup>. Durch Überschichten der noch flüssigen Gelschmelze mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch (19:1) bildet sich eine plane Grenzfläche zwischen den beiden Phasen und die Ausbildung eines Meniskus wird dadurch verhindert. Sehr problematisch bei diesem Vorgehen jedoch ist, dass durch die Überschichtung der Gelschmelze mit dem Wasser/Ethanol-Gemisch ein Teil der Gelschmelze wieder aus dem Glasröhrchen heraus gedrückt wird. Ein reproduzierbares Einstellen der Gellänge, welche einen entscheidenden Einfluss auf die spätere Trennleistung hat, ist damit *de facto* nicht mehr möglich. Daher wurde diese Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht verwandt und der Meniskus zugunsten einer definierten Gellänge in Kauf genommen.

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte beschrieben, welche als konkrete, praktische Umsetzung des bisher Beschriebenen zu verstehen sind und die Standardprozedur für die Herstellung von Gelen, welche im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen, darstellt. Mit diesem geschilderten Vorgehen ist es möglich, sehr homogene Gele mit definierter Zusammensetzung und Struktur reproduzierbar herzustellen, was für das analytische Arbeiten mit diesen Gelen unabdingbar ist.

### Arbeitsschritte zur Herstellung von Gelen

#### i. Vorreinigung der Glasröhrchen

Zum Entfernen Gelrückständen oder anderen Verunreinigungen werden die Glasröhrchen zunächst in 2%iger Salpetersäure für 30 min und danach

---

<sup>87</sup> ANDREWS (1988)

für weitere 30 min in MilliQ-Wasser gekocht. Getrocknet wird im Trockenschrank bei 80°C für 3h.

### ii. Beschichten der Glasröhrchen

Durch Schmelzen von 1 g Agarose (Seakam LE) in 100 ml Wasser im kochenden Wasserbad wird eine 1%ige Gelschmelze hergestellt. Diese Gelschmelze wird auf 80°C abgekühlt und die Glasröhrchen senkrecht darin positioniert, wobei darauf zu achten ist, dass die Glasröhrchen mindestens soweit in die Schmelze eintauchen, wie die spätere Länge des Gels geplant ist. Die Glasröhrchen verbleiben 5 min in dieser Schmelze, welche für diese Zeit im Trockenschrank (80°C) aufbewahrt wird.

Nach dieser Zeit werden die Glasröhrchen aus der Schmelze gezogen und solange mit dem unteren Ende auf Zellstoff aufgetupft, bis keine Gelschmelze mehr den Innendurchmesser der Röhrchen verschließt. Sodann werden die Röhrchen senkrecht in einem mit Zellstoff ausgelegten Becherglas positioniert und bei 60°C im Trockenschrank zur Ausbildung der Agarosebeschichtung für mindestens 3 h getrocknet.

### iii. Herstellung der Gelschmelze

Die Gelschmelze wird direkt in dem Gefäß hergestellt, in welches später das Glasröhrchen eintauchen soll. Hierfür werden Glasvials (15 mL) verwendet, da diese genau die entsprechenden Dimensionen besitzen, ohne dass zuviel überschüssiges Agarosegel erzeugt wird. Das Gel wird mit der Elektrolyt-Lösung zubereitet, welche auch später in den Elektrodenräumen zum Einsatz kommen soll. Je nach geplanter Länge und Konzentration des Gels (siehe Berechnungsbeispiel) wird die Hälfte des entsprechenden Volumens des Elektrolyts in das Vial eingefüllt. Danach wird die entsprechende Menge an Agarose (Metaphor) in das Vial direkt eingewogen und erst dann mit dem restlichen Volumen an Elektrolyt aufgefüllt. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass sich gerade bei höher konzentrierten Gelschmelzen keine Agarose-Pfropfen an der Glaswand bilden.

Nachdem dieses Gemisch zusammen mit einem Rührfisch verschlossen wurde, wird es in ein warmes Wasserbad verbracht, welches sodann zum Sieden erhitzt wird, wobei in die Gel/Elektrolyt-Mischung immer kräftig gerührt werden muss.

Ist der Schmelzvorgang abgeschlossen, was daran zu erkennen ist, dass die Schmelze vollkommen klar geworden ist, wird das noch verschlossene Vial

zum Entfernen der Luftblasen in den Trockenschrank (80°C) verbracht. Dieser Vorgang dauert je nach Konzentration der Gelschmelze zwischen 5-10 min und wird durch stete Beobachtung kontrolliert. Gleichzeitig wird das zu verwendende Glasröhrchen mit in den Trockenschrank gelegt, um die Temperatur dem der Gelschmelze anzupassen. Hierdurch wird verhindert, dass es zu einem vorzeitigen Erstarren der Gelschmelze im Röhrchen kommt.

#### iv. Präparation des Gels im Röhrchen

Nachdem alle Luftblasen die Gelschmelze verlassen haben, wird das Vial geöffnet, der Rührfisch entfernt und das vorgewärmte Glasröhrchen vorsichtig, senkrecht in die Gelschmelze eingetaucht, wobei darauf zu achten ist, dass der beschichtete Abschnitt des Glasröhrchens verwendet wird. Diese Anordnung wird bis zum vollständigen Erstarren des Gels bei Raumtemperatur, was ungefähr eine Stunde in Anspruch nimmt, stehen gelassen

#### v. Isolierung des Gels

Nachdem das Gel vollständig erstarrt ist, wird das Glasröhrchen vorsichtig mit leichter Drehbewegung aus dem Vial heraus gezogen, ohne dass das Gel in dem Glasröhrchen mit herausgezogen wird. Bei höher konzentrierten Gelen (> 3%) ist es bisweilen notwendig, das Vial manuell zu zerstören, um das Röhrchen aus dem überschüssigen Gel heraus zu präparieren. Da das Glasröhrchen mit dem unteren Ende auf dem Boden des Vials aufgelegt hat, sollte das Gel im Inneren des Röhrchens nun plan mit dem Ende des Röhrchens abschließen. Nach dem Entfernen überschüssiger Gelreste auf der Außenseite des Glasröhrchens und der genauen Vermessung der Gellänge ist das Gel einsatzbereit.

### Berechnungsbeispiel für die Gel-Herstellung

Es soll ein Gel mit einer Konzentration von 4% und den Dimensionen 40x3 mm hergestellt werden.

Erfahrungsgemäß ergibt 1 mL Gelschmelze bei einem Glasröhrchen mit dem Innendurchmesser von 3 mm eine Gellänge von 5 mm, d.h. es müssen 8 mL Gelschmelze hergestellt werden.

Die Angabe des Agarose-Gehalts in einem Gel ist aus praktischen Gründen immer als Masse Agarose pro Volumen Lösungsmittel zu verstehen, also entspricht ein 1%iges Gel 1 g Agarose in 100 mL Lösungsmittel<sup>88</sup>. In diesem konkreten Fall müssen also 320 mg Agarose in 8 mL Elektrolyt-Lösung eingewogen werden.

### II.4.3 Einbau des Gels in die GE-Apparatur

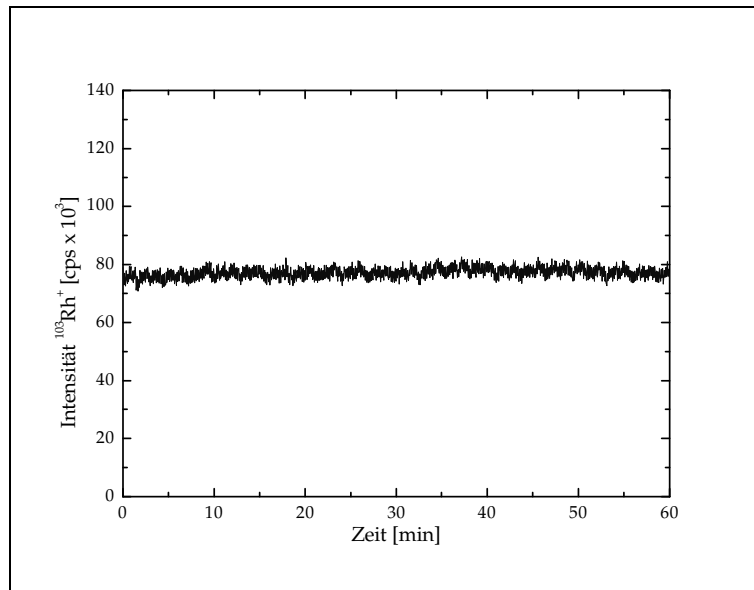
Der Einbau des Gelröhrchens in die Elektrophoresezelle wird gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt<sup>86</sup>. Hierbei ist in besonderem Maße darauf zu achten, dass der gesamte Elutionsregion frei von Luftblasen gehalten wird sowie keine Kontaminationen in den Elutionspuffer gelangen.

### II.4.4 Kopplung der GE-Apparatur an das ICP-MS

Wie bereits beschrieben, wird der Ausgang der Elutionsregion mittels des Saugschlauchs der peristaltischen Pumpe mit dem Zerstäuber des ICP-MS verbunden. Nach dem Starten der Pumpe wird solange Elutionsmittel durch das System gepumpt, bis das Signal des internen Standards am ICP-MS stabil und möglichst rauschfrei zu beobachten ist. Veränderungen am Signal des internen Standards, wie starkes Rauschen, Signalsprünge oder schwankende Zu- bzw. Abnahme über einen längeren Zeitraum, sind ein Zeichen dafür, dass irgendwo zwischen der Elutionsregion und dem Detektor ein Problem aufgetreten ist. Eine begrenzte periodische Schwankung in dem Signal lässt sich durch den pulsierenden Charakter einer peristaltischen Pumpe jedoch nicht vermeiden. In Abbildung 16 ist ein solches Signal, welches allein durch den Eintrag des Elutionsmittels in das ICP-MS entsteht, dargestellt.

---

<sup>88</sup> WESTERMEIER (2005)



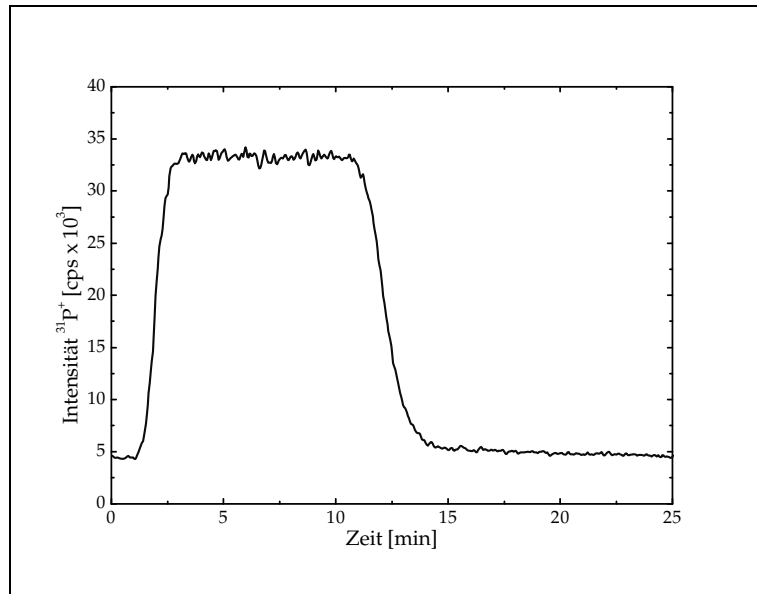
**Abbildung 16: Signal des internen Standards Rhodium (4 ng g<sup>-1</sup>) im Elutionsmittel unter stabilen Bedingungen (RSD ≤ 3%)**

#### II.4.5 Reinigung des Gels

Die Reinheit der zu verwendenden Chemikalien ist für eine Elementanalyse im Spuren- bzw. Ultraspurenbereich von entscheidender Bedeutung. Für die etablierten Kopplungstechniken stellt dies in der Regel kein Problem mehr dar, da alle notwendigen Chemikalien in reiner oder hochreiner Form erhältlich sind. Anders verhält es sich mit den meisten Substanzen, welche für die Bioanalytik benötigt werden. Da hier bislang andere Fragestellungen als die elementanalytischen dominierten, liegt der Schwerpunkt bei der Aufbereitung von Chemikalien anders. Als Beispiel sei hier angeführt, dass alle möglichen Puffersysteme in der Qualitätsstufe „DNAse/RNAse-frei“ erhältlich sind, was aus bioanalytischer Sicht sicherlich extrem wichtig ist. Jedoch sind solche Chemikalien für die Spurenanalyse bestimmter Elemente nicht geeignet, da deren Reinheit dafür nicht ausreicht. Auch diese Tatsache spielte bei der Wahl geeigneter Puffersysteme eine Rolle.

Besonders gravierend stellt sich dieses Problem bei dem Gelmaterial Agarose dar, da dieses letztendlich als ein aufgereinigtes Naturprodukt zu sehen ist. Doch mittels des entwickelten Systems ist es möglich, zumindest dieses Problem zu umgehen. Durch eine elektrophoretische Reinigung eines frisch präparierten Gels können alle mobilen Verunreinigungen in dem Gel entfernt werden. Dieser Vorgang lässt sich mittels der ICP-MS-Detektion

verfolgen und ist beispielhaft für P-haltige Kontaminationen in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Elektrophoretische Reinigung eines frisch präparierten Gels demonstriert anhand von P-haltigen Verunreinigungen<sup>89</sup>**

Wie deutlich zu erkennen ist, enthält das verwendete Gelmaterial einen hohen Anteil an P-haltigen Verbindungen, wobei ein Großteil davon wohl durch Phosphat repräsentiert wird. Das zu beobachtende Elutionsprofil spiegelt wider, dass Verunreinigungen über die ganze Länge des Gels mobilisiert werden können. Der entscheidende Punkt ist aber, dass nach einer gewissen Zeit – in diesem Fall nach 15 Minuten – das Signal wieder auf den anfänglichen Level zurückkehrt, welcher allein auf den Elutionsmittel- und Gerätebedingeten Untergrund zurück zu führen ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine so durchgeführte elektrophoretische Reinigung erfolgreich zur Eliminierung von Verunreinigungen im Gel selbst eingesetzt werden kann. Verbindungen, welche sich durch ein solches Verfahren nicht aus dem Gel mobilisieren lassen, sollten auch bei einer späteren Analyse nicht aus dem Gel heraus migrieren und so zu einer negativen Beeinflussung des Analyseergebnisses beitragen.

Ein Einwand dagegen kann natürlich sein, dass durch Komponenten in der aufgetragenen Probe eine zusätzliche Mobilisierung von Verunreinigungen

---

<sup>89</sup> Gel: 60x3 mm, 2% AG; Elektrolyt: TBE 0,05 M, pH=8; Injektion: 0 µL; U=150V

aus dem Gel, beispielsweise durch Komplexbildung, stattfinden kann. Für alle Bestandteile der Probe, welche zusätzlich hinzu gegeben werden (siehe II.4.6 Herstellung der Proben), kann dies entkräftet werden dadurch, dass systematische Blindwertmessungen durchgeführt wurden und in diesen solche Effekte mit eingehen müssen. Für unbekannte Bestandteile der Probe kann ein solcher Effekt nicht ausgeschlossen werden, sollte sich aber in der zeitlichen Abhängigkeit bei der Verwendung eines Gels widerspiegeln. Ein solcher Effekt konnte nicht beobachtet werden.

Das in Abbildung 17 anhand des Elements Phosphor dargestellte Elutionsprofil ließ sich für fast alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Elemente finden. Um einen Eindruck über die Mengen solcher Verunreinigungen zu bekommen, wurde eine semi-quantitative Auswertung dieses plateau-förmigen Elutionsprofils für verschiedene Elemente durchgeführt. Hierzu wurde ein Vergleich zwischen den Signalintensitäten auf der Höhe des Plateaus mit denen von zur Systemoptimierung verwendeten Standardlösungen vorgenommen. Da diese Standardlösungen hinsichtlich Zusammensetzung und Flussraten dem jeweiligen Elutionsmittel angepasst waren, scheint ein solches Vorgehen für semi-quantitative Zwecke vertretbar. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst, wobei zu beachten ist, dass nur anionische Verunreinigungen mit ins Kalkül genommen werden konnten. In diesem Zusammenhang erscheint es erstaunlich, dass überhaupt Metalle wie Kupfer zu detektieren waren, da diese in kationischer Form zu erwarten wären. Doch durch Bestandteile der Elektrolyte kann es zu Komplexierungsreaktionen kommen, welche offensichtlich zu anionischen Metallspezies führen. Der Gesamtgehalt der Verunreinigungen für die Metalle dürfte daher noch um einiges höher liegen. Die Angabe der Menge der jeweiligen Verunreinigung ist als Masse der Verunreinigung pro Masse des verwendeten Gelmaterials zu verstehen.

Tabelle 4: Verunreinigungen im Gelmaterial

Element	c [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]
Magnesium (Mg)	0,46
Phosphor (P)	0,15
Schwefel (S)	0,23
Calcium (Ca)	0,14
Chrom (Cr)	0,02
Eisen (Fe)	0,08
Kupfer (Cu)	0,06
Zink (Zn)	0,03
Brom (Br)	0,09
Iod	0,04
Platin	-*
Uran	-*

\* nicht nachweisbar

Wie dieser Aufstellung zu entnehmen ist, kann das Gelmaterial aus elementanalytischer Sicht als durchaus kontaminiert bezeichnet werden. Dieses hängt sicherlich damit zusammen, dass es sich bei der Agarose letztendlich um ein Naturprodukt handelt und die Aufreinigung unter anderen Kriterien als der Reinheit bezüglich elementarer Verunreinigungen erfolgte. Doch kann hierdurch auch gezeigt werden, dass es mit der entwickelten Methode möglich ist, das Gel vor der Analyse effektiv zu reinigen.

#### II.4.6 Herstellung der Proben

Ein generelles Vorgehen für die Aufbereitung einer Probe für die GE-ICP-MS, was für alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben gilt, betrifft die Präparation für die Injektion in das System und soll hier beschrieben werden. Individuelle Verdünnungsschritte oder andere Maßnahmen spezielle Proben betreffend werden in den entsprechenden Abschnitten behandelt.

Die zu analysierende Probe wird direkt auf das Gel aufgetragen, ähnlich der klassischen Platten-GE, wo die Probe in kleine Taschen in dem Gel eingefüllt wird. In beiden Fällen muss die Dichte der Probe daher künstlich



erhöht werden, um zu gewährleisten, dass diese sich nicht mit dem umgebenden Elektrolyten vermischt. Dieses wird durch den Zusatz von Saccharose oder Glycerin erreicht. Aus praktischen Erwägungen wurde in dieser Arbeit Glycerin verwandt, da dieses einerseits in einer höheren Reinheitsstufe zur Verfügung stand und andererseits als wässrige Lösung gerade in kleinerem Maßstab besser zu dosieren war als die kristalline Saccharose. Um mittels des Glycerins den beabsichtigten Effekt zu erreichen, ist ein Gehalt von Glycerin in der Probe von 15-20 % als optimal erachtet worden.

Weiterhin wurde der Probe der Elektrolyt zugesetzt, welcher sich auch in dem zur Trennung vorgesehenen GE-System befand, um die Verhältnisse in der Probe denen in der GE anzupassen. Hierdurch sollte verhindert werden, dass durch Konzentrations- bzw. pH-Gradienten zwischen Probe und Umgebung zusätzliche Effekte auftreten, welche die Trennung negativ beeinflussen könnten. Durch Zugabe der entsprechenden Menge 10-fach konzentrierter Elektrolytlösung zu der Probe wurde dieser Ausgleich geschaffen.

### **II.4.7 Injektion der Proben**

Das reproduzierbar genaue Injizieren der Probe in das System stellt gerade bei kurzen Gelen ein praktisches Problem dar. Da die Injektion direkt über der Geloberfläche erfolgen muss, um Vermischungen mit dem Elektrolyten zu vermeiden, musste eine Möglichkeit gefunden werden, wie die Strecke zwischen dem oberen Elektrodenraum und der Geloberfläche überbrückt werden konnte. Hierfür wurde eine lange Injektionskanüle (Maße 100 x 0,5 mm) mittels einer Eigenkonstruktion mit einer Pipette (1- 10 µL) verbunden, wodurch es möglich war, kleinste Probenmengen auf das Gel aufzutragen.

## II.5 Charakterisierung des Systems

### II.5.1 Einführung

Da es sich bei der hier beschriebenen GE-ICP-MS-Kopplung um eine vollständige Neuentwicklung handelt, wurden zunächst rein systematische Untersuchungen zu bestimmten analytischen Eigenschaften des Systems durchgeführt. Wie sich später noch zeigen wird, wurde hierbei teilweise wissenschaftliches Neuland betreten, da die Nutzung eines element-spezifischen Detektors für die GE neue Einblicke in die Trenneigenschaften derselben erlaubt.

Ein großes Problem gerade bei der systematischen Untersuchung der quantitativen Eigenschaften des entwickelten Systems muss hier zunächst zur Erläuterung genannt sein. Wie im zweiten Hauptteil der Arbeit noch ausführlich beschrieben werden wird, ist es ausgesprochen problematisch, quantitativ definierte Standards von Biopolymeren wie DNA oder Proteinen zu erhalten. Idealerweise sollten aber genau diese zur Charakterisierung eines Systems wie dem entwickeltem herangezogen werden. Aufgrund dieses Mangels an adäquaten Standards wurden einige notwendigen Untersuchungen mit anderen Analyten wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP), durchgeführt. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Analyten waren teilweise zusätzliche Experimente notwendig, um eine gewisse Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

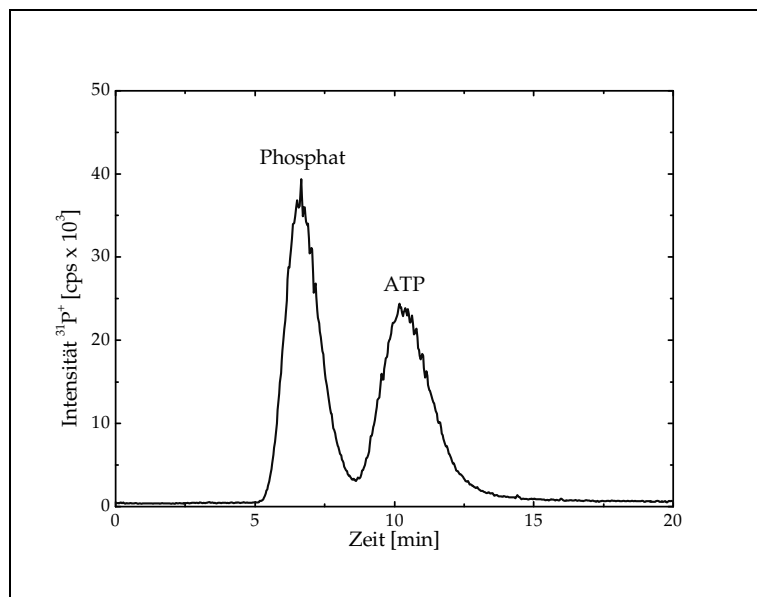
Eine weitere Einschränkung betrifft die Optimierungsmaßnahmen für ein bestimmtes Analytensystem. In diesem Teil der Arbeit wurden solche systematischen Untersuchungen nur für die Trennung und Analyse von DNA-Fragmenten durchgeführt. Ohne weiteres sind diese optimierten Bedingungen natürlich nicht auf andere Analytensysteme zu übertragen, wie an dem Beispiel der Cisplatin-DNA-Addukte im dritten Hauptteil dieser Arbeit unschwer zu erkennen ist. Die systematischen Untersuchungen, die Trennung betreffend, sind daher exemplarisch zu verstehen und müssten für jedes Analytensystem in unterschiedlichem Maße neu durchgeführt werden.

### II.5.2 Elutionsprofil

Eine erste Voraussetzung für eine erfolgreiche Online-Kopplung zwischen einer Separationsmethode und der ICP-MS als Detektor ist, dass die Migration der Analyten in Form von transienten Signalen erfasst werden kann. In der Form der Signale sollte sich das Migrationsverhalten der

Analyten möglichst unverfälscht widerspiegeln. In der Praxis spielen aber natürlich auch Effekte, welche nach der Trennung eingreifen, wie beispielsweise das Ausspülverhalten in der Sprühkammer, eine Rolle.

In den folgenden Abbildungen sind die Elutionsprofile für verschiedene Substanzen dargestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit als Untersuchungsgegenstand dienten. Abbildung 18 zeigt die elektrophoretische Trennung von Phosphat und Adenosin triphosphat (ATP).



**Abbildung 18: Elutionsprofil von Phosphat (0,1 µg g<sup>-1</sup>) und ATP (0,25 µg g<sup>-1</sup>)<sup>90</sup>**

Die Auswahl dieser beiden Verbindungen als Testsubstanzen erfolgte nicht willkürlich, sondern geschah bereits im Hinblick auf die Analyse von DNA-Fragmenten über die Detektion des Elements Phosphor. Bereits an diesem ersten Beispiel zeigen sich zwei sehr interessante Eigenschaften der GE-ICP-MS-Kopplung. Zum einen ist es möglich, transiente Signale für die im Gel migrierenden Analyten zu erhalten, was für die prinzipielle Funktionstüchtigkeit der entwickelten Kopplung spricht. Zum anderen erlaubt der Versuchsaufbau, im speziellen die Elutionsregion, die Analyse von Molekülen, welche wesentlich kleiner sind als die Ausschlussgrenze der Dialysemembran. Diese hindert, wie bereits beschrieben, Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 3 kDa daran, weiter in die Richtung der Anode zu wandern. Sowohl ATP (MW = 507 Da) als auch natürlich Phosphat

<sup>90</sup> Gel: 60x3 mm, 2% AG; Elektrolyt: TBE 0,05 M, pH=8; Injektion: 5 µL; U=200V

(MW = 95 Da) sollten die Dialysemembran ungehindert passieren können und damit für eine Detektion mit dem ICP-MS nicht mehr zur Verfügung stehen. Zu einem gewissen Teil ist dies jedoch nicht der Fall.

Diese Tatsache wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch genauer beleuchtet werden müssen und lässt sich anhand anderer Beispiele belegen. So ist in Abbildung 19 das Elutionsprofil von Bromphenolblau (BPB) gezeigt, welches in der klassischen Elektrophorese als Farbstoff zur visuellen Erkennung des Migrationsverlaufs standardmäßig einer Probe zugesetzt wird. Da dies auch in den ersten Experimenten mit der GE-ICP-MS-Kopplung so geschah, konnte das Migrationsverhalten von BPB anhand des darin enthaltenen Broms detektiert werden. Auch diese Substanz mit einem MW von 692 Da sollte durch die Dialysemembran hindurch migrieren.

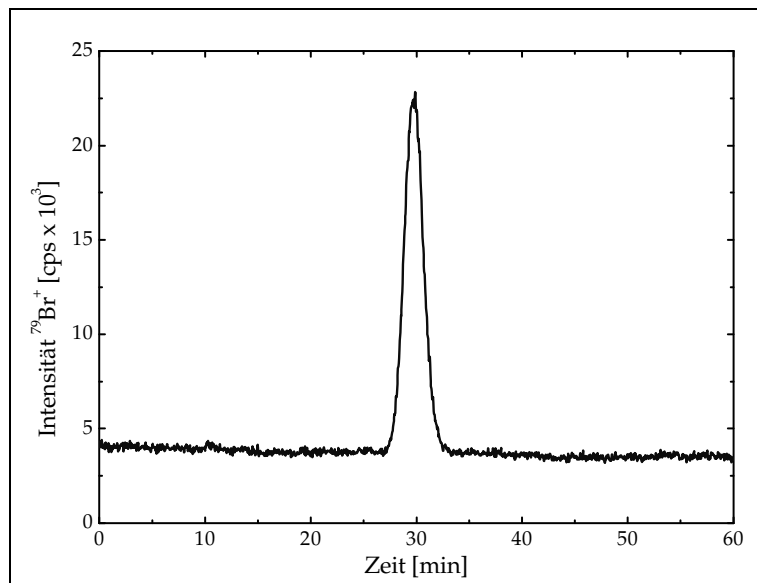
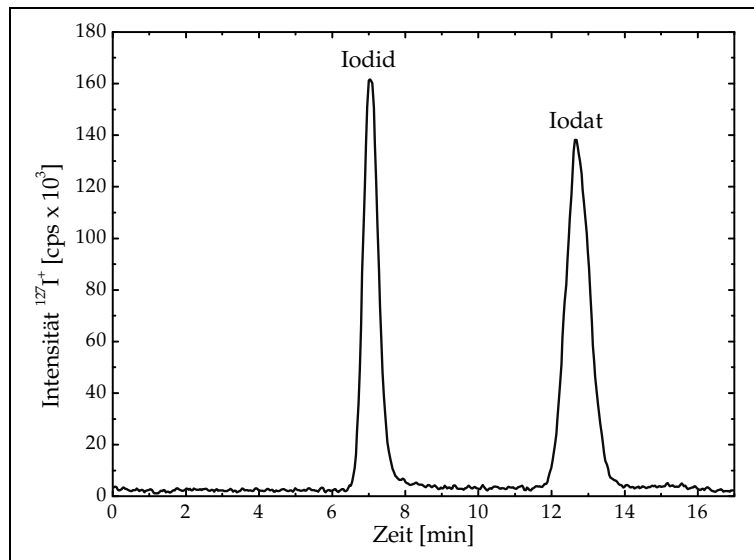


Abbildung 19: Elutionsprofil von Bromphenolblau (100 µg g<sup>-1</sup>)<sup>91</sup>

Als letztes Beispiel in diesem Zusammenhang soll das System Iodid/Iodat dienen, dessen Analyse mittels der GE-ICP-MS in Abbildung 20 dargestellt ist. Nicht nur vor dem Hintergrund, dass die beiden niedermolekularen Verbindungen überhaupt zu sehen sind, zeigt sich dieses Elektropherogramm als sehr interessant, sondern auch deswegen, da Iodid und Iodat so deutlich voneinander zu trennen sind. Eine Trennung aufgrund der Molekülgröße kann hier nicht ausschlaggebend sein, da die Porengröße des

<sup>91</sup> Gel: 60x3 mm, 2,2% AG; Elektrolyt: TBE 0,05 M, pH=8; Injektion: 5 µL; U=150V

Gels um ein Vielfaches größer ist als die Iodverbindungen selbst. Der hier zugrunde liegende Trennmechanismus sollte der gleiche sein, welcher für das Migrationsverhalten der bislang beschriebenen Verbindungen verantwortlich ist, da diese ebenfalls wesentlich kleiner sind als die Porengröße des jeweils verwendeten Gels. Eine Wechselwirkung mit dem Gel hinsichtlich Größentrennung erscheint auf jeden Fall sehr unwahrscheinlich. Daher muss das unterschiedliche Migrationsverhalten mit den unterschiedlichen hydrodynamischen Radien und effektiven Ladungen der einzelnen Verbindungen zusammenhängen, da diese Größen direkt die elektrophoretische Mobilität beeinflussen (vgl. VII.1). Das Gel spielt hier nur eine sehr untergeordnete Rolle, so dass das Migrationsverhalten der Teilchen dem in trägerfreier Lösung annähernd entsprechen sollte.



**Abbildung 20: Elutionsprofil von Iodid und Iodat (jeweils 100 ng g<sup>-1</sup>)<sup>92</sup>**

Um nun, auch zum Vergleich, das Elutionsprofil einer makromolekularen Substanz zu beobachten, wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge untersucht. In Abbildung 21 ist die Elution von zwei DNA-Fragmenten mit 100 Basenpaaren (bp) und 200 bp Länge zu sehen. Zunächst muss sicherlich festgehalten werden, dass mit dieser Abbildung die prinzipielle Funktionstüchtigkeit der entwickelten GE-ICP-MS-Kopplung zur Analyse von DNA-Fragmenten demonstriert werden kann. Im Laufe dieser Arbeit werden noch zahlreiche weitere Beispiele und systematische

<sup>92</sup> Gel: 45x2,2 mm, 2,0% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 5 µL; U=250V

Untersuchungen folgen, doch darf dies hier bereits festgehalten werden. Im Unterschied zu den bisherigen Beispielen handelt es sich hier um eine ganz klassische gelelektrophoretische Trennleistung, soll heißen, dass die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die Größe der Moleküle liegt genau im dem Größenbereich der Poren des Gels und durch die unterschiedliche Wechselwirkung der beiden DNA-Fragmente kommt es zu einer Trennung.

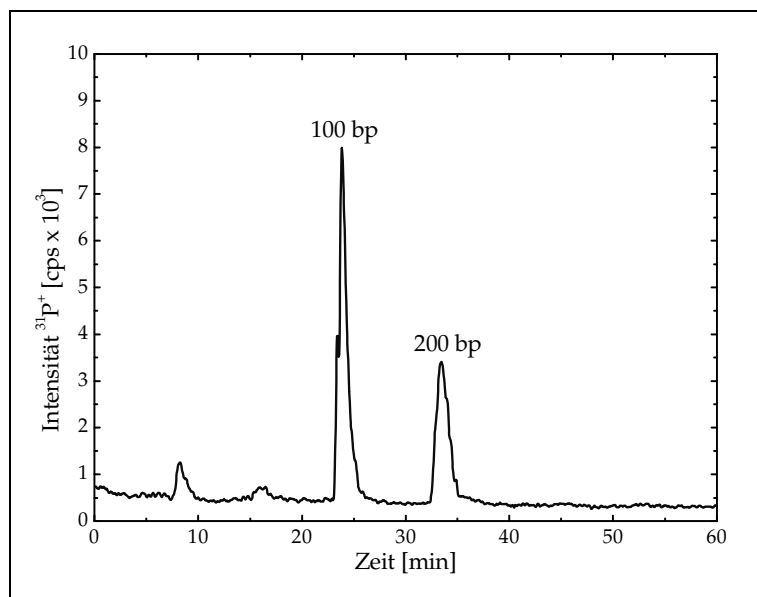


Abbildung 21: Elutionsprofil von DNA-Fragmenten<sup>93</sup>

Als ein Maß für die Güte einer chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung kann die Peaksymmetrie angesehen werden. Da sich diese hervorragend eignet, um dem Elutionsprofil einen quantitativen Aspekt zu verleihen, soll diese für die gegebenen Beispiele bestimmt werden.

---

<sup>93</sup> Gel: 40x2,2 mm, 3,0% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2  $\mu\text{L}$ ; U=200V

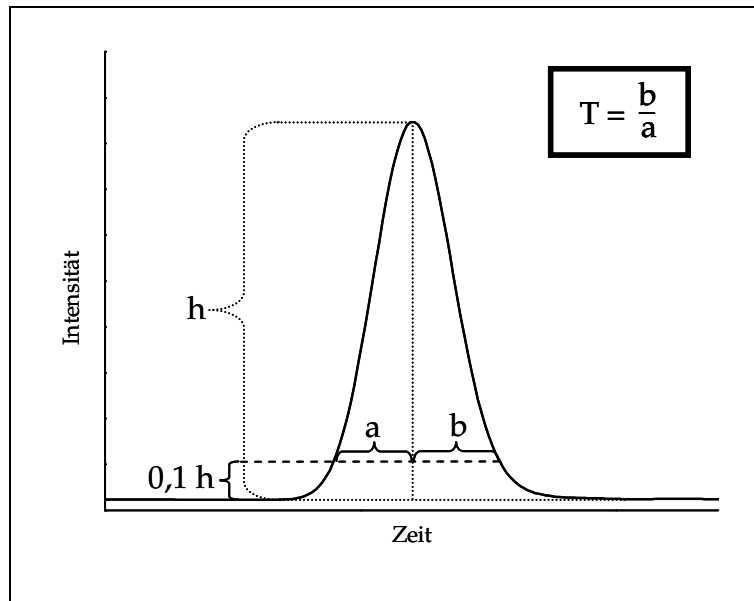


Abbildung 22: Berechnung der Peaksymmetrie T

Für die Berechnung der Peaksymmetrie T wurde vorgegangen wie in Abbildung 22 dargestellt. Eine ideale Symmetrie würde demnach einem T-Wert von 1 entsprechen. Ein solches ideales Verhalten ist in der Realität aber nur sehr selten zu beobachten. Vielmehr nehmen die Werte für T meist einen Wert von  $>1$  ein, das heißt, der Anstieg der Signalintensität geht schneller vonstatten als ihr Abklang, und in einem solchen Fall spricht man von Peak-Tailing. Seltener zu beobachten ist das Peak-Fronting, wo der Anstieg langsamer passiert als der Abklang der Intensität. Die Ursachen für solche Abweichungen vom idealen Verhalten können vielfältig sein und sollen hier nur im konkreten Zusammenhang diskutiert werden.

Tabelle 5: Peaksymmetrie T für verschiedene Substanzen

Analyt	T
Phosphat	1,35
Adenosintriphosphat	1,27
Bromphenolblau	1,11
Iodid	1,16
Iodat	1,10
DNA 100 bp	1,54
DNA 200 bp	1,61

In Tabelle 5 sind die berechneten T-Werte exemplarisch für die untersuchten Testsubstanzen aufgeführt. Auch wenn diese Zusammenstellung auf den ersten Blick für die Charakterisierung eines gelelektrophoretischen Systems ungewöhnlich anmutet, so lassen sich daraus doch sehr interessante Aussagen über das Funktionieren der GE-ICP-MS-Kopplung ziehen.

Zunächst muss festgestellt werden, dass für alle Analyten ein T-Wert zwischen 1 und 2 bestimmt werden kann. Damit kann auf jeden Fall die Aussage getroffen werden, dass mittels der GE-ICP-MS transiente Signale ,vergleichbar mit denen einer HPLC-ICP-MS-Kopplung, erhalten werden können, was als eine Grundvoraussetzung für ein Gelingen erfolgreicher Analysen mittels dieses Systems angesehen werden kann.

Der Wert von  $>1$  in allen Fällen bedeutet, dass es zu einem systematischen Peak-Tailing kommt, aber in unterschiedlichem Maße. Zunächst sollen die Ursachen für dieses systematische Peak-Tailing diskutiert werden. Prozesse, welche diese Art des Peak-Tailings verursachen, können in verschiedenen Bereichen des GE-ICP-MS-Systems ablaufen. So kann der Transport der Analyten in das Plasma immer als ein kritischer Punkt in dieser Hinsicht betrachtet werden. Hierbei kommt der Zerstäubung und dem Ausspülverhalten in der Sprühkammer eine besondere Bedeutung zu. Durch Anhaften der Analyten an der Glaswand der Sprühkammer kommt es zu einem verzögerten Eintrag in das Plasma, was sich in einem leichten Peak-Tailing manifestieren kann. In gleichem Maße wirken natürlich Adhäsionsprozesse im Allgemeinen, ob sie nun in der Sprühkammer, im Zerstäuber oder in den Transportverbindungen stattfinden, und da diese nur sehr schwer vollständig zu vermeiden sind, ist auch ein gewisses Peak-Tailing nicht zu vermeiden.

Doch sind diese allgemeinen Ursachen für ein unsymmetrisches Elutionsprofil meist zu vernachlässigen, im Gegensatz zu den Vorgängen während des Trennprozesses in dem Gel. Vor dem Hintergrund dieser Unterscheidung kommt den Werten in Tabelle 5 eine besondere Bedeutung zu. Es ist sehr auffällig, dass für alle Substanzen, welche nach der Theorie keine Retardation durch das Gel aufgrund der Molekül- bzw. Porengröße erfahren dürften, wesentlich niedrigere T-Werte ermittelt wurden, als für die DNA-Fragmente, bei welchen das Migrationsverhalten definitiv durch die Wechselwirkung mit dem Gel beeinflusst wird. Der Schluss liegt nahe, dass das Peak-Tailing, welches bei der Elektrophorese der kleineren Moleküle, also all jenen außer den DNA-Fragmenten zu beobachten ist auf systemimmanente Ursachen zurückgeführt werden kann. Hierbei soll das gesamte System, inklusive des Gels, verstanden werden, da in diesem, genau wie in



den anderen Bereichen, eine Adhäsion der Analyten an der Geloberfläche stattfinden kann. Eine genaue Differenzierung zwischen den einzelnen Bereichen hinsichtlich ihres Anteils an dieser Peak-Verformung ist aber nur schwer möglich. Deutlich ist jedoch, dass bei den DNA-Fragmenten zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Gel stattfinden, was ja für eine Trennung unerlässlich und unter den gewählten Bedingungen auch zu erwarten ist.

Für die Analyten Phosphat und ATP ist noch ein weiterer Aspekt zu berücksichtigen, der gerade bei elektrophoretischen Trennungen eine Rolle spielt. Da die Migrationsgeschwindigkeit der Analyten unter anderem von der Ionenladung abhängt, sind Dissoziationsvorgänge mit in die Kalkulation einzubeziehen. Dieses gilt in besonderem Maße für schwache Säuren und Basen, wie Phosphat und ATP. Sind die Trennbedingungen, explizit der pH-Wert, nicht so gewählt, dass nur eine Dissoziationsstufe während der Trennung vorliegt, so kann es zu einem mehr oder minder starken Peak-Tailing kommen. Begründen lässt sich dies dadurch, dass während der Trennung immer wieder die Gleichgewichte neu eingestellt werden, was in veränderten Migrationsgeschwindigkeiten resultiert. Ein solcher Effekt kann die Ursache sein für die unterschiedlichen T-Werte von Phosphat und ATP im Vergleich zu denen von Iodid und Iodat.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Abweichungen der T-Werte vom Idealwert 1 um bis zu 0,2 als spezifisch für das GE-ICP-MS-System betrachtet werden können. Alles, was darüber hinausgeht, muss auf zusätzliche Wechselwirkungen der Analyten mit dem Gel oder dem Elektrolyten zurückgeführt werden. Die Minimierung dieser Effekte kann daher Bestandteil von Optimierungsmaßnahmen bei der Wahl der entsprechenden Trennbedingungen sein.

In diesem Zusammenhang und im Rückgriff auf die Gründe für das unterschiedliche Migrationsverhalten von Iodid und Iodat erscheinen die Werte in Tabelle 6 sehr interessant. Hier ist die Abhängigkeit der Migrationszeiten und der T-Werte für Iodid und Iodat von der Gel-Konzentration angegeben.

Tabelle 6: Abhängigkeit der Migrationszeit und der Peaksymmetrie von der Konzentration des Gels an dem Beispiel Iodid/Iodat

Konzentration Gel [%]	Migrationszeit [min]		T	
	Iodid	Iodat	Iodid	Iodat
1	7,2±0,3	13,0±0,3	1,19	1,13
2	7,1±0,2	12,8±0,4	1,16	1,10
3	7,3±0,3	13,2±0,5	1,20	1,15

Die Werte demonstrieren, dass keine signifikanten systematischen Veränderungen der Migrationszeit bzw. des T-Wertes bei der Variation der Gelkonzentration festgestellt werden können, woraus sich schließen lässt, dass das Migrationsverhalten von kleinen Molekülen, wie Iodid und Iodat, in der Gelelektrophorese tatsächlich vergleichbar ist mit dem in freier Lösung.

### II.5.3 Effizienz der Trennleistung

Zur Beschreibung des entwickelten Systems ist es natürlich unerlässlich die Güte der möglichen Trennleistung zu charakterisieren. Zunächst steht die Trennleistung immer in Abhängigkeit zu den speziellen Analyten, welche gerade untersucht werden sollen. Wie bereits beschrieben, lassen sich mit der GE Analyten unterschiedlichster chemischer Natur voneinander trennen mit aber teils sehr unterschiedlichen Effizienzen. Weiterhin bietet sie GE zahlreiche Variationsmöglichkeiten, was die Art der Trennung betrifft und selbst innerhalb einer GE-Variation können sehr viele Parameter verändert werden. Um diese Eigenschaften der GE gebührend in die Charakterisierung des Systems einzubeziehen, wurden die Untersuchungen die Trennleistung betreffend auf eine möglichst breite, experimentelle Basis gestellt.

Hier soll exemplarisch anhand eines definierten Analytensystems die Trennleistung des entwickelten Systems demonstriert werden. Um zu einer optimierten Trennleistung zu gelangen, wurden verschiedene Parameter in dem GE-System variiert, um die unterschiedlichen Einflussfaktoren aufzuzeigen. Konkret wurden folgende Parameter variiert:

- Länge des Gels
- Innendurchmesser des Gels
- Art der Agarose
- Konzentration des Gels
- Spannung
- Zusammensetzung des Elektrolyten
- pH-Wert des Elektrolyten
- Konzentration des Elektrolyten

Natürlich wurden bei der Variation eines Parameters die anderen möglichst konstant gehalten, um den spezifischen Einfluss desselben auf die Trennleistung möglichst eindeutig identifizieren zu können.

Als quantitatives Maß für die Güte der Trennung soll hier die Auflösung R herangezogen werden. Dieses hat den Vorteil, dass mittels der Auflösung R Werte ermittelt werden können, welche untereinander zu vergleichen sind und eine Aussage über die Trennung zweier benachbarter Fraktionen zulassen. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von R als Kriterium ist, dass zu dessen Bestimmung die Brutto-Migrationszeiten herangezogen werden können, da die Bestimmung von Netto-Migrationszeiten aufgrund der notwendigen Einrechnung einer Totzeit problematisch ist. Diese Problematik liegt in der Tatsache begründet, dass in der Elektrophorese, anders als in der Chromatographie, keine Substanz *per se* ohne Wechselwirkung mit dem elektrophoretischen System durch dieses hindurch wandern kann und daher eine einheitliche Totzeit nicht festgestellt werden kann.

Die Berechnung von R erfolgt mit der Formel 2.

### Formel 2: Elektrophoretische Auflösung R

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}$$

R : Elektrophoretische Auflösung  
 $t_R$  : Migrationszeit  
 $w_h$  : Halbwertsbreite

Das Analytensystem, welches für diese Untersuchungen genutzt wurde, enthielt fünf DNA-Fragmente zwischen 100 und 1000 Basenpaaren in äquimolaren Mengen. Zur Veranschaulichung, wie eine optimierte Trennung dieses DNA-Standards mit dem entwickelten System aussehen kann, ist eine solche in Abbildung 23 dargestellt. Dieser DNA-Standard wird uns im Laufe dieser Arbeit noch öfters begegnen, jedoch mit unterschiedlichen Fragestellungen im Hintergrund.

Hier sollte damit zunächst untersucht werden, in welcher Weise die verschiedenen veränderbaren Parameter der GE auf eine Trennung Einfluss nehmen können. Zu diesem Zweck wurden unter den jeweils in einem Parameter geänderten Bedingungen Trennungen der fünf DNA-Fragmente durchgeführt und jeweils die R-Werte bestimmt. Da im Idealfall fünf Fraktionen zu erwarten sind, können für jede Trennung vier R-Werte erhalten werden.  $R_1$  entspricht hier der Auflösung der 100bp/200bp-Fraktionen voneinander,  $R_2$  der 200bp/500bp-Fraktionen usw.  $R'$  als Mittelwert aus  $R_1$ - $R_4$  wurde mit eingeführt, um der gesamten Trennleistung ein quantitatives Maß zu geben. Konnte aufgrund zu schlechter Auflösung keine Halbwertsbreite mehr bestimmt werden, so ist in den folgenden Tabellen kein R-Wert angegeben.

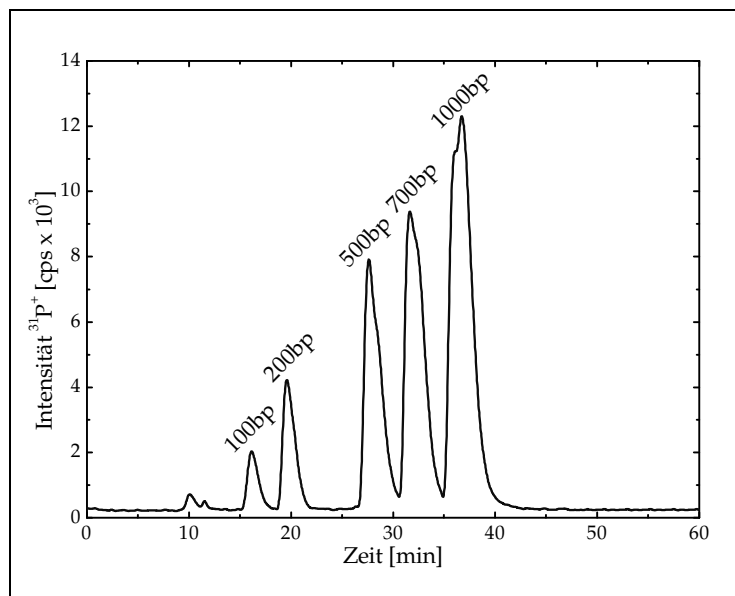


Abbildung 23: Trennung verschiedener DNA-Fragmente unter optimierten Bedingungen<sup>94</sup>

Tabelle 7: R-Werte für eine optimierte Trennung<sup>94</sup>

Parameter	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
optimiert	1,65	3,29	1,35	1,36	1,91

Zur Veranschaulichung sind in Tabelle 7 die vier R-Werte für die optimierte Trennung des DNA-Standards, welche in Abbildung 23 dargestellt ist, angegeben. Es sei vorweg genommen, dass diese teils niedriger liegen als jene, welche mit den im Folgenden beschriebenen Parameteränderungen erhalten wurden. Dies hängt damit zusammen, dass hier zunächst nur die Trennleistung der GE optimiert wurde und nicht noch andere Eigenschaften der GE-ICP-MS, wie zum Beispiel die Empfindlichkeit. So kann diese abhängig sein von der Wahl des geeigneten Elutionsmittels, da dieses das Verhalten der Analyten im Detektor beeinflussen kann.

Der Tabelle 8 ist zu entnehmen, in welcher Weise die Länge des Gels einen Einfluss auf die Trennleistung hat. Wie zu erwarten steigt die Trennleistung mit zunehmender Gellänge an. Jedoch ist diese Verbesserung der Trennleistung durch diesen Parameter nicht beliebig zu erhöhen. Ab einer gewissen Länge (34 mm) stagniert diese und die Auflösung bleibt konstant. Was jedoch zunimmt, ist die Gesamtdauer der Analyse, da die Analyten bei fester Geschwindigkeit eine längere Strecke zurücklegen müssen. Darin liegt letztendlich auch die Begründung für das Stagnieren der Trennleistung. Je länger die Analyten durch das Gel wandern müssen, umso stärker kommen Diffusionseffekte zum Tragen, welche die Trennleistung verschlechtern.

Tabelle 8: Abhängigkeit der Auflösung R von der Länge des Gels (L)<sup>95</sup>

L [mm]	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
30	1,45	2,92	1,13	0,82	1,58
32	1,56	3,29	1,48	1,06	1,85
34	1,68	3,42	1,49	1,37	1,98
<b>36</b>	<b>1,69</b>	<b>3,48</b>	<b>1,51</b>	<b>1,38</b>	<b>2,00</b>
40	1,65	3,48	1,48	1,37	1,99

<sup>94</sup> Gel: 36x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

<sup>95</sup> Gel: Variabelx2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

Eine Verlängerung der Trennstrecke kann daher nur bis zu einem gewissen Punkt zur Verbesserung der Trennleistung beitragen. Nichtsdestotrotz kann bereits hier gesagt werden - gerade wenn man sich die Unterschiede in der Trennleistung zwischen 30 und 34 mm anschaut -, dass die Gellänge einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Trennung ausübt.

In Tabelle 9 sind die R-Werte für die entsprechende Änderung des Gel-Innendurchmessers angegeben. Es fällt auf den ersten Blick auf, dass unter den gegebenen Bedingungen ein Innendurchmesser von 1,2 mm nicht mehr ausreicht, um die größeren DNA-Fragmente effektiv zu trennen. Dies verwundert eigentlich, da mit kleiner werdendem Innendurchmesser die Trennleistung aufgrund eingeschränkter Querdiffusion eigentlich besser werden sollte, was für die Unterscheidung zwischen 3,0 und 2,2 mm ID ja auch der Fall ist. Hier muss jedoch beachtet werden, dass in allen drei Fällen das Injektionsvolumen konstant gehalten wurde und der Dispersionseffekt durch das Eigenvolumen der Probe umso größer wird, je kleiner der Innendurchmesser des Gels ist. Die Trennleistung könnte zwar durch einen verkleinerten Innendurchmesser verbessert werden bis hin zur Kaillargelelektrophorese (CGE), doch hat die so erzielte bessere Auflösung eine starke Erniedrigung der relativen Nachweisgrenzen zur Folge. Dieses Problem wurde bereits ausführlich beschrieben.

**Tabelle 9: Abhängigkeit der Auflösung R von dem Innendurchmesser des Gels (ID)<sup>96</sup>**

ID [mm]	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
1,2	1,02	2,49	-	-	-
<b>2,2</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>
3,0	1,56	3,28	1,24	1,03	1,77

Es kann jedoch verdeutlicht werden, dass der Innendurchmesser des Gels ebenfalls einen entscheidenden Anteil an der Trennleistung besitzt.

Nachdem nun die Dimensionen als veränderbare Parameter untersucht wurden, wenden wir uns nun der Beschaffenheit des Gels zu. Wie bereits erwähnt, wurde nur Agarose als Gelmaterial verwendet, doch gibt es auch innerhalb der Agarosen eine Abstufung hinsichtlich der Trennleistung für bestimmte Applikationen, was mit den Werten in Tabelle 10 belegt werden kann.

---

<sup>96</sup> Gel: 34xVariabel mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

**Tabelle 10: Abhängigkeit der Auflösung R von der Agarose<sup>97</sup>**

<b>Agarose</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R'</b>
Seakam LE	1,12	2,46	-	-	-
Nusieve	1,23	2,68	-	-	-
<b>Metaphor</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>

Es wurden drei verschiedenen Agarosen zur Untersuchung herangezogen, wobei zwei davon – Nusieve und Metaphor - speziell für die Trennung von kleineren DNA-Fragmenten geeignet sein sollen. Der Unterschied zwischen diesen dreien liegt vor allem in dem Grad der Reinheit und dem der damit zusammenhängenden Elektroendosmose. Agarosen mit einem niedrigeren Reinheitsgrad zeigen durch die Anwesenheit von geladenen Seitengruppen ein höheres Maß an Elektroendosmose, welche das spezifische Laufverhalten negativ geladenen Analyten hemmt. Es ist daher nicht erstaunlich, dass bei der Verwendung der SeakamLE nur ein sehr schlechtes Trennergebnis erzielt werden kann. Die Nusieve sollte besser für die Trennung von kleineren DNA-Fragmenten geeignet sein, bewirkt aber unter den gegebenen Umständen keine effektive Trennung der größeren DNA-Fragmente. Nur mit der Metaphor kann eine entsprechende Separationsleistung erzielt werden. Die Wahl der passenden Agarose stellt also einen wichtigen Punkt bei der Optimierung einer Trennung dar.

Als entscheidender Punkt bezüglich der Beschaffenheit des Gels bei der gezielten Trennung spezieller Analyten kann aber sicherlich die Konzentration des Gels angesehen werden, da hiermit letztendlich die Porengröße und damit der Einfluss des Siebeffekts bestimmt wird. In Tabelle 11 ist die Abhängigkeit der Auflösung von der Konzentration des Gels zu sehen. Von der in verschiedenen Protokollen zu findenden Idealkonzentration für diesen Größenbereich der DNA-Fragmente von 1,8% wurde die Konzentration in beide Richtungen variiert. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass niedrigere Konzentrationen nicht mehr ausreichen, um die größeren DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Bei Erhöhung der Konzentration bis hin zu 2,2% kann hingegen eine leichte Verbesserung der Auflösung erreicht werden. Erklären lässt sich dies mit der stärkeren Wechselwirkung der Analyten mit dem Gel aufgrund der kleineren Porengröße.

---

<sup>97</sup> Gel: 34x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

Tabelle 11: Abhängigkeit der Auflösung R von der Konzentration des Gels ( $c_G$ )<sup>98</sup>

$c_G$ [%]	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R'$
1,5	1,59	3,22	1,03	-	-
1,8	1,68	3,42	1,49	1,37	1,98
2,0	1,71	3,52	1,56	1,40	2,05
<b>2,2</b>	<b>1,74</b>	<b>3,59</b>	<b>1,63</b>	<b>1,49</b>	<b>2,11</b>

In diesem Zusammenhang ist es vielleicht interessant, dass eine Erhöhung der T-Werte trotz verbesserter Auflösung ebenfalls zu beobachten ist, d.h. die Peaks zeigen ein stärkeres Tailing. Es muss jedoch auch festgestellt werden, dass durch die Erhöhung der Konzentration die Gesamtdauer des elektrophoretischen Laufs deutlich verlängert wird. Daher reicht eine Gel-Konzentration von 1,8% für die effektive Trennung der gewählten DNA-Fragmente vollkommen aus.

Eine ebensolche Überlegung trifft auch auf den nächsten Parameter zu, welcher gezielt verändert werden kann. Die bei der GE angelegte Spannung bewirkt die Migration der Analyten und ist daher maßgeblich für eine effektive Trennung verantwortlich. Der Einfluss der Spannung auf Trennleistung ist in Tabelle 12 dargestellt. Zweierlei lässt sich wieder feststellen. Zum einen bewirkt eine Erhöhung der Spannung über 200 V hinaus eine Verschlechterung der Auflösung, zum anderen kann im Gegenzug durch eine Erniedrigung der Spannung keine beliebig gute Trennleistung erreicht werden.

Tabelle 12: Abhängigkeit der Auflösung R von der angelegten Spannung (U)<sup>99</sup>

U [V]	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R'$
100	1,69	3,40	1,49	1,39	1,99
<b>200</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>
300	1,55	3,11	1,26	1,25	1,80

Hier spielen sicherlich wieder Diffusionseffekte eine Rolle, wie sie auch schon bei dem Einfluss der Gellänge genannt wurden. Soll die Gesamtdauer

<sup>98</sup> Gel: 34x2,2 mm, Variabel% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2  $\mu$ L; U=200V

<sup>99</sup> Gel: 34x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2  $\mu$ L; U=Variabel



der Analyse im Auge behalten werden, so muss letztendlich immer jene Spannung gesucht werden, bei der gerade noch keine Verschlechterung der Trennleistung zu beobachten ist.

Nachdem nun die Eigenschaften des Gels sowie die angelegte Spannung als Einflussfaktoren für die Auflösung betrachtet wurden, soll nun das Augenmerk auf den Elektrolyten, in welchem die Elektrophorese durchgeführt wird, gerichtet werden. Es kann schon vorweg genommen werden, dass durch Variation der Eigenschaften desselben Unterschiede in der Trennleistung festgestellt werden können, jedoch bei weitem nicht in dem Ausmaß wie bei den bisher beschriebenen Parametern.

In Tabelle 13 sind die verwendeten Elektrolyten mit den entsprechend ermittelten R-Werten zu finden. Zunächst muss die Aufmerksamkeit auf einen ganz entscheidenden Punkt gelenkt werden. Von den drei gewählten Elektrolyten zeigt derjenige die schlechteste Auflösung, welcher klassischerweise in der GE Einsatz findet, der Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE). Bei dem Elektrolyt SB handelt es sich um einen neu entwickelten Puffer, welcher gerade sehr aktuell in der Gelelektrophorese etabliert wird, da er eine bessere Trennleistung gewährleisten soll, als gerade TBE<sup>100</sup>. Dieses kann mit den hier erzielten Ergebnissen gestützt werden.

**Tabelle 13: Abhängigkeit der Auflösung R von der Zusammensetzung des Elektrolyten<sup>101</sup>**

Elektrolyt	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
TBE	1,48	3,26	1,24	1,23	1,80
<b>SB</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>
AA	1,65	3,29	1,35	1,36	1,91

Als ein Grund für die bessere Wirkungsweise dieses Puffers kann die Reduzierung der Joule'schen Wärme während der Elektrophorese angegeben werden<sup>102</sup>. Dieser Effekt spielt gerade bei dem Versuchsaufbau für die GE-ICP-MS-Kopplung eine entscheidende Rolle, da hier durch Wärme hervorgerufene Konvektionen in dem Gel einen sehr negativen Einfluss auf die Trennleistung haben können. Besonders bemerkenswert hingegen ist, dass der dritte getestete Elektrolyt Ammoniumacetat, welcher in der GE

---

<sup>100</sup> BRODY und KERN (2004a) *Anal. Biochem.* **333**, 1

<sup>101</sup> Gel: 34x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: Variabel 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

<sup>102</sup> BRODY und KERN (2004b) *Biotechniques* **36**, 214

bislang nur marginal Einsatz fand, eine nicht wesentlich schlechtere Trennung gewährleistet als der SB-Puffer.

Was jedoch postuliert werden kann, ist, dass die Art des Puffers im Gegensatz zu den Gel-Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle für die Trennleistung des Systems spielt, eine Tatsache, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch von außerordentlicher Wichtigkeit werden wird.

Als weiterer Parameter, welcher die Trennleistung sicherlich beeinflusst, wurde der pH-Wert, in welchem die Trennung durchgeführt wird, gesehen. In Tabelle 14 ist die Abhängigkeit der Trennleistung von dem pH-Wert des Elektrolyten für einen kleinen pH-Bereich angegeben.

Wie deutlich zu erkennen ist, erreicht die Trennleistung für die DNA-Fragmente ein Maximum zwischen pH 7,5 und 8,0. Niedrigere oder höhere pH-Werte führen zu einer schlechteren Auflösung. Die Erklärung für die schlechtere Trennleistung bei niedrigeren pH-Werten lässt sich durch die Natur der gewählten Analyten erklären. Die für die elektrophoretische Mobilität verantwortlichen negativen Ladungen an den DNA-Fragmenten kommen durch die Phosphatestergruppen, über welche die einzelnen Basen verknüpft sind, zustande. Die Dissoziation derselben ist abhängig von dem pH-Wert, wobei die Dissoziation umso stärker ist, je höher der pH-Wert eingestellt wird. Bereits im Kapitel über das Elutionsprofil (II.5.2) wurde diskutiert, in welcher Weise der Dissoziationsgrad einen Einfluss auf die Peakform haben kann und dass eine unvollständige Dissoziation zu einem Peak-Tailing führt. Genau dieser Effekt kann hier als Ursache für die schlechtere Auflösung bei niedrigeren pH-Werten vermutet werden. Daher erstaunt es umso mehr, dass die Trennleistung bei pH-Werten höher als 8,0 wieder sinkt. Der Effekt, welcher hierfür verantwortlich sein sollte, ist nicht in der GE zu suchen, sondern im Zerstäubersystem des ICP-MS. Aufgrund der chemischen Beschaffenheit der Sprühkammer steigt die Anzahl der negativen Ladungen auf deren Oberfläche bei steigenden pH-Werten des Eluenten. Werden nun ebenfalls negativ geladene Analyten in diese Sprühkammer eingeführt, kommt es zur Adsorption derselben auf der Oberfläche, was in einem verzögerten Ausspülverhalten resultiert. Dieses wiederum manifestiert sich in einem Peak-Tailing, welches zu einer Verminderung der Auflösung führt.

**Tabelle 14: Abhängigkeit der Auflösung R von dem pH-Wert des Elektrolyten<sup>103</sup>**

pH-Wert	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
7,0	1,59	3,36	1,42	1,31	1,92
7,5	1,63	3,44	1,47	1,35	1,97
<b>8,0</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>
8,5	1,62	3,33	1,45	1,23	1,91
9,0	1,54	3,19	1,36	1,20	1,82

Bei der Wahl des pH-Wertes müssen also mehrere Anforderungen berücksichtigt werden, wobei hinsichtlich der Kopplung mit dem ICP-MS niedrigere pH-Werte zu favorisieren sind. Komplizierter wird die Auswahl des richtigen pH-Wertes noch, wenn anstatt DNA-Fragmenten Proteine untersucht werden sollen, da sie durch ein wesentlich komplexeres Dissoziationsverhalten geprägt sind.

Als letzte Eigenschaft des Elektrolyten wurde die Konzentration desselben variiert. Der Tabelle 15 ist der Einfluss der Elektrolytkonzentration auf die Effizienz der Trennung zu entnehmen. Es kann zunächst festgestellt werden, dass in dem variierten Konzentrationsbereich kaum signifikante Unterschiede zu beobachten sind. Als Trend kann sicherlich festgehalten werden, dass die Trennleistung mit zunehmender Pufferkonzentration sinkt. Die Erklärung dafür ist wiederum die Tatsache, dass bei höherer Elektrolytkonzentration mehr Joule'sche Wärme produziert wird, da quantitativ mehr Ionen wandern und Reibung verursachen. Die Auswahl einer angemessenen Elektrolytkonzentration wird aber auch hier durch einen weiteren, praktischen Faktor limitiert. Je niedriger die Pufferkonzentration eingestellt wird, desto niedriger ist auch seine Pufferkapazität. Dies hat zur Folge, dass die Stabilität des pH-Werts während der Elektrophorese bei sehr niedrigen Elektrolytkonzentrationen nur sehr eingeschränkt gewährleistet ist, auch wenn dadurch minimal bessere Auflösungen erreicht werden können.

---

<sup>103</sup> Gel: 34x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=Variabel; Injektion: 2 µL; U=200V

Tabelle 15: Abhängigkeit der Auflösung R von der Konzentration des Elektrolyten ( $c_E$ )<sup>104</sup>

$c_E$ [mol L <sup>-1</sup> ]	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R'
0,01	1,69	3,46	1,52	1,38	2,00
<b>0,05</b>	<b>1,68</b>	<b>3,42</b>	<b>1,49</b>	<b>1,37</b>	<b>1,98</b>
0,15	1,64	3,38	1,42	1,31	1,94

Bei der Wahl der Elektrolytkonzentration muss also die Abwägung erfolgen zwischen einer verbesserten Auflösung und der Stabilität des pH-Werts. In der Praxis zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,05 mol L<sup>-1</sup> sowohl eine gute Auslösung gewährleistet als auch die Stabilität des pH-Werts über einen langen Zeitraum garantiert.

Zusammenfassend für diese Untersuchungen kann festgehalten werden, dass die Parameter identifiziert werden konnten, welche einen deutlichen Einfluss auf die Trennleistung besitzen und damit natürlich auch jene, welchen eine eher untergeordnete Rolle in diesem Zusammenhang zuzuordnen ist. Zu den entscheidenden Parametern gehören die Dimensionen des Gels, dessen Zusammensetzung und Konzentration sowie die angelegte Spannung. Weniger Einfluss auf die Trennleistung hingegen besitzen alle Eigenschaften des Elektrolyten, wie dessen Art, pH-Wert und Konzentration. Die Effekte, welche für die effektive Trennleistung des gesamten GE-ICP-MS-Systems, eine Rolle spielen, sind mannigfaltig und betreffen sowohl das GE-System als auch das ICP-MS, wie anhand der pH-Abhängigkeit der Trennung demonstriert werden konnte.

All diese Aussagen können jedoch nur für das untersuchte Analytensystem der DNA-Fragmente getroffen werden. Bei anderen Analyten, wie beispielsweise Proteinen, kann der ganze Sachverhalt wieder anders aussehen.

Abschließend zu diesem Abschnitt soll nun die Trennleistung des Systems unter optimierten Trennbedingungen beurteilt werden. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Separationsmethoden zu schaffen, werden zwei weitere Qualitätsmerkmale einer Trennleistung mit in die Beurteilung einbezogen. Aus dem Bereich der Chromatographie ist als Qualitätsmerkmal einer Säule die Anzahl der theoretischen Böden N bekannt.

---

<sup>104</sup> Gel: 34x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: SB Variabel, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

**Formel 3: Theoretische Bodenzahl N**

$$N = 5,54 \cdot \left[ \frac{t_R}{w_h} \right]^2$$

N : Theoretische Bodenzahl

$t_R$  : Migrationszeit

$w_h$  : Halbwertsbreite

Die Anzahl der theoretischen Böden nimmt mit zunehmender Säulenlänge zu. Um unterschiedlich lange Säulen dennoch miteinander vergleichen zu können, wurde ein zusätzliches Qualitätsmerkmal definiert, die Bodenhöhe H.

**Formel 4: Bodenhöhe H**

$$H = \frac{L}{N}$$

H : Bodenhöhe [mm]

L : Länge der Trennsäule [mm]

N : Theoretische Bodenzahl

Werden diese Parameter für die in Abbildung 23 demonstrierte Trennung angewandt, so können folgende Durchschnittswerte, bezogen auf alle 5 Fragmente, für N und H ermittelt werden.

$$N = 1276 \pm 126 ; H = (0,026 \pm 0,003) \text{ mm}$$

Um die Trennleistung des Systems anhand eines komplexeren Analytensystems zu demonstrieren, ist in Abbildung 24 die Trennung eines DNA-Standards mit 11 verschiedenen DNA-Fragmenten in äquimolaren Mengen dargestellt, wobei das 500bp-Fragment in der verdoppelten Konzentration vorliegt.

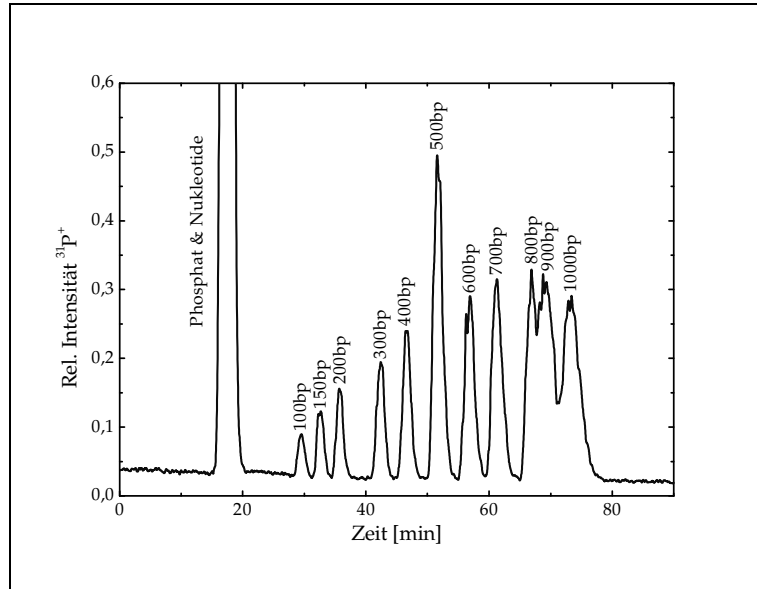


Abbildung 24: Elektrophoretische Trennung von 11 verschiedenen DNA-Fragmenten<sup>105</sup>

Man kann erkennen, dass dieser DNA-Standard in hohen Mengen niedermolekulare, P-haltige Verbindungen enthält, deren Hauptteil wohl aus Phosphat und Nukleotiden besteht. Diese können jedoch von den DNA-Fragmenten abgetrennt werden. Weiterhin wird deutlich, dass die Trennung für die Fragmente im Bereich von 100-700 bp sehr effektiv funktioniert, bei der Auftrennung der Fragmente zwischen 800 bp und 1000 bp jedoch versagt. Weitere Untersuchungen müssten zeigen, ob dies auf die Qualität des Standards zurückzuführen ist oder auf die Trennbedingungen.

Trotzdem lassen sich auch für diese Trennleistung die Qualitätsparameter N und H als Durchschnittswerte für die Fragmente zwischen 100bp und 700bp bestimmen.

$$N = 5023 \pm 1260 ; H = (0,008 \pm 0,002) \text{ mm}$$

Es fällt auf, dass diese Werte sich deutlich von denen unterscheiden, welche für die Trennung des DNA-Standards ermittelt wurden, in welchem nur 5 Fragmente enthalten waren. Dieses hängt mit der Tatsache zusammen, dass in diesem Fall andere Bedingungen gewählt wurden, um vor allem die Gesamtdauer der Analyse möglichst klein zu halten.

Um nun eine Vergleichbarkeit mit anderen Separationsmethoden herzustellen, sind in der Tabelle 16 typische Werte für N und H für unter-

<sup>105</sup> Gel: 40x2,2 mm, 2,2% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 5 µL; U=200V

schiedliche Separationsmethoden angegeben, sowie ein Querschnitt derjenigen, welche für das entwickelte GE-ICP-MS-System ermittelt werden konnten.

**Tabelle 16: Zahl der theoretischen Böden N und Bodenhöhe H für verschiedene Separationsmethoden**

<b>Methode</b>	<b>N</b>	<b>H [mm]</b>
GC	20.000-100.000	0,1-1,5
HPLC	2.000-20.000	0,05-0,1
CE	100.000- 1.000.000	0,001-0,01
GE	1.000-10.000	0,002-0,05

Wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist, können für die unterschiedlichen Separationsmethoden bestimmte Spannweiten für N und H angegeben werden. Bei der Zahl der theoretischen Böden N bewegt sich die entwickelte GE-ICP-MS-Kopplung im Bereich der HPLC, mitunter auch leicht darunter. Ein Vergleich mit den kapillar-basierenden Methoden, was dieses Qualitätskriterium anbelangt, kann a priori für die GE nur sehr mäßig ausfallen. Umso erstaunlicher ist es aber, wenn die Bodenhöhe zum Vergleich herangezogen wird. Da die verwendeten Gele im Vergleich zu allen anderen Trennsäulen und –kapillaren außerordentlich kurz waren, sind die ermittelten Werte für die Bodenhöhe der GE durchaus mit denen der CE zu vergleichen. Doch dieser Vergleich ist leider nur sehr begrenzt zulässig, da zum Erreichen einer vergleichbaren Trennleistung die Gellänge ebenso lang sein müsste wie eine CE-Kapillare. Doch dieses würde mit den verwirklichtbaren Bedingungen, vor allem der maximalen Spannung, die Gesamtdauer eines elektrophoretischen Laufs exorbitant ausdehnen. Damit einher würden genau jene Probleme gehen, welche schon vorher genannt wurden, wie die Peak-Verbreiterung durch Diffusion, wodurch eine effiziente Trennleistung nicht mehr möglich wäre. Ein Ausweg aus diesem Dilemma bietet die Verkleinerung des Gel-Innendurchmessers, wodurch das Anlegen höherer Spannungen möglich wird, so wie es letztendlich in der Kapillargelelektrophorese (CGE) verwirklicht ist.

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass das entwickelte System im momentanen Stadium eine zufriedenstellende Separation gewährleisten kann, auch wenn die Trennleistung was die Werte für N und H anbelangt, noch nicht an die traditionellen Separationsmethoden heranreichen kann.

#### II.5.4 Reproduzierbarkeit

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit einer Separationsmethode ist die Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse. Dieses gilt in besonderem Maße für die hier entwickelte Methode, da das Trennmedium selbst hergestellt wird und im Vergleich zu anderen Trennmedien, wie das Packungsmaterial einer HPLC-Säule, als recht labil bezeichnet werden kann.

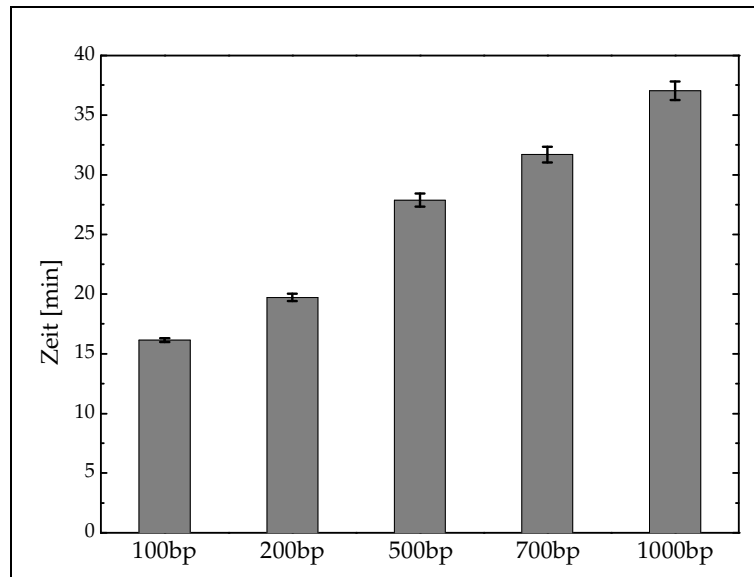
Eine Untersuchung in diesem Zusammenhang muss daher folgende Gesichtspunkte berücksichtigen:

- i. die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in mehreren, aufeinander folgenden Messungen in einem Gel,
- ii. die Reproduzierbarkeit der Migrationszeit über einen längeren Zeitraum in einem Gel (Langzeitstabilität des Gels),
- iii. die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in verschiedenen Gelen gleicher Zusammensetzung (Reproduzierbarkeit der Gel-Herstellung),
- iv. die Reproduzierbarkeit der Peakflächen in mehreren, aufeinander folgenden Messungen in einem Gel.

Für die Untersuchungen in diesem Zusammenhang wurde wiederum der DNA-Standard, welcher 5 DNA-Fragmente enthielt, genutzt. Die Trennung desselben unter optimierten Bedingungen wurde bereits in Abbildung 23 dargestellt.

Als erstes wurde Reproduzierbarkeit in fünf aufeinander folgenden Läufen mit dem gleichen Gel getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 für jedes einzelne Fragment graphisch dargestellt.





**Abbildung 25: Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in einem Gel (n=5)**

Die Standardabweichungen der Migrationszeiten liegen bei maximal 2,1% für das größte der DNA-Fragmente. Im Durchschnitt liegen die Abweichungen bei 1,75%, was für eine elektrophoretische Methode als hervorragend angesehen werden kann.

Um die Langzeitstabilität eines Gels zu testen, wurde die Analyse des DNA-Standards jeweils zwei Mal in gewissen Zeiträumen wiederholt. Angeben ist hier die Anzahl der Messtage, an welchen das Gel wirklich für die Elektrophorese genutzt wurde. Der gesamte Zeitraum, also von der Herstellung des Gels und der ersten Messung bis hin zur letzten Messung, erstreckte sich jedoch über 20 Tage. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Zur Erläuterung dieser Graphik muss nochmals gesagt werden, dass hier die Migrationszeiten jedes einzelnen Fragments in Abhängigkeit der Zeit, in welcher das Gel auch wirklich für eine Analyse genutzt wurde, aufgetragen ist. Zeitpunkt 0 kennzeichnet daher den Tag, an dem das Gel hergestellt und für eine erste Analyse genutzt wurde. Die Werte am Tag 9 sind aber nicht neun Tage später gemessen worden, sondern 20 Tage später, aber nach 9 Betriebstagen der GE mit diesem einen Gel.

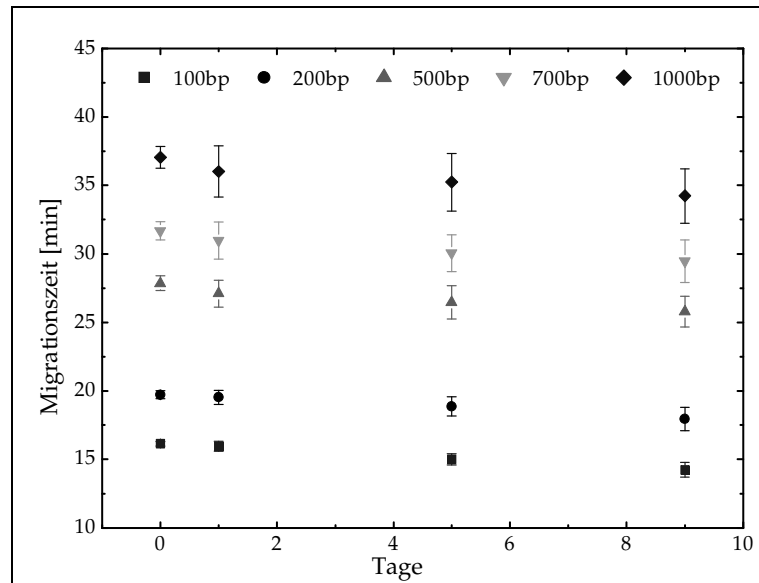
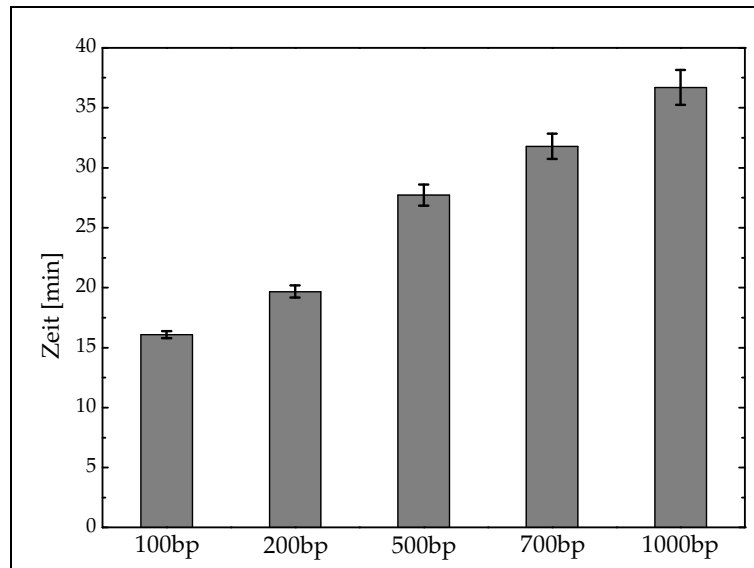


Abbildung 26: Langzeitstabilität eines Gels hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten (n=2)

Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass die Migrationszeiten mit der Zeit kürzer werden. Dieses lässt sich durch die mechanische Belastung des Gels in der Elektrophoresezelle erklären. Das Elutionsmittel übt einen Zug auf das Gel aus, so dass sich dieses mit der Zeit zusammenzieht und verkürzt, woraus kürzere Migrationszeiten resultieren. Jedoch ist dieser Effekt weniger drastisch, als es die Graphik vermuten lässt. Werden alle Migrationszeiten über den ganzen Zeitraum hinweg gemittelt, so ergibt sich immer noch ein Wert mit einer relativen Standardabweichung von kleiner 6%.

Es kann also gesagt werden, dass die Stabilität eines Gels über einen längeren Zeitraum von mehreren Messtagen ausreicht, um eine gute Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Migrationszeiten zu gewährleisten.

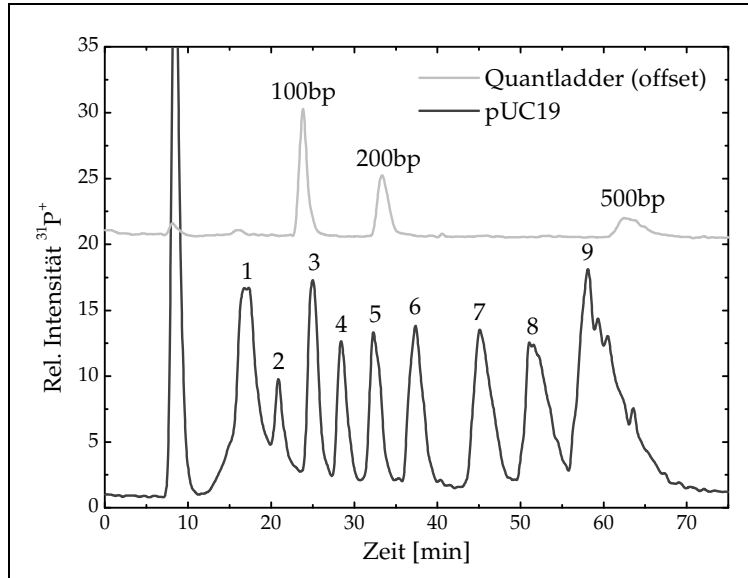
Als ein weiterer kritischer Faktor hinsichtlich der Reproduzierbarkeit kann die Gelherstellung gesehen werden. Daher wurden hintereinander und vollkommen unabhängig voneinander drei Gele mit den gleichen Eigenschaften hergestellt und durch jeweils drei Wiederholungsmessungen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten untersucht. In der Abbildung 27 sind, analog zu Abbildung 25, die Ergebnisse dieser Testreihe graphisch dargestellt.



**Abbildung 27: Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in verschiedenen Gelen gleicher Zusammensetzung (n=3)**

Es ergibt sich das gleiche Bild wie bei der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in einem Gel, mit dem Unterschied, dass die relativen Standardabweichungen etwas höher sind. Mit einem Wert von 3,9% begegnet uns hier die Reproduzierbarkeit um den Faktor 2 weniger genau als bei den Messungen mit einem Gel. Die Ursache dafür muss ganz eindeutig bei der Gelherstellung gesucht werden. Jedoch muss auch gesagt werden, dass eine Reproduzierbarkeit mit dieser geringen Abweichung durchaus angemessen erscheint für ein Trennmedium, welches selbst hergestellt wird. Nichtsdestotrotz sollten Messungen, bei welchen eine hohe Präzision hinsichtlich der Migrationszeiten notwendig ist, grundsätzlich möglichst in ein und demselben Gel durchgeführt werden.

Eine solche Präzision wäre notwendig, wenn beispielsweise eine Größenbestimmung von unbekanntem DNA-Fragmenten mithilfe eines Standards durchzuführen wäre. Um dies an einem Beispiel zu demonstrieren, wurde mittels des DNA-Standards eine Kalibrationsfunktion hinsichtlich der Migrationszeiten der einzelnen Fragmente erzeugt und damit eine Größenbestimmung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe durchgeführt. In Abbildung 28 ist ein Elektropherogramm dieser DNA-Fragmente, welche durch den Verdau eines Plasmids (pUC19) zu erhalten sind, dargestellt. Zum Vergleich ist hier ebenfalls das Elektropherogramm des DNA-Standards mit den bekannten DNA-Fragmenten unter gleichen Bedingungen projiziert.



**Abbildung 28: Größenbestimmung von DNA-Fragmenten<sup>106</sup>**

Da die Länge der Fragmente in dem Plasmid-Verdau bekannt ist, kann bereits so eine Zuordnung der einzelnen Fragmente erfolgen. Doch wurde der Weg über die Kalibrationsfunktion gegangen, um zu zeigen, dass eine Größenbestimmung auch bei Fragmenten mit unbekannter Länge über die Migrationszeiten zu verwirklichen ist. Die Resultate dieser Untersuchung der Tabelle 17 zu entnehmen.

**Tabelle 17: Größenbestimmung von DNA-Fragmenten**

Fragment Nr.	Länge DNA [bp]	
	Eigenbestimmung	Herstellerangabe
1	32 ± 2	26/34
2	65 ± 3	67
3	109 ± 5	110/111
4	146 ± 7	147
5	192 ± 9	190
6	245 ± 12	242
7	329 ± 16	331
8	409 ± 19	404
9	479 ± 24	489/501

<sup>106</sup> Gel: 40x2,2 mm, 3,0% AG; Elektrolyt: SB 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

Es ist deutlich zu erkennen, dass alle bestimmten Werte im Rahmen des Fehlerbereichs mit den Angaben des Herstellers übereinstimmen. Zwar könnte bei unbekannter Fragmentlänge aufgrund der Bestimmungsunsicherheit nur ein Größenbereich angegeben werden, doch reicht dies in der Regel aus, um bereits qualifizierte Aussagen über das Analytensystem treffen zu können.

Nachdem nun der Aspekt der Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Migrationszeiten und der Zeitachse im Allgemeinen hinreichend beleuchtet wurde, soll der Blick auf die quantitativen Möglichkeiten der GE-ICP-MS-Kopplung und damit auf die Intensitätsachse gelenkt werden. Da dieser Abschnitt von Reproduzierbarkeiten handelt, soll zunächst dargestellt werden, inwieweit mit dem entwickelten System überhaupt reproduzierbare Signale hinsichtlich der Signalintensität erhalten werden können. Dieses wäre nämlich erst die Grundvoraussetzung für den Einsatz der GE-ICP-MS in quantitativen Fragestellungen.

Zu diesem Zweck wurden die erhaltenen Elektropherogramme auch hinsichtlich der Peakflächen ausgewertet, sofern immer die gleiche Menge an DNA-Standard aufgetragen wurde. Hierbei wird zum ersten Mal mit relativen Intensitäten gearbeitet, da gerätebedingte Schwankungen in der Empfindlichkeit ausgeglichen werden mussten. Die Berechnung der relativen Intensitäten geschah unter Zuhilfenahme des internen Standards vor dem Hintergrund, dass sich gerätebedingte Schwankungen in der Empfindlichkeit auf jenen genauso auswirken sollten wie auf den eigentlichen Analyten.

Die Resultate dieser Auswertungen sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

**Tabelle 18: Reproduzierbarkeit der Peakflächen (n=5)**

Länge DNA-Fragmente [bp]	rel. Intensität <sup>31</sup> P <sup>+</sup> [min]	RSD [%]
100	0,43	0,5
200	0,69	1,1
500	1,25	1,7
700	1,68	1,8
1000	2,40	2,6

Zunächst kann gesagt werden, dass mittels der GE-ICP-MS reproduzierbare Signalintensitäten erhalten werden können, was eine Voraussetzung für späteres quantitatives Arbeiten darstellt. Mit einer

relativen Standardabweichung von kleiner als 3% liegt die Reproduzierbarkeit auch vollkommen in dem Bereich, was von dem System zu erwarten ist.

Die Ergebnisse dieses Abschnitts über die Reproduzierbarkeit sollen in Form einer Tabelle zusammengefasst werden.

Reproduzierbarkeit hinsichtlich ...	RSD [%]
... der Migrationszeiten in einem Gel bei aufeinander folgenden Wiederholungsmessungen	< 2,1
... der Migrationszeiten ein einem Gel über einen Zeitraum von 9 Messtagen (20 Tage gesamt)	< 6,0
... der Migrationszeiten in voneinander unabhängig präparierten Gelen	< 3,9
... hinsichtlich der Signalintensitäten in einem Gel	< 3,0

### II.5.5 Empfindlichkeit

Zur vollständigen Charakterisierung einer analytischen Methode gehört zwingend die Bestimmung der Empfindlichkeit dazu. Die Empfindlichkeit ist definiert durch die Steigerung des Detektorsignals in Abhängigkeit von der Erhöhung der Menge des Analyten. Bevor eine solche Bestimmung durchgeführt wird, sollte zunächst eine Optimierung der möglichen Empfindlichkeit stattfinden.

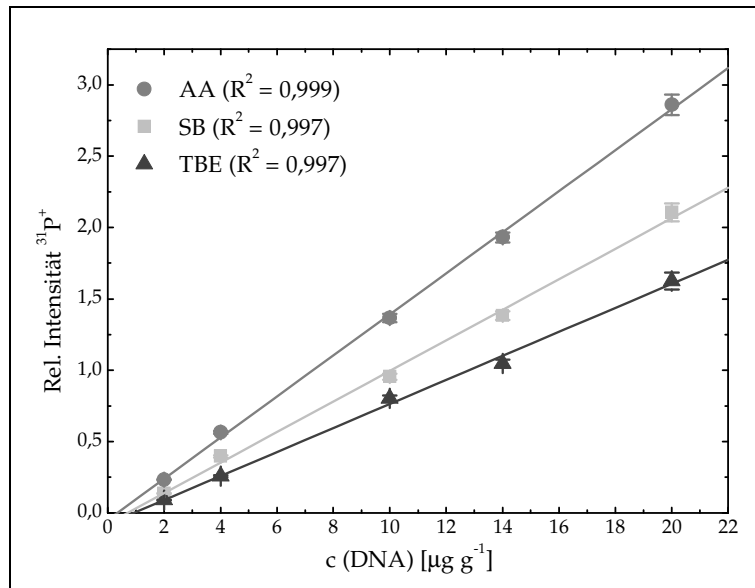
Der Parameter, welcher bei der GE-ICP-MS-Kopplung wohl den meisten Einfluss auf die Empfindlichkeit haben sollte, ist die Zusammensetzung des Elutionsmittels. Da mit diesem der Analyt in das Zerstäubersystem des ICP-MS transportiert wird und schließlich auch mit in das Plasma gelangt, ist es hauptverantwortlich für die Transporteigenschaften im Zerstäubersystem und kann als Hauptkomponente im Plasma auch die Ionisierungseffizienzen beeinflussen. Wie bereits beschrieben, ist dieser Effekt ein Manko der HPLC-ICP-MS, wenn konzentrierte Pufferlösungen oder organische Lösungsmittel mit in das Plasma eingetragen werden.

Daher soll hier zunächst untersucht werden, inwieweit unterschiedliche Elutionsmittel einen Einfluss auf die Empfindlichkeit des Detektors besitzen, damit neben der bereits optimierten Trennleistung auch die Detektionsleistung einen maximalen Wert erreicht.

Für diese Untersuchungen wurde wiederum der DNA-Standard mit 5 Fragmenten verwandt, obwohl dieser in diesem Zusammenhang mit einem entscheidenden Nachteil behaftet ist. Wie später noch sehr ausführlich erläutert werden wird, sind die Konzentrationsangaben für diesen Standard sehr kritisch zu beurteilen. Doch die Diskussion darüber soll in Kapitel III erfolgen. Hier soll es ausreichen, dass mit diesem Standard durchaus Unterschiede in der Empfindlichkeit bei der Verwendung von unterschiedlichen Elutionsmitteln herausgefunden werden können, was in diesem Zusammenhang zunächst ausreichen soll. Eine Bestimmung der absoluten Empfindlichkeit der Methode muss jedoch auf anderem Wege erfolgen.

Davon ausgehend, dass die Angabe des Herstellers bezüglich der Äquimolarität der in dem Standard enthaltenen DNA-Fragmente stimmt, kann dieser zur Erstellung einer Kalibrationsfunktion genutzt werden. Zeigt diese Linearität, so wäre eine entscheidende Voraussetzung für die quantitative Untersuchung von DNA-Fragmenten mit der GE-ICP-MS geschaffen. Denn damit wäre sichergestellt, dass alle enthaltenen DNA-Fragmente, egal welcher Größe, mit der gleichen Empfindlichkeit detektiert werden können.

In Abbildung 29 sind nun solche Kalibrationsfunktionen für jedes der drei verwendeten Elutionsmittel dargestellt.



**Abbildung 29: Abhängigkeit der Empfindlichkeit von dem verwendeten Elutionsmittel**

Zunächst soll das Augenmerk auf die Form der Kalibrationsfunktion gelenkt werden, wie bei allen drei Elutionsmitteln zu beobachten ist. Für alle drei Funktionen kann ein Linearitätskoeffizient  $R^2 > 0,995$  angegeben werden, was für eine tatsächliche Linearität der Funktionen spricht. Damit wäre sichergestellt, dass die Empfindlichkeit für die größeren DNA-Fragmente genauso gut ist, wie für die kleineren. Dieses ergibt sich aus dem Sachverhalt, dass der Anteil an Phosphor in den DNA-Fragmenten linear mit der Größe derselben ansteigt, woraus bei Äquimolarität der Fragmente ebenfalls ein linearer Anstieg der Intensität für Phosphor im Detektor zu erwarten ist. Nun spiegelt sich eben jener Vorteil der Verwendung des ICP-MS als Detektor wieder, welcher schon zu Beginn dieser Ausführungen beschrieben wurde. Die Empfindlichkeit des Detektors für ein spezielles Element sollte unabhängig sein von der chemischen Form, in welcher das Element vorliegt, was durch die drastischen Bedingungen im Plasma gewährleistet sein sollte.

Warum in diesem konkreten Fall auf dieses Faktum soviel Wert gelegt wird, ist der folgende: Es kann durchaus vorkommen, dass sich bestimmte chemische Verbindungen hinsichtlich der Empfindlichkeit am Detektor anders verhalten, gerade wenn es sich um makromolekulare Verbindungen handelt. Hier spielen nicht nur die Vorgänge im Plasma eine Rolle, sondern bereits die Zerstäubung der Probe kann zu teils beträchtlichen Unterschieden in der Empfindlichkeit zwischen zwei Elementspezies führen.

Da im Rahmen dieser Untersuchungen nun erstmals solch große Moleküle überhaupt direkt mit der ICP-MS als Detektor untersucht wurden, ist es



umso erfreulicher, dass zumindest zwischen den einzelnen DNA-Fragmenten kein Unterschied in dem Verhalten im Detektor zu beobachten ist. Damit wäre der Grundstein gelegt für die quantitative Untersuchung dieser Fragmente mittels der GE-ICP-MS, was es aber durch weitere Tests zu verifizieren gilt. Darüber wird im folgenden Kapitel noch ausführlich zu diskutieren sein.

Der zweite Aspekt, welcher sich mittels der Abbildung 29 im Hintergrund behandeln lässt, ist der Unterschied in der Empfindlichkeit bei der Verwendung unterschiedlicher Elutionsmittel. Die Empfindlichkeit wird durch die Steigung  $k$  der linearen Kalibrationsfunktion ausgedrückt, da durch diese die Abhängigkeit der Steigerung der Signalintensität von dem Zuwachs an Analytmenge beschrieben wird. In Tabelle 19 sind die entsprechenden  $k$ -Werte für die unterschiedlichen Elutionsmittel angegeben. Was bereits auf den ersten Blick der Graphik zu entnehmen ist, wird hier durch vergleichbare Zahlen ausgedrückt. Die verschiedenen Elutionsmittel haben einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Empfindlichkeit des ICP-MS. Die mit Abstand beste Empfindlichkeit kann mit Ammoniumacetat als Elutionsmittel erreicht werden, gefolgt von Natrium-Borat und Tris-Borat-EDTA. Mit Ammoniumacetat kann gegenüber Natrium-Borat eine Empfindlichkeitssteigerung um ungefähr 35% erreicht werden.

**Tabelle 19: Abhängigkeit der Empfindlichkeit  $k$  von dem Elutionsmittel**

Elutionsmittel	$k$ [min g $\mu\text{g}^{-1}$ ]
Tris-Borat-EDTA (TBE)	0,084
Natrium-Borat (SB)	0,107
Ammonium-Acetat (AA)	0,144

Die Ursachen dieses Phänomens sind vor allem im Plasma selbst zu suchen. So ist bekannt, dass Bor als Hauptkomponente im Plasma zu einer reduzierten Ionisierung der anderen Analyten führen kann, wofür auch der Befund dieser Untersuchungen sprechen würde. Bei TBE kommt sicherlich noch erschwerend hinzu, dass durch Tris und EDTA ein nicht unbeträchtlicher Teil an organischen Verbindungen mit in das Plasma eingetragen wird, was ebenfalls zu verminderten Ionisierungsraten führen kann.

Zusätzlich hat Ammoniumacetat gegenüber den Borat-haltigen Elutionsmitteln den Vorteil, dass es im Bereich der Sprühkammer und des

Injektionsrohrs nicht zur Auskristallisation von Salzen kommt, was bei beiden Borat-haltigen Elutionsmitteln recht schnell festzustellen ist. Dieser Befund unterstützt die hier dargestellten Ergebnisse, da eine solches Auskristallisieren für ein reduziertes Zerstäubungsverhalten spricht.

Sicher kann also festgestellt werden, dass Ammoniumacetat als Elutionsmittel gegenüber den anderen beiden zu favorisieren ist.

### II.5.6 Nachweisgrenze

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Empfindlichkeit der entwickelten Methode quantitativ durch die Steigung der Kalibrationsgeraden beschrieben. In diesem Abschnitt soll nun die Bestimmung einer Nachweisgrenze verwirklicht werden.

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wird das allgemein anerkannte 3 $\sigma$ -Kriterium zugrunde gelegt, was heißt, dass ein vom Analyten hervorgerufenen Signal als solches akzeptiert wird, wenn es größer ist als die dreifache Standardabweichung des Untergrundsignals. Die Nachweisgrenze ist damit spezifisch für jeden einzelnen Analyten, was die Bestimmung derselben im Rahmen dieser Untersuchungen problematisch gestaltet. Wie mehrfach erwähnt, besteht ein großes Defizit in der Erhältlichkeit von exakt quantifizierten Biopolymer-Standards, insbesondere von DNA-Fragmenten. Solche Standards sind aber für die Bestimmung einer Nachweisgrenze unerlässlich. Einer Lösung für dieses Problem wird in diesen Ausführungen ein ganzes Kapitel gewidmet, doch zuvor soll hier ein anderer Weg skizziert werden, um dem entwickelten System eine Nachweisgrenze zuzuschreiben.

Hierbei wird zurückgegriffen auf andere Analyten, für welche exakt quantifizierte Standardlösungen erhältlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass kleinere Ionen, wie Phosphat oder Iodid, hervorragendes Migrationsverhalten in der GE zeigen und mittels der GE-ICP-MS detektiert werden können. Dieses, obwohl das System für die Analyse solch kleiner Ionen eigentlich gar nicht konzipiert ist, da diese durch die Dialysemembran zwischen Elutionsregion und Elektrodenraum hindurch migrieren können. Es wurde aber schon gezeigt, dass diese kleineren Moleküle sehr wohl aus der Elutionsregion hinaus in den Detektor transportiert werden. Vor dem Hintergrund der Quantifizierung bleibt nun nur noch die Frage, in welchem Maß dieser Transport erfolgreich ist und wie viel Analyt in der Elutionsregion verloren geht.

Bevor auf diesen Punkt genauer eingegangen wird, soll zunächst eine Nachweisgrenze für Phosphor (als Phosphat), welche zu Erzielen mit der GE-ICP-MS möglich ist, ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Kalibrationsgerade für Phosphat erstellt und daraus die Nachweisgrenze für Phosphor (als Phosphat) errechnet. Die Kalibrationsgerade ist in Abbildung 30 zu sehen.

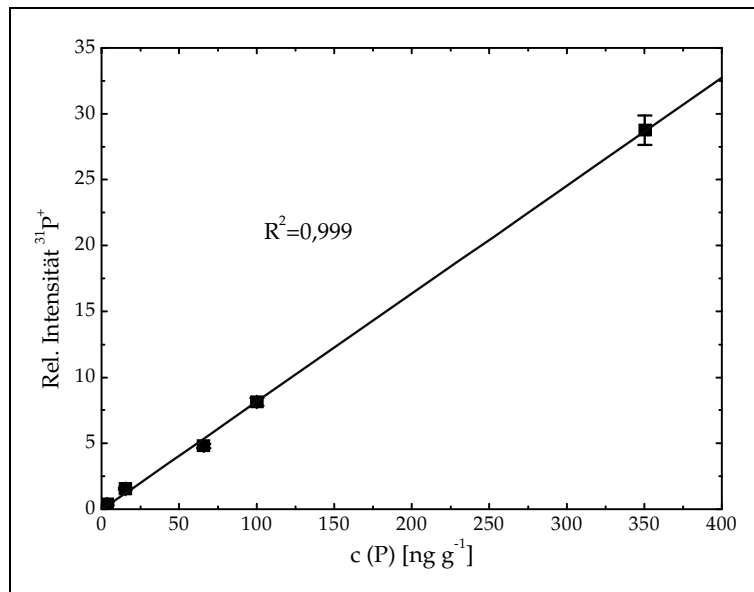


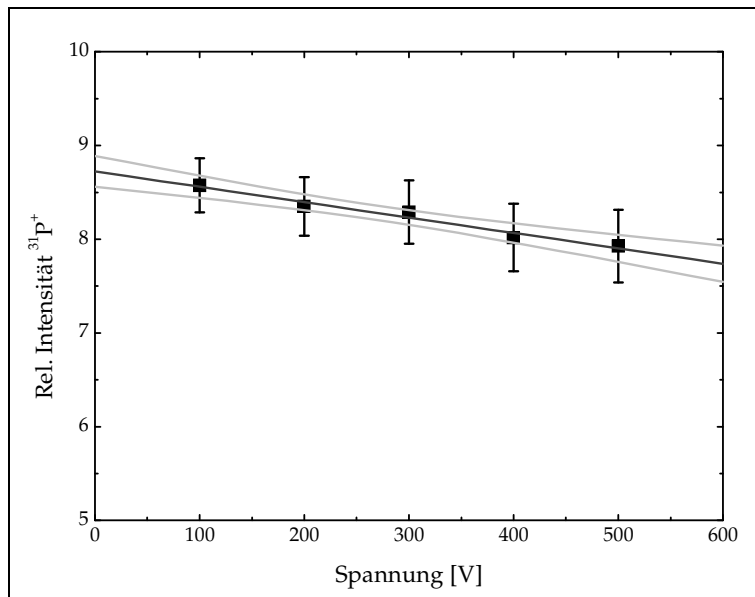
Abbildung 30: Kalibrationsgerade für Phosphat

Die Kalibrationsgerade zeigt eine sehr gute Linearität ( $R^2=0,999$ ) über den interessierenden Konzentrationsbereich und kann zur Ermittlung der Nachweisgrenze genutzt werden. Unter Einbeziehung des relativen Untergrundsignals für  $^{31}\text{P}^+$  von  $0,040 \pm 0,002$  ergibt sich aus diesen Daten eine Nachweisgrenze für Phosphor (als Phosphat) von  $1 \text{ ng g}^{-1}$ .

Bei der Ermittlung dieser Nachweisgrenze ist allerdings noch nicht berücksichtigt, dass das Phosphat bei dem Transport durch die Elutionsregion verloren gegangen sein könnte. Da die Vorgänge in der Elutionsregion bei diesem Transport vor allem abhängig sein sollten von dem Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten im elektrischen Feld im Vergleich zur Transportgeschwindigkeit durch das Elutionsmittel, wurde folgender Versuch konzipiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten lässt sich beeinflussen durch die Höhe der angelegten Spannung. Je höher die angelegte Spannung, desto größer die Geschwindigkeit der Ionen im Vergleich zur Fließgeschwindigkeit des Elutionsmittels und damit einhergehend, der Transporteffizienz für die

Analyten. Durch die systematische Variation der Spannung sollte sich nun feststellen lassen, wie sich das Analytsignal im Detektor in Abhängigkeit von der Zunahme der Spannung verhält. Durch Extrapolation auf die Spannung 0 könnte sich ein Maß finden lassen, welches die Beurteilung des Analytverlustes in der Elutionsregion zulässt.

Das Ergebnis dieser Untersuchung am Beispiel Phosphat ist in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Abhängigkeit der Signalintensität von der angelegten Spannung**

Wie zu erwarten, nimmt das Analytsignal bei der Erhöhung der angelegten Spannung linear ab, was für den Verlust von Analyt in der Elutionsregion spricht. Doch ist diese Abnahme erstaunlich gering. Sie beträgt bei einer Erhöhung der Spannung um je 100 V nur  $2 \pm 1\%$ . Daraus lässt sich schließen, dass die Transporteffizienz für kleinere Ionen durch das Elutionsmittel ausreicht, um diese - entgegen der Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung der Elektrode - aus dem elektrischen Feld heraus zu lösen. Bei den durchschnittlich angewandten Arbeitsspannungen von 200V entspricht die Transporteffizienz für Phosphat ungefähr 95%, was es durchaus ermöglicht, das Anwendungsspektrum der GE-ICP-MS auf die Analyse von kleineren Ionen zu erweitern.

Extrapoliert man nun diese spannungsabhängigen Transporteffizienzen auf den Spannungswert 0 unter Zuhilfenahme der linearen Regression sowie der Konfidenzbereiche und korrigiert damit die bestimmte Nachweisgrenze, so

sollte sich eine Aussage über die Nachweisgrenze für P-haltige Verbindungen treffen lassen, welche nicht durch die Dialysemembran hindurch migrieren können. Wie sich jedoch noch zeigen wird, ist diese Herangehensweise nicht praxistauglich, da natürlich noch andere Effekte die Nachweisgrenze beeinflussen, darunter vor allem das Verhalten der Analyten im Detektor. Daher soll hier darauf verzichtet werden, auch vor dem Hintergrund, dass eine solche Korrektur an dem Wert der ermittelten Nachweisgrenze nicht viel ändern würde.

## II.6 Zusammenfassung

Ziel der Ausführungen in diesem Kapitel war es, zu zeigen, dass eine Online-Kopplung der Gelelektrophorese mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (GE-ICP-MS) prinzipiell möglich ist und problemlos in den Kanon der *hyphenated techniques* eingereiht werden kann. Die Beschreibung der GE-ICP-MS soll hier kurz zusammengefasst werden, auch im Hinblick auf den Vergleich mit bestehenden Kopplungstechniken.

Die GE-ICP-MS-Kopplung wurde realisiert durch einen kontinuierlichen Elutionsmittelfluss zwischen dem Ende des Gels und dem Elektrodenraum der Gegenelektrode, welche durch eine Dialysemembran voneinander abgetrennt sind. Diese verhindert die Migration der aus dem Gel heraustretenden Makromoleküle in Richtung der Gegenelektrode. Dieses aus der präparativen Gelelektrophorese bekannte Prinzip ermöglicht den Transport der durch die GE getrennten Moleküle aus der GE-Zelle heraus während des laufenden Elektrophorese-Vorgangs. Durch die direkte Verbindung dieses Elutionsflusses mit dem Zerstäubersystem der ICP-MS kann eine Analyse der Moleküle, welche aus dem Gel heraus migrieren, hinsichtlich der Elementzusammensetzung erfolgen.

Die GE-Apparatur, welche eigentlich für präparatives Arbeiten bestimmt war, konnte durch gezielte Modifikationen für analytische Zwecke umgerüstet werden. Dabei auftretende Probleme, beispielsweise bei der Gel-Herstellung konnten gelöst werden, so dass die GE-Apparatur hinsichtlich der Kopplung an das ICP-MS als optimiert angesehen werden kann.

Anhand des dem Elutionsmittel zugesetzten internen Standards konnte gezeigt werden, dass ein konstanter Fluss zwischen der GE und dem ICP-MS erzeugt werden kann. Mit einer Flussrate von  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  gewährleistet die GE hervorragende Kopplungseigenschaften an die ICP-MS, da in diesem Bereich mit modernen Zerstäubersystemen sehr stabile und robuste Aerosole erzeugt werden können. So zeigt sich in diesem Bereich die GE-ICP-MS vorteilhaft gegenüber kapillar-basierenden Kopplungen, da hierbei sehr empfindliche und störanfällige Zerstäuberkonstruktionen verwandt werden müssen. Als Elutionsmittel wurde grundsätzlich der Elektrolyt, in welchem die Elektrophorese durchgeführt wurde, gewählt, um das System nicht zu komplex zu gestalten.

Als erste Voraussetzung für eine funktionierende GE-ICP-MS wurde durch die Verwendung unterschiedlicher Analyten die Möglichkeit aufgezeigt, transiente Signale zu erhalten. Schon hierbei wurde deutlich, dass die GE-ICP-MS auch geeignet ist, um untypische Analyten für die GE, wie kleinere Ionen, zu untersuchen. An dem Beispiel Phosphat wurde demonstriert, dass

bei moderaten Spannungsverhältnissen ( $< 200$  V) über 95% des injizierten Phosphats aus der GE heraus transportiert wird und nicht, wie vielleicht zu erwarten wäre, durch die Dialysemembran weiter in die Richtung der Gegenelektrode wandert. Aus den gewählten Beispielen wurde ersichtlich, dass mittels der GE-ICP-MS letztendlich alle ionischen Verbindungen untersucht werden können und keine Einschränkung hinsichtlich der Größe der Verbindungen besteht.

Eine systematische Untersuchung erfolgte hinsichtlich der Peaksymmetrie, wobei in allen Fällen ein Peak-Tailing zu beobachten war, welches auf unterschiedliche Ursachen – innerhalb und außerhalb der GE – zurückzuführen war.

Es konnte demonstriert werden, dass es möglich ist, die verwendeten Gele vor der Analyse zu reinigen. Hierzu werden frisch bereitete Gele ohne Auftrag einer Probe durch Anlegen einer elektrischen Spannung von ionischen Verunreinigungen befreit, was Untergrundsignale drastisch senkt sowie der Gefahr von Artefaktbildungen minimiert. Als Beispiel wurden P-haltige Verunreinigungen dargestellt als auch eine semi-quantitative Untersuchung metallischer Kontaminationen durchgeführt.

Als nächstes wurde der Schwerpunkt auf die Trenneigenschaften der GE gelegt, welche systematisch in Abhängigkeit verschiedener Parameter untersucht wurden. Hierzu wurde die Trennung eines DNA-Standards mit 5 Fragmenten unterschiedlicher Länge bei verschiedenen Trennbedingungen durch das Maß der Auflösung  $R$  charakterisiert. Die Wahl dieses Analytensystems erfolgte bereits vor dem Hintergrund, dass mittels der GE-ICP-MS Biopolymere qualitativ sowie quantitativ untersucht werden sollen.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Eigenschaften des Gels (Dimensionen, Art und Konzentration) den größten Einfluss auf die Trennleistung besitzen. Für die zu verwendenden Elektrolyte wurde zwar auch ein gewisser Einfluss festgestellt, jedoch bei weitem nicht in dem gleichen Maße. Es wurde demonstriert, wie durch Veränderung der Parameter eine optimierte Trennung erreicht werden kann, wobei darauf hinzuweisen ist, dass eine solche Optimierung natürlich für jede neue Art von Analyten durchzuführen ist.

Spezifische Qualitätsmaße der optimierten Trennung wurden errechnet und mit denen anderer Separationsmethoden verglichen. Danach ist die Trennleistung der GE als mittelmäßig zu beurteilen. Jedoch sind solche Vergleiche nur sehr bedingt aussagekräftig, da kein Informationsgehalt bezüglich spezieller Analyten einbezogen ist.

Die Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse wurde anhand der Migrationszeiten und der Signalintensitäten geprüft. Die Migrationszeiten in einem Gel zeigten sich über einen Zeitraum von 9 Messtagen als konstant mit einer relativen Standardabweichung von maximal 6%. Da das Trennmedium selbst hergestellt werden muss, war es sehr aufschlussreich, dass in unabhängig voneinander präparierten Gelen eine relative Standardabweichung von maximal 4% erreicht werden konnte, was für das entwickelte Vorgehen bei der Gel-Herstellung spricht. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten als Grundlage für die Zuordnung gelelektrophoretisch erhaltener Fraktionen zu bestimmten Verbindungen konnte an einem Beispiel erfolgreich demonstriert werden.

Bei der Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Signalintensität konnten mit Hinblick auf späteres quantitatives Arbeiten mit einer relativen Standardabweichung von maximal 3% sehr befriedigende Ergebnisse erzielt werden.

Dieses führte hin zu Untersuchungen bezüglich der Empfindlichkeit des entwickelten Systems. Eine Optimierung der GE-ICP-MS-Kopplung wurde durch die Bestimmung des geeigneten Elutionsmittels realisiert. Hierbei zeigte sich, dass mit verschiedenen Elutionsmitteln deutlich unterschiedliche Empfindlichkeiten erreicht werden konnten. Anhand dieser Optimierung lässt sich ein entscheidender Vorteil die GE gegenüber der HPLC hinsichtlich der Kopplung an das ICP-MS formulieren. Da, wie gezeigt, das Elutionsmittel bei der GE nur einen sehr geringen Einfluss auf die Trennleistung besitzt, kann es vor allem bezüglich der Ansprüche des ICP-MS ausgewählt werden. Anders bei der HPLC, da hier das Elutionsmittel einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Trennung besitzt, was für die Kopplung mit der ICP-MS häufig zu gravierenden Problemen führt.

Aufgrund des Mangels an geeigneten Standards exakt quantifizierter Biopolymere, wurde eine Kalibration mit Phosphat durchgeführt, um eine Nachweisgrenze für P-haltige Verbindung mit der GE-ICP-MS zu erhalten. Es konnte eine Nachweisgrenze für Phosphor von  $1 \text{ ng g}^{-1}$  bestimmt werden. Damit zeigt sich ein weiterer Vorteil der GE-ICP-MS gegenüber beispielsweise der CE-ICP-MS. Das mögliche Injektionsvolumen bei der GE-ICP-MS ist um einen Faktor 100-1000 höher als bei vergleichbaren kapillar-basierenden Kopplungstechniken. Damit ist es a priori möglich, wesentlich bessere relative Nachweisgrenzen zu erreichen, da es sich bei dem ICP-MS um einen massenfluss-empfindlichen und nicht um einen konzentrations-empfindlichen Detektor handelt.




### III Quantifizierung von DNA-Fragmenten

#### III.1 Die DNA und ihre Analytik

##### III.1.1 Einführung

Tagtäglich werden in den biochemischen Laboratorien quantitative Bestimmungen von DNA routinemäßig durchgeführt. Daher stellt sich die berechnete Frage, mit welcher wissenschaftlichen Legitimation eine neue analytische Methode hierfür etabliert werden soll. Wo liegt die Begründung für ein solches Unterfangen? Als Antwort, welche für sich selbst sprechen könnte, sei in Abbildung 32 der Auszug aus einem Zertifikat für ein zertifiziertes Referenzmaterial (IRMM-447: Genomische DNA) des *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) dargestellt.

**Abbildung 32: Auszug aus dem Zertifikat für das zertifizierte Standardreferenzmaterial IRMM-447**

	EUROPEAN COMMISSION JOINT RESEARCH CENTRE Institute for Reference Materials and Measurements	 Institute for Reference Materials and Measurements
<b>CERTIFIED REFERENCE MATERIAL IRMM-447</b>		
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
<b>Indicative Values</b>		
	Value <sup>1)</sup> [µg]	Uncertainty <sup>2)</sup> [µg]
Mass of genomic DNA per vial	1.1	0.7
<p>1) This value is the unweighted average of 3 sets of results, obtained by one procedure. The value is traceable to lambda DNA standard solutions, prepared according to the procedure described in reference [2]. The material must be reconstituted according to the specified procedure (see below).</p> <p>2) Estimated expanded uncertainty <math>U</math> with a coverage factor <math>k = 2</math>, corresponding to a level of confidence of about 95 %, as defined in the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO, 1995. Uncertainty contributions arising from characterisation as well as from homogeneity and stability assessment were taken into consideration.</p>		
Geel, December 2005		
	Signed: 	
	Prof. Dr. Hendrik Emons Unit for Reference Materials EC-JRC-IRMM Retieseweg 111 2440 Geel, Belgium	

Nun muss zunächst gesagt werden, dass dieses Referenzmaterial auf Identität und nicht auf Gehalt zertifiziert ist. Die Gehaltsangabe entspricht einem indikativen Wert. Doch selbst dabei fällt auf, dass die Unsicherheit in der Gehaltsbestimmung über 60% des bestimmten Werts entspricht. Hält man sich nun vor Augen, dass dieses Zertifikat vom IRMM ausgestellt wurde und dieses auf präzises und richtiges analytisches Arbeiten Wert legt, wie kaum ein anderes Forschungsinstitut, so liegt die Vermutung nahe, dass hinter dieser beträchtlichen Unsicherheit eine grundsätzliche Problematik sich verbirgt.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Validierung einer DNA-Quantifizierung erhältlich ist, obwohl verstärkte Bestrebungen in diese Richtung festzustellen sind. So betreibt das *National Institute of Standards and Technology* (NIST) seit Ende der 1990er Jahre eine Kampagne zur Herstellung und Charakterisierung eines solchen quantitativen DNA-Standards, wie unter anderem der Literatur zu entnehmen ist<sup>107,108,109</sup>. Bislang ist es aber nicht gelungen, präzise Resultate zu erzielen, vor allem dann nicht, wenn verschiedene Methoden zur Quantifizierung herangezogen wurden.

Es scheint also ein grundsätzliches Problem zu bestehen, einen Analyten präzise zu quantifizieren, welcher für die Bioanalytik von herausragendem Interesse ist. Über die Richtigkeit solcher Untersuchungen lassen sich noch nicht einmal Mutmaßungen anstellen.

Was die Ursache für diesen Sachverhalt sein könnte, weshalb eine DNA-Quantifizierung überhaupt notwendig ist und welche Methoden hier zum Einsatz kommen, davon soll im Folgenden die Rede sein, bevor die eigene Methode vorgestellt wird.

---

<sup>107</sup> DUEWER et. al. (2001) *J. Forensic Sci.* **46**, 1199

<sup>108</sup> KLINE et. al. (2003) *Anal. Chem.* **75**, 2463

<sup>109</sup> KLINE et. al. (2005) *J. Forensic Sci.* **50**, 571

### III.1.2 Aufbau der DNA

Bekanntermaßen wird die DNA („deoxyribonucleic acid“) konstituiert aus den vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, der Desoxyribose sowie Phosphat. Diese Bausteine zusammen bilden die Nukleotide, deren Aufbau in Abbildung 33 zu sehen ist.

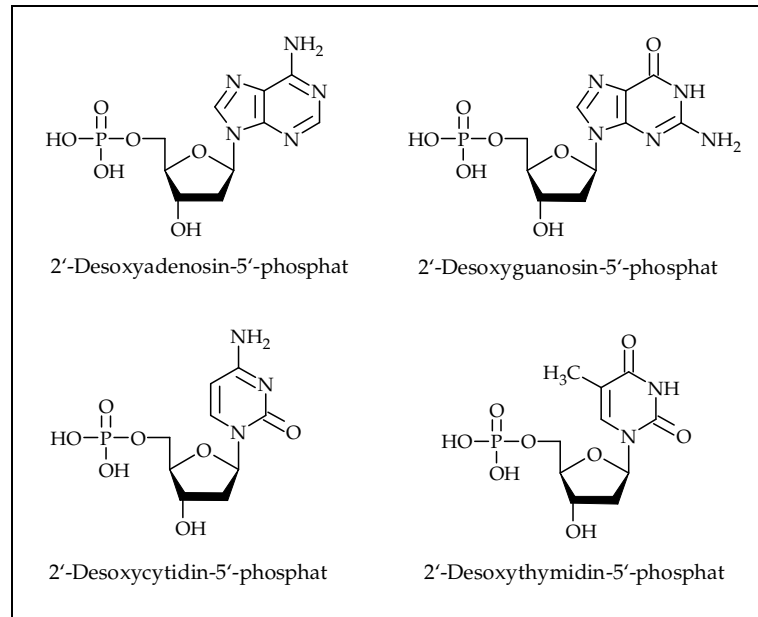


Abbildung 33: Die vier DNA-konstituierenden Nukleotide

Durch die Verknüpfung dieser Nukleotide über eine Phosphatester-Brücke zwischen dem C5 des einen Nukleotids mit dem C3 des anderen, können beliebig lange DNA-Einzelstränge entstehen.

Obwohl es sich bei der DNA um ein ubiquitär vorkommendes und außerordentlich bedeutsames Molekül handelt, wurde dessen genaue Struktur erst relativ spät erkannt. Watson und Crick stellten im Jahre 1953 ihre berühmte Hypothese auf, dass die DNA eine Doppelhelix, gebildet aus zwei Einzelsträngen mit komplementärer Basensequenz, darstellt. Der entscheidende Sachverhalt, welcher zu dieser Erkenntnis führte, war, dass in der DNA verschiedenster Organismen das Verhältnis Adenin zu Thymin sowie Guanin zu Cytosin stets eins zu eins war. Daraus resultierte die Annahme, dass zwei DNA-Einzelstränge durch Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin zusammen gehalten werden. In diesem komplementären Prinzip liegt der Grund dafür, warum die DNA als Träger der Erbinformationen fungieren kann.

Da in der Basensequenz des einen Einzelstrangs die Basensequenz des anderen bereits enthalten ist, kann dieses Prinzip zur Replikation der DNA genutzt werden, wobei jeder Einzelstrang als Matrize einer neuen doppelsträngigen DNA anzusehen ist. Der Doppelstrang kann sich von einer Seite teilweise aufwinden, woraufhin Enzyme entlang der Einzelstränge neue DNA synthetisieren. Der neue Strang enthält dann eine Sequenz, welche komplementär der Matrize gegenüber steht, also das Thymin dem Adenin und Cytosin dem Guanin. So entstehen schließlich aus dem Original zwei identische Kopien.

Das menschliche Genom enthält ungefähr  $3 \times 10^9$  Basenpaare und man geht davon aus, dass bei der Replikation unter normalen Bedingungen nur einmal in 10-100 Milliarden Basenpaaren ein Fehler auftritt.

Replikation alleine reicht jedoch noch nicht aus, um den genetischen Code zu beinhalten. Vielmehr müssen aus der Basensequenz heraus Proteine gebildet werden, wofür ein großer Teil der genomischen DNA verantwortlich ist. Die DNA fungiert jedoch nicht direkt als Matrize für die Proteinsynthese, sondern hier greift die chemisch instabilere RNA („ribonucleic acid“) ein. Im Unterschied zur DNA enthält diese anstatt der Desoxyribose die Ribose und anstatt des Thymins das Uracil. Die RNA bildet sich an der DNA in einem ähnlichen Prozess, wie dem eben beschriebenen.

Das bisher Gesagte lässt es nicht verwunderlich erscheinen, dass ein primäres Interesse bei der Untersuchung von DNA rein qualitativen Aspekten gewidmet ist. Die Analyse der Sequenzen, in welchen die einzelnen Nukleotide in einem DNA-Strang miteinander verknüpft sind, kann als eine der wichtigsten naturwissenschaftlichen Herausforderungen des letzten Jahrhunderts verstanden werden. Dieser „Entschlüsselung des genetischen Codes“ wurde in den letzten Jahrzehnten eine ungeheure Anstrengung gewidmet und fand seinen bisherigen Höhepunkt in der Entschlüsselung des menschlichen Genoms. Aber auch in der Routineanalytik von DNA liegt der Fokus überwiegend auf Sequenzanalysen, da hierin der eigentliche Informationsgehalt der DNA zu finden ist. Dies mag vielleicht ein Grund dafür sein, warum der Quantifizierung von DNA bislang nicht die Aufmerksamkeit zu Teil wurde, wie es eigentlich notwendig gewesen wäre. Denn die exakte Quantifizierung von DNA ist in vielen Bereichen von essentiell Interesse, was im folgenden Abschnitt genauer ausgeführt werden soll.

### III.1.3 Die Notwendigkeit zur Quantifizierung von DNA

Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, wenn alle Bereiche, in welchen eine DNA-Quantifizierung notwendig ist, ausführlich dargestellt werden würden. Hier soll nur ein Eindruck davon vermittelt werden, wie wichtig die quantitative Bestimmung von DNA für die moderne Bioanalytik ist, um zu verdeutlichen, warum Arbeiten auf diesem Gebiet überhaupt als sinnvoll zu erachten sind.

Als erstes muss hier all jene Analytik genannt werden, welche im Zusammenhang mit der so genannten Genexpression steht. Die Genexpression bezeichnet allgemein das Phänomen der Synthese von Proteinen aus der genetischen Information und wird durch mannigfaltige Prozesse in der Zelle realisiert. Diese Prozesse sind teils recht kompliziert, doch ist einer der ersten Schritte vom Gen hin zum Protein die Transkription. Hierbei wird aus einem bestimmten Gen die mRNA (messenger-RNA) gebildet, aus welcher wiederum in der Translation das Protein synthetisiert werden kann.

Die Produktion von mRNA kann also als ein Maß für die Aktivität eines bestimmten Gens angesehen werden und genau dieser Punkt ist für eine quantitative Analyse sehr interessant. Nun gestaltet sich die direkte Quantifizierung von RNA im Allgemeinen recht schwierig, da diese im Vergleich zur DNA chemisch sehr instabil ist. Daher wird für Untersuchungen der RNA dieselbe zunächst in die entsprechende cDNA (komplementär-DNA) überführt. Das hierzu eingesetzte Enzym Reverse Transkriptase erzeugt eine genaue Abschrift der RNA, jedoch auf der Basis der Bausteine der DNA. Die so gewonnene cDNA kann stellvertretend für die interessierende RNA qualitativ aber auch quantitativ untersucht werden. Für eben diesen Schritt ist eine Quantifizierung von DNA notwendig.

Es bleibt in diesem Zusammenhang noch zu ergänzen, dass natürlich die Untersuchung der Genaktivität ein Fundament bildet für die Molekularbiologie, die Genomanalyse sowie die klinische Forschung und Diagnostik. Zwei Beispiele sollen dies verdeutlichen. In der klinischen Diagnostik kann durch die Quantifizierung der Genaktivität in Tumorzellen eine Aussage darüber getroffen werden, wie die zukünftige Aktivität dieser Zellen zu prognostizieren ist und welche Maßnahmen daher zu ergreifen sind<sup>110</sup>. Hinsichtlich der Erforschung von erblich bedingten Krankheiten spielt die Untersuchung der Genaktivität in der Genomanalyse natürlicherweise eine entscheidende Rolle, nachdem erkannt wurde, dass nicht alleine die Existenz eines Gens

---

<sup>110</sup> SPECHT et. al. (2001) *Am. J. Pathol.* **158**, 419

ausschlaggebend für eine bestimmte Wirkung ist, sondern vielmehr das Zusammenspiel verschiedener aktiver Gene<sup>111</sup>.

Es wird vielleicht bereits hier deutlich, dass die Quantifizierung von DNA nicht als Teilbereich einer Außenseiterdisziplin zu sehen ist, sondern vielmehr als essentieller Bestandteil aktueller Forschungszweige verstanden werden muss.

Hieran schließt sich nahtlos ein weiterer Bereich an, in welchem eine Quantifizierung von DNA von außerordentlicher Wichtigkeit ist. Immer mehr wird die Genmodifizierung industriell eingesetzt, um Lebensmittel oder Medikamente mit besonderen Eigenschaften herzustellen. Genmodifizierte Organismen (GMO), worunter auch Pflanzen wie Mais und Soja zu verstehen sind, finden sich in einer Vielzahl von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln wieder. Über die Risiken dieser Genveränderung im Lebensmittelsbereich soll hier nicht diskutiert werden. Die Notwendigkeit zur strikten Regulation einer solchen Vorgehensweise drückt sich jedoch in einer recht aktuellen Verordnung der Europäischen Union aus, wonach Lebensmittel, welche mehr als 1% genveränderte Zutaten enthalten, als solche deklariert werden müssen<sup>112</sup>. Hierin liegt die Notwendigkeit zur DNA-Quantifizierung bereits begründet. Die Unterscheidung zwischen genmodifizierten und unmodifizierten Zutaten kann nur über die DNA erfolgen, da sich hierin solche Modifizierungen manifestieren. Eine reine Unterscheidung reicht in diesem Zusammenhang jedoch nicht aus, da auch eine quantitative Aussage getroffen werden muss. So müssen etwaige modifizierte Bestandteile exakt quantifiziert werden, um solche Verordnungen, wie die genannte, durchsetzen zu können und überhaupt Kontrollen der Gentechnik zu ermöglichen.

Als abschließendes Beispiel für die Relevanz einer exakten DNA-Quantifizierung sei hier eine Anwendung aufgeführt, wo die aktuelle Situation bezüglich der DNA-Quantifizierung deutlich und paradox zugleich erscheint. Die Rede ist hier von der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Diese mit einem Nobelpreis gewürdigte Technik hat die Molekularbiologie revolutioniert wie kaum eine andere Methode. Mittels der PCR ist es möglich, DNA-Fragmente gezielt zu vervielfältigen (amplifizieren), wodurch die Analyse kleinster DNA-Mengen – bis zu einem DNA-Molekül – ermöglicht wird. Der Amplifizierungsprozess in der PCR wird jedoch auch dazu genutzt, um die Ausgangsmenge an DNA zu quantifizieren, was durch eine Extrapolation aus den Daten der Amplifizierung erreicht werden kann. Paradox in diesem Zusammenhang erscheint jedoch die Tatsache, dass grundlegende Mechanismen in der für eine

---

<sup>111</sup> TRAPMANN et. al. (2004) *Accred. Qual. Assur.* **9**, 695

<sup>112</sup> EUROPEAN COMMISSION (2000) *Official Journal L* **006**, 13

Quantifizierung extrem wichtigen Anfangsphase der PCR noch überhaupt nicht geklärt sind. Hierfür müssten entweder kleinste DNA-Mengen mittels einer anderen Methode exakt quantifiziert werden, oder es müsste zumindest ein exakt quantifizierter DNA-Standard für eine externe Kalibration zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend für diese knappe Darstellung kann also gesagt werden, dass die Quantifizierung von DNA als eine primäre Herausforderung für die moderne Bioanalytik anzusehen ist und auch in absehbarer Zukunft eine Schlüsselposition einnehmen wird.

### III.1.4 Methoden zur DNA-Quantifizierung

Der aktuelle Stand der Methodologie zur quantitativen Bestimmung von DNA stellt sich sehr vielfältig dar. Der überwiegende Teil basiert auf UV-spektroskopischen und Fluoreszenz-spektroskopischen Messungen, wobei die Routineanalytik von DNA ausschließlich durch diese Methoden bestritten wird<sup>113,114</sup>. Die Kombination dieser Detektionsarten mit anderen, molekularbiologischen Methoden – wie beispielsweise der Realtime-PCR (RT-PCR) - darf nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, dass der Schritt der Quantifizierung immer und ausschließlich auf spektroskopischen Messungen beruht.

Auf der Seite der analytischen Forschung und Entwicklung existieren dagegen Bestrebungen andere Methoden zur Quantifizierung von DNA einzusetzen. Hierbei kommt der Massenspektrometrie die wichtigste Bedeutung zu, aber auch andere spektroskopische Methoden wie die AAS oder die NMR werden verstärkt auf diesem Gebiet eingesetzt.

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Techniken aus beiden Bereichen, der Routineanalytik sowie der aktuellen Forschung, in aller Kürze dargestellt werden.

---

<sup>113</sup> NICKLAS und BUEL (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 1160

<sup>114</sup> DING und CANTOR (2004) *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 1

Die älteste und immer noch am weitesten verbreitete Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA ist die UV-Spektroskopie. Hierbei wird eine starke UV-Absorption der DNA bei 260 nm ausgenutzt. Diese wird durch die Purin- und Pyrimidin-Basen in den Nukleotiden hervorgerufen, welche folgende Absorptionsmaxima aufweisen:

- Adenin (als dAMP): 259 nm
- Guanin (als dGMP): 252 nm
- Cytosin (als dCMP): 271 nm
- Thymin (als dTMP): 267 nm

Es hat sich eingebürgert für die Angabe der DNA-Konzentration in einer unkontaminierten Probe einen OD-Wert anzugeben. Der OD-Wert entspricht der Extinktion einer Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm. Konventionsgemäß entspricht ein OD-Wert von 1 einer Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  doppelsträngiger DNA (dsDNA) oder  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  einzelsträngiger DNA (ssDNA).

Die Konzentrationsbestimmung von DNA mittels der UV-Spektroskopie ist mit vielerlei Problemen behaftet. Zum einen gewährleistet die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm nur eine sehr eingeschränkte Selektivität für DNA. So können auch Proteine oder Reagenzien, welche zur DNA-Aufreinigung verwandt werden, wie beispielsweise Phenol, zu einer Absorption bei dieser Wellenlänge beitragen. Dieses kann zu stark verfälschten Ergebnissen bei einer Quantifizierung führen. Weiterhin kann mittels der UV-Spektroskopie keine Unterscheidung zwischen dsDNA, ssDNA und RNA vorgenommen werden, da kein unterschiedliches Absorptionsverhalten vorliegt.

Als ebenfalls problematisch kann die Tatsache angesehen werden, dass für die praktische Durchführung der UV-Spektroskopie ein relativ hohes Probenvolumen notwendig ist, was gerade bei molekularbiologisch interessanten Proben selten der Fall ist.

Schlussendlich bietet die UV-Spektroskopie für die Untersuchung von DNA nur eine sehr mäßige Empfindlichkeit, welche in den meisten Fällen nicht ausreicht, um eine quantitative Bestimmung durchzuführen. Als Nachweisgrenze für dsDNA findet sich in der Literatur ein Wert von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Auch aus diesem Grund wird die UV-Spektroskopie in der Regel nur für die Gesamtbestimmung von DNA verwendet und nicht für eine Quantifizierung verschiedener DNA-Fragmente in eine Probe nach der entsprechenden Trennung.



Wesentlich empfindlicher und daher die Standardmethode zur längenabhängigen Quantifizierung von DNA ist die Messung der Fluoreszenz nach Behandlung der DNA mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen. Die klassische Variante dieser Technik geht über die Verwendung von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und so zu einer Fluoreszenzverstärkung um den Faktor 100 beitragen kann. Die Natur der Interkalation erlaubt die Unterscheidung von dsDNA und ssDNA, erfasst jedoch dsDNA und RNA in gleichem Maße. Bei der Verwendung von Ethidiumbromid als Interkalationsreagenz können Nachweisgrenzen für dsDNA von  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  erreicht werden.

Sowohl Empfindlichkeit als auch Selektivität der Fluoreszenzdetektion können um ein Wesentliches gesteigert werden durch die Verwendung neu entwickelter Fluoreszenzfarbstoffe, wie PicoGreen© oder OliGreen©. Diese Fluoreszenzfarbstoffe der neuen Generation erlauben das Erreichen von Nachweisgrenzen für dsDNA von  $25 \text{ pg mL}^{-1}$ . Weiterhin ist die Fluoreszenzverstärkung dieser Farbstoffe für dsDNA um ein Vielfaches höher als für ssDNA oder RNA, woraus die höhere Selektivität resultiert.

Ein weitere Steigerung dieser beiden Faktoren, Selektivität und Empfindlichkeit, kann erreicht werden durch die Anwendung der RT-PCR. Diese hochinteressante und sehr populäre Technik erlaubt die Bestimmung kleinster DNA-Mengen mit höchster Spezifität, da der entscheidende Schritt der Amplifikation sequenz-spezifisch funktioniert<sup>115</sup>.

Was jedoch selbst bei der Anwendung der RT-PCR nicht realisiert werden kann, ist eine präzise und vor allem richtige Quantifizierung von DNA. Der Grund dafür liegt in der einfachen Tatsache begründet, dass alle Fluoreszenzmessungen (auch in der RT-PCR) auf der Kalibration mit einem externen Standard beruhen, welcher wiederum durch die UV-Spektroskopie charakterisiert wurde<sup>116</sup>. So ausgefeilt die modernen biochemischen Methoden der DNA-Quantifizierung auch sein mögen, so müssen zum jetzigen Zeitpunkt Zweifel an der Richtigkeit der Analysenergebnisse bleiben, da keine Rückführbarkeit auf definitive Analysenmethoden besteht.

Vor allem aus diesem Grund besteht der sichtbare Trend andere analytischen Methoden anzuwenden, um eine präzise und richtige Quantifizierung von DNA zu gewährleisten. Einige Beispiele hierfür sollen im Folgenden genannt und kurz beschrieben werden.

---

<sup>115</sup> TAVERNIERS et. al. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1198

<sup>116</sup> BUSTIN et. al. (2005) *J. Mol. Endocrinol.* **34**, 597

Cavaluzzi und Borer beschreiben beispielsweise den Einsatz der  $^1\text{H}$ -NMR zur präzisen Quantifizierung von einzelnen Nukleotiden sowie ssDNA und RNA<sup>117</sup>. Diese Methode geht von einem Vergleich der erhaltenen Protonen-Signale in den Nukleotiden mit einem exakt quantifizierten internen Standard aus. Die Präzision dieser Methode zeigt mit einem RSD von 2-3% durchaus einen Fortschritt im Vergleich zu den beschriebenen Fluoreszenz-spektroskopischen Methoden. Jedoch muss angemerkt werden, dass diese Präzision nur bei sehr konzentrierten Proben ( $> 1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) erreicht werden konnte. Zudem müssen für die NMR-Messungen relativ große Probenmengen zur Verfügung stehen, um erfolgreiche Messungen durchführen zu können. Weiterhin spielt die Reinheit der Probe eine entscheidende Rolle für die richtige Quantifizierung mittels der H-NMR, da es durchaus zu Überlagerungen der Signale von Analytprotonen mit Protonen aus verunreinigenden Verbindungen kommen kann. Prinzipiell kann dieser Methode jedoch ein Potential für die Zukunft zugesprochen werden, wobei Untersuchungen hinsichtlich der Richtigkeit zwingend notwendig wären.

Unter dem Gesichtspunkt der Richtigkeit sehr interessant und viel versprechend zeigt sich eine Methode, welche von O'Connor et. al. entwickelt wurde<sup>118,119</sup>. Zur quantitativen Bestimmung eines Oligonukleotids (20-mer) als Testsubstanz wurde dieses zunächst enzymatisch in die einzelnen Nukleotide und in einem weiteren Schritt in die Nukleoside zerlegt. Diese vier verschiedenen Nukleoside konnten nun mittels der LC quantitativ voneinander getrennt und mittels der ESI-MS detektiert werden. Der Schritt der Quantifizierung erfolgte über die massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA), wobei auf  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  angereicherte Standard-Nukleoside zum Einsatz kamen. Hierdurch ist es möglich, sehr präzise und richtig zu quantifizieren, da die isotopen-angereicherten Substanzen als nahezu perfekter interner Standard anzusehen sind. Durch die Anwendung dieser Methode konnten O'Connor sehr präzise Messergebnisse erzielen (RSD  $< 1\%$ ) und die MSIVA sollte bei adäquater Umsetzung ein Garant für die Richtigkeit sein. Eingeschränkt wird die Anwendbarkeit dieser Methode durch die Voraussetzung, dass für eine Quantifizierung die genaue Sequenz des entsprechenden DNA-Fragments bekannt sein muss.

Dieses Problem kann umgangen werden, wenn für die quantitative Analyse von DNA-Fragmenten ein anderes strukturelles Merkmal dieser Verbindungen herangezogen wird. Die Rede ist von dem Phosphorsäure-Diester-Glied zwischen den einzelnen Nukleosiden. Da pro enthaltener Base immer ein

---

<sup>117</sup> CAVALUZZI et. al. (2002) *Anal. Biochem.* **308**, 373

<sup>118</sup> O'CONNOR et. al. (2002) *Anal. Chem.* **74**, 3670

<sup>119</sup> DONALD et. al. (2005) *J. Chromatogr. B* **817**, 173

Phosphat in dem Fragment enthalten sein muss, kann bei bekannter Länge des Fragments über den Phosphatgehalt eine sehr präzise Quantifizierung durchgeführt werden. Das Phosphat kann entweder durch chemischen Aufschluss oder durch enzymatischen Verdau aus der DNA freigesetzt werden. Diese Tatsache wurde schon sehr früh erkannt und diente als Grundlage für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide in der UV-Spektroskopie<sup>120</sup>. Aber auch in der aktuelleren Literatur finden sich Beispiele für eine colorimetrische Analyse des Phosphat-Gehalts, um quantitative Aussagen über DNA-Fragmente zu treffen<sup>121</sup>.

Ebenfalls den in der DNA enthaltenen Phosphor nutzend, wurden in jüngster Zeit Methoden entwickelt, welche die ICP-OES als Detektor für eine quantitative Bestimmung von DNA-Fragmenten bzw. Nukleotiden einsetzen<sup>122,123</sup>. Ein solches Vorgehen kann durchaus als eine neue Dimension in der quantitativen DNA-Analyse verstanden werden, da hier erstmals die Atomspektroskopie für solcherlei Analysen herangezogen wird. Das Potential dieser Methoden wird eindrucksvoll demonstriert, unter anderem im Vergleich zur Fluoreszenz-spektroskopischen Messungen hinsichtlich Präzision und Richtigkeit. Es verwundert daher nicht, dass die Verwendung der ICP-OES vorgeschlagen wird für die Charakterisierung eines zertifizierten Referenzmaterials für quantitative DNA-Bestimmungen<sup>124</sup>.

Die ICP-MS wurde zwar noch nicht zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden angewandt, jedoch im sehr verwandten Feld der Quantifizierung von DNA-Addukten<sup>125</sup>. Hier wird ebenfalls der enthaltene Phosphor als Anhaltspunkt für eine Quantifizierung genutzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche unterschiedliche Methoden für die Quantifizierung von DNA einsetzbar sind. Hinsichtlich der Präzision und vor allem der Richtigkeit der Analysenergebnisse sind jedoch viele dieser Methoden als äußerst fragwürdig einzustufen. Augenscheinlich kann den auf massenspektrometrischen und atomspektroskopischen Techniken beruhenden Methoden das höchste Potential für eine umfassende DNA-Quantifizierung zugesprochen werden.

---

<sup>120</sup> CHARGAFF und ZAMENHOF (1948) *J. Biol. Chem.* **173**, 327

<sup>121</sup> MURPHY und TRAPANE (1996) *Anal. Biochem.* **240**, 273

<sup>122</sup> YANG et. al. (2004) *Anal. Biochem.* **335**, 150

<sup>123</sup> ENGLISH et. al. (2006) *Anal. Chem.* **78**, 4630

<sup>124</sup> HOLDEN et. al. (2007) *Anal. Chem.* DOI: 10.1021/ac061463b

<sup>125</sup> EDLER et. al. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 205

### III.2 Experimentelles Vorgehen

Grundsätzlich wurden für eine Quantifizierung von DNA zwei Strategien verfolgt.

- i. Die Bestimmung des gesamten Phosphorgehalts in einer Probe mittels Fließinjektion in das ICP-MS durch Standardaddition und Rückschluss auf die darin enthaltene Menge an Gesamt-DNA.
- ii. Die Quantifizierung einzelnen DNA-Fragmente mittels der GE-ICP-MS über externe Kalibration mit einem quantifizierten DNA-Standard.

Das Vorgehen nach (ii) schließt direkt an die Untersuchungen im ersten Teil dieser Arbeit an und bedarf keiner weiteren Erläuterungen hinsichtlich des experimentellen Vorgehens. Doch bildet die Grundlage für eine so gestaltete Untersuchung die Methode nach (i).

Wie aus den Ausführungen in der Einleitung zu diesem Teil hervorgegangen sein sollte, besteht ein Mangel an verlässlichen DNA-Standards zur Quantifizierung, auch wenn solches seitens der Hersteller propagiert wird. Um diese Standards dennoch für eine Quantifizierung sinnvoll einsetzen zu können, musste eine Methode entwickelt werden, wie diese möglichst präzise quantitativ charakterisiert werden können. Dieses wurde hier durch die Bestimmung des Gesamtgehalts an Phosphor in den Standards realisiert.

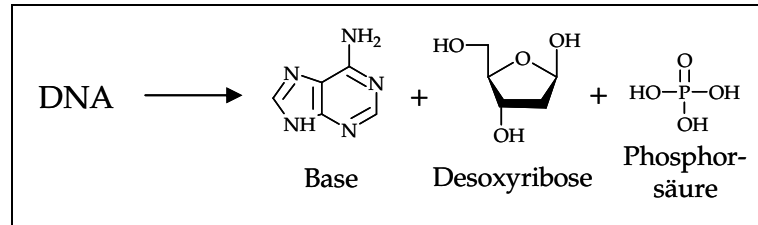
Dieses Vorgehen ist jedoch an mehrere Voraussetzungen gebunden.

Zunächst muss sichergestellt sein, dass in der Probe keine weiteren P-haltigen Verbindungen außer den DNA-Fragmenten vorhanden sind. Dieses würde zu einem Überbefund an DNA in der Probe führen, da durch die Analyse mit dem ICP-MS alle P-haltigen Verbindungen ohne Unterschied erfasst werden. Zu diesem Zweck kann die entwickelte GE-ICP-MS hilfreich eingesetzt werden.

Weiterhin muss gewährleistet sein, dass die Analyten sich im Detektor genauso verhalten wie das Bezugsreagenz, welcher bei der Standardaddition hinzugesetzt wird. Im konkreten Fall sollte also die Empfindlichkeit für den Phosphor in den DNA-Fragmenten die gleiche sein, wie für den Phosphor in der addierten Standardlösung, in welcher Phosphat enthalten ist. Da dieses nicht sicher gewährleistet werden kann, worüber an anderer Stelle noch diskutiert werden wird, muss ein anderer Weg gefunden werden, um eine Standardaddition zu realisieren.

Durch eine Hydrolyse der DNA-Fragmente könnte der darin enthaltene Phosphor als Phosphat freigesetzt werden, was als ideale Ausgangslösung für eine Standardaddition mit Phosphat anzusehen wäre. Diese Hydrolyse kann bewerkstelligt werden durch den Zusatz einer starken Säure und

Wärmeeinwirkung. Bei einer solchen Reaktion wird die DNA in die einzelnen Bausteine zerlegt (Base, Zucker, Phosphat), wie es in Abbildung 34 dargestellt ist.



**Abbildung 34: Hydrolyse und Hydrolyseprodukte der DNA unter Einwirkung einer starken Säure**

Konkret wurde diese Hydrolyse im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführt mit konzentrierter Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>).

### Hydrolyse von DNA mit Perchlorsäure

- I. Zusatz von 50 µL 70%iger HClO<sub>4</sub> zu 50 µL der entsprechenden DNA-Lösung
- II. Erhitzen dieser Lösung auf 90°C für 1 Stunde
- III. Verdünnung mit MilliQ-H<sub>2</sub>O auf die beabsichtigte Endkonzentration

Die Phosphat-Konzentration der so erhaltenen hydrolysierten DNA-Lösung wurde durch Standardaddition bestimmt. Dieses hat gegenüber der externen Kalibration mit einem Phosphat-Standard den Vorteil, dass keine Matrixanpassung stattfinden muss, da diese bereits in der Standardaddition inbegriffen ist.

Die erhaltenen Werte für den Phosphat-Gehalt können umgerechnet werden in die entsprechende Konzentration an DNA in der Probe. Diese Umrechnung basiert auf der Tatsache, dass in der DNA  $9,47 \pm 0,01$  Gew.-% Phosphor enthalten sind. Die Berechnung hierfür erfolgt über die molekularen Massen der Nukleotid-Paare (AT: 653,4 g mol<sup>-1</sup>; GC: 654,4 g mol<sup>-1</sup>) und die darin immer enthaltenen Masse der beiden Phosphoratome im Phosphat.

### III.3 Ergebnisse der DNA-Quantifizierung

#### III.3.1 Quantifizierung über den Phosphor-Gehalt

Als erstes seien hier die Ergebnisse der Charakterisierung eines quantitativen DNA-Standards präsentiert. Dieser DNA-Standard enthält 5 Fragmente der Längen 100, 200, 500, 700 und 1000 bp und wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit zum Einsatz gebracht. Zusätzlich zu dieser Identitätsbeschreibung enthält die Charakterisierung dieses Standards aber auch noch eine quantitative Information bezüglich der Mengen der einzelnen Fragmente. Er soll daher speziell für die Quantifizierung von DNA-Fragmenten einsetzbar sein.

In Abbildung 35 ist die Trennung und Detektion dieses Standards mittels der GE-ICP-MS unter optimierten Bedingungen dargestellt. Mit angegeben sind die absoluten Mengen der einzelnen DNA-Fragmente, wie sie laut der Herstellerinformation unter den gegebenen Bedingungen enthalten sein sollten.

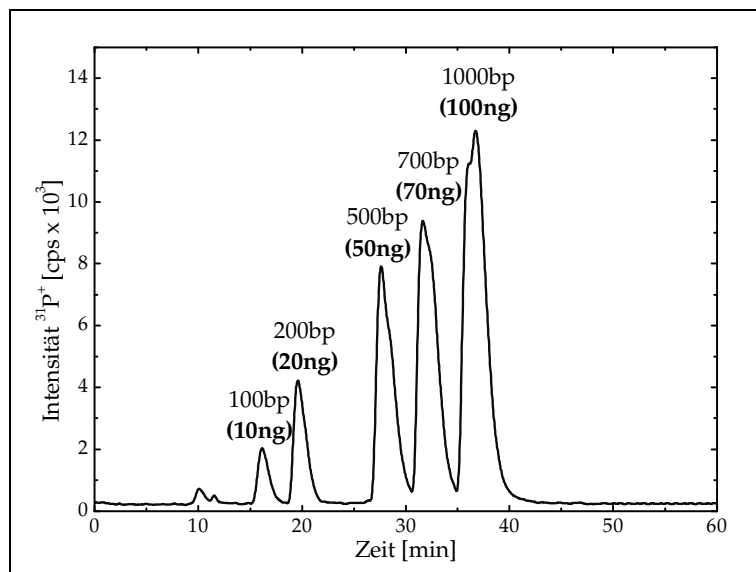


Abbildung 35: Elektrophoretische Trennung von 5 DNA-Fragmenten definierter Menge<sup>126</sup>

Um nun die gegebenen quantitativen Informationen mittels der avisierten Methode der Bestimmung des Gesamtgehalts an Phosphor durchführen zu können, müssen zwei Voraussetzungen aus diesem Elektropherogramm heraus ermittelt werden. Zum einen darf in dem Standard keine weitere P-haltige Verbindung außer den 5 DNA-Fragmenten enthalten sein und zum anderen

<sup>126</sup> Gel: 36x2,2 mm, 1,8% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=200V

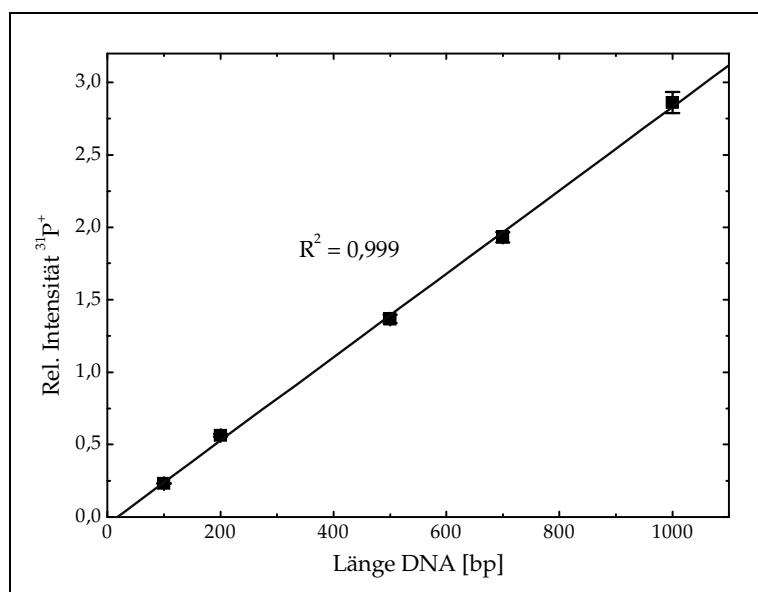
müssen die quantitativen Relationen der einzelnen DNA-Fragmente untereinander die absolute Mengenangabe widerspiegeln.

Der erste Punkt lässt sich relativ leicht durch die Analyse der in dem Elektropherogramm auftauchenden Fraktionen durchführen. Ein solches Vorgehen ist jedoch an eine Prämisse gebunden. Das experimentelle Vorgehen bei der Elektrophorese dieses DNA-Standards bedingt, dass nur P-haltige Verbindungen mit einer negativen Ladung erfasst werden können. Positiv geladene Moleküle würden in der Elektrophorese in die entgegengesetzte Richtung wandern und damit für eine Detektion mit dem ICP-MS nicht mehr zur Verfügung stehen. Bei ungeladenen Teilchen verhält es sich ähnlich, nur dass diese überhaupt nicht im elektrischen Feld wandern würden. Nun lässt sich das gewählte Vorgehen trotzdem durch zweierlei legitimieren. Zum einen ist die Anwesenheit von positiv geladenen oder neutralen Phosphorspezies in einem DNA-Standard nicht zu erwarten. Zum anderen würde das Auftreten solcher Verbindungen einen Mehrbefund an DNA in der Probe gegenüber der Herstellerangabe erbringen, was, wie sich noch zeigen wird, nicht der Fall ist.

Zu erwartende Verunreinigungen in einer DNA-Lösung wären Phosphat, einzelne Nukleotide oder kleinere DNA-Fragmente. Diese sollten eine höhere Migrationsgeschwindigkeit besitzen als die definierten DNA-Fragmente und damit in dem Elektropherogramm vor diesen auftauchen. Und tatsächlich lässt sich aus Abbildung 35 ersehen, dass eine minimale Verunreinigung bei einer Migrationszeit von 10 min aus der Elektrophorese eluiert. Hierbei wird es sich wahrscheinlich um freies Phosphat handeln, welches durch die Zersetzung der DNA-Fragmente entstehen kann. Im Vergleich zu der Menge der DNA-Fragmente stellt sich diese Verunreinigung jedoch als verschwindend gering dar (<0,01%) und stellt daher kein Hindernis für die beabsichtigten Untersuchungen dar.

Den zweiten Nachweis, welchen es zu erbringen gilt, dass nämlich die DNA-Mengen der einzelnen Fragmente die Äquimolarität widerspiegeln, kann nur eine genauere Analyse der erhaltenen Daten bringen.

Es liegt in der Natur der DNA, dass mit steigender Länge der Gehalt an Phosphor proportional ansteigt. Diese Tatsache kann hier hilfreich genutzt werden, da die Detektion mit dem ICP-MS nur eine Aussage über den enthaltenen Phosphor erlaubt. Bei Äquimolarität müsste demnach die Intensität des P-Signals in Abhängigkeit von der Länge der DNA linear ansteigen, was als nächstes geprüft werden soll.



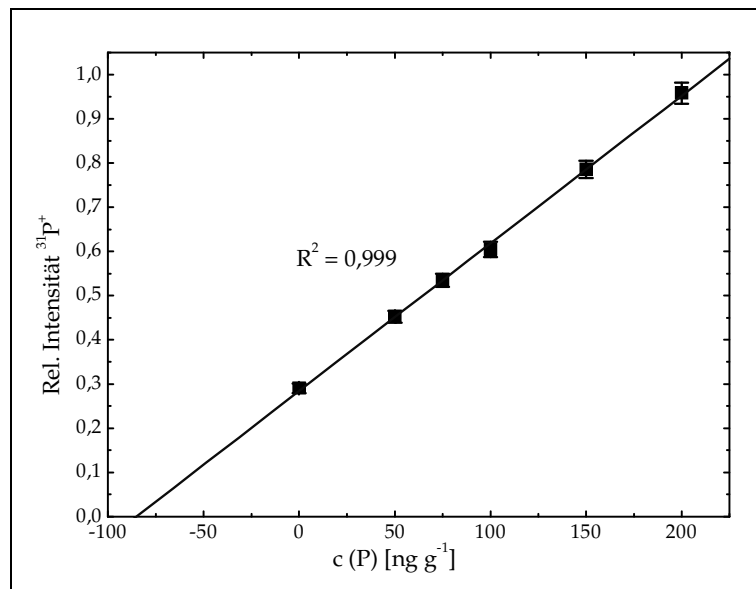
**Abbildung 36: Abhängigkeit der Signalintensität für  $^{31}\text{P}^+$  von der Länge der DNA-Fragmente (n=3)**

Zu diesem Zweck wurde die Signalintensität für  $^{31}\text{P}^+$  in Abhängigkeit von der Fragmentlänge ermittelt, was in Abbildung 36 zu sehen ist. Die so ermittelte Abhängigkeit zeigt eine hervorragende Linearität ( $R^2 = 0,999$ ) und könnte als Beweis für die Äquimolarität der einzelnen DNA-Fragmente dienen. Doch muss dies kritisch diskutiert werden. Voraussetzung für einen solchen Beweis wäre, dass die Detektor-Empfindlichkeit für Phosphor unabhängig von dem Elutionszeitpunkt sowie der chemischen Form, in diesem Fall der Länge des jeweiligen DNA-Fragments, ist. Ersteres ist gewährleistet durch den isokratischen Elutionsmodus der GE und wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit als großer Vorteil der entwickelten Methode hervorgehoben. Letzteres lässt sich leider nur sehr schwer nachweisen. Wie bereits erwähnt, wurden bislang noch keine systematischen Untersuchungen bezüglich des Verhaltens solch großer Moleküle ( $> 60$  kDa) in den die Empfindlichkeit bestimmenden Bereichen der ICP-MS (Zerstäubersystem, Plasma) durchgeführt. Grundlage hierfür wären nämlich gerade exakt quantifizierte Standardsubstanzen, deren Fehlen Begründung für die hier angestrebten Untersuchungen ist. Die Linearität der untersuchten Abhängigkeit lässt jedoch die begründete Vermutung zu, dass zumindest in dem Bereich zwischen 100 und 1000 bp keine veränderten Empfindlichkeiten für die Phosphor-Detektion zu berücksichtigen sind. So könnte es als sehr unwahrscheinlicher Zufall betrachtet werden, wenn mögliche Abweichungen von Äquimolarität durch ein unterschiedliches Verhalten der Analyten im ICP-MS ausgeglichen werden würden. Daher soll hier die Äquimolarität als Tatsache postuliert werden, auch wenn eine gewisse Unsicherheit diesbezüglich besteht.



Nun, da beide Voraussetzungen für die quantitative Charakterisierung des DNA-Standards diskutiert und als erfüllt betrachtet wurden, sollen die Ergebnisse dieser Untersuchung präsentiert werden.

Der DNA-Standard wurde in 4 Aliquote aufgeteilt, wovon 3 nach der beschriebenen Methode hydrolysiert wurden. Die anschließende Verdünnung erfolgte so, dass eine theoretische, auf der Herstellerangabe basierende Endkonzentration für Phosphat von  $100 \text{ ng g}^{-1}$  erreicht wurde. Alle drei Aufschlüsse wurden unabhängig voneinander mittels der Standardaddition quantifiziert. Für den Aliquot 1 ist stellvertretend das Resultat dieser Standardaddition in Abbildung 37 gezeigt.



**Abbildung 37: Standardaddition hydrolysierter DNA-Fragmente mit Phosphat**

Es ist gut zu erkennen, dass die Kalibrationsfunktion ein hohes Maß an Linearität aufweist, was für das Funktionieren der angewandten Methode spricht. Viel interessanter ist aber, dass der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse weit ab von dem nach der Herstellerangabe zu erwartendem Wert von  $-100 \text{ ng g}^{-1}$  liegt. Es wird also weniger Phosphat gefunden, als nach den angegebenen Mengen an DNA enthalten sein müsste. Fundiert wird diese Erkenntnis durch die Auswertung der 3 Vergleichsmessungen, deren Resultate in Tabelle 20 unter Einbeziehung des 95%iger Konfidenzintervalls wiedergegeben sind.

Tabelle 20: Vergleichsmessungen zur Bestimmung des Phosphorgehalts in DNA-Hydrolysaten mit Angabe des Konfidenzintervalls  $X_{95}$

Aliquot Nr.	c (P) [ng g <sup>-1</sup> ]	$X_{95}$ [ng g <sup>-1</sup> ]
1	85,1	77,4-93,8
2	86,2	79,1-95,4
3	83,8	76,5-92,7

Zunächst fällt auf, dass trotz einer hohen Linearität für alle 3 Kalibrationsfunktionen ( $R^2 \geq 0,998$ ) ein recht großes Konfidenzintervall anzugeben ist. Dieses liegt aber in der Natur einer Standardaddition, da es sich hier letztendlich um eine Extrapolation handelt. Wird als statistisches Maß jedoch die relative Standardabweichung des Mittelwerts aus den 3 Vergleichsmessungen zugrunde gelegt, so kann von einer sehr präzisen Gehaltsbestimmung gesprochen werden. Als deren Ergebnis soll daher formuliert werden, dass ein Phosphorgehalt von **(85 ± 1) ng g<sup>-1</sup> Phosphor** in der Probe gefunden wurde.

Rückbezogen auf die Angabe des Herstellers bedeutet dies, dass nur **(85 ± 1) %** der angegebenen Menge an DNA in dem Standard enthalten ist. Die Darstellung in Abbildung 35 ist daher um den Faktor 0,85 zu korrigieren, woraus sich die Werte in Tabelle 21 ergeben.

Tabelle 21: Korrigierte DNA-Mengen nach Abbildung 35

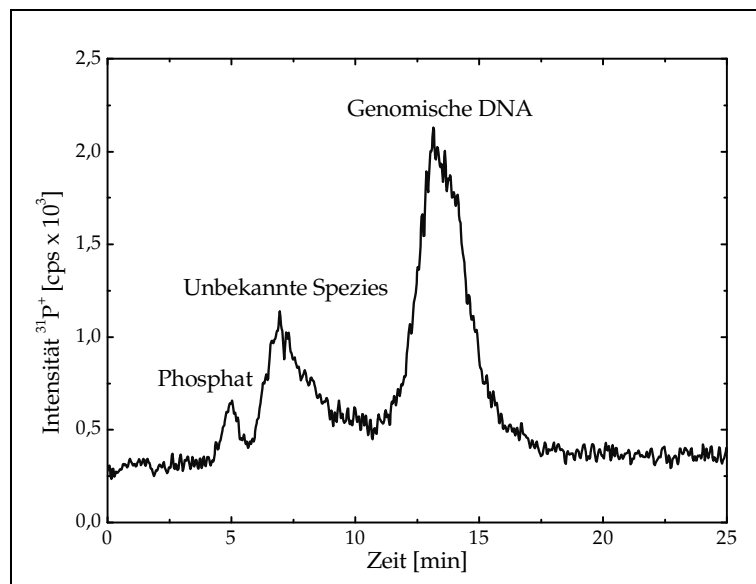
Fragmentlänge	m (DNA) [ng] nominal	m (DNA) [ng] korrigiert
100 bp	10	8,5 ± 0,2
200 bp	20	17,0 ± 0,4
500 bp	50	42,5 ± 1,0
700 bp	70	59,5 ± 1,4
1000 bp	100	85,0 ± 2,0

Wird das Vorgehen bis zu diesem Punkt aus analytischer Sicht als legitim erachtet, so entsprechen die korrigierten Werte dem wahren Gehalt in der Probe eher, als die der Hersteller. Mittels dieser korrigierten Werte sollte es nun möglich sein, diesen DNA-Standard zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten in anderen Proben heranzuziehen, wie es im nächsten Abschnitt besprochen werden wird.

Bevor jedoch dazu übergegangen wird, soll die entwickelte Methode der Gesamtbestimmung von Phosphor an zwei weiteren DNA-Standards erprobt werden. Hierbei handelt es sich um die bereits erwähnten zertifizierten Standardreferenzmaterialien IRMM-447 und IRMM-449, welche als Ausgangspunkt für die hier getätigten Untersuchungen dienen.

Bei beiden Materialien handelt es sich um genomische DNA unterschiedlicher Herkunft. IRMM-447 wurde aus dem Bakterium *Listeria Monocytogenes* isoliert, IRMM-449 aus dem Bakterium *Escherichia coli* oder einfach *E. coli*. Beide DNA-Stränge enthalten mehr als 2000 kbp, sind dementsprechend wesentlich größer als die bisher untersuchten DNA-Fragmente. Für die Untersuchungen in diesem Zusammenhang spielt dies jedoch keine große Rolle, da eine Quantifizierung erst nach der Hydrolyse stattfindet.

Zunächst muss wieder sichergestellt werden, dass in den Referenzmaterialien keine anderen P-haltigen Verbindungen zu finden sind, als die genomische DNA. Hierfür wurde mittels der GE-ICP-MS eine Untersuchung angestellt, deren Resultat stellvertretend für das IRMM-449 (Charge Nr. 005) in Abbildung 38 dargestellt ist.



**Abbildung 38: Elektropherogramm des zertifizierten Referenzmaterials IRMM-449<sup>127</sup>**

<sup>127</sup> Gel: 15x2,2 mm, 0,6% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 5  $\mu\text{L}$ ; U=200V

Wie man deutlich erkennen kann, ist die Elution von drei P-haltigen Spezies zu beobachten. Die dominante Fraktion bei einer Migrationszeit kann als die genomische DNA identifiziert werden, da das Migrationsverhalten sehr gut mit dem in der Literatur beschriebenen (Platten-GE) übereinstimmt<sup>128</sup>. Über einen Vergleich der Migrationszeiten konnte die erst eluierende als Phosphat identifiziert werden.

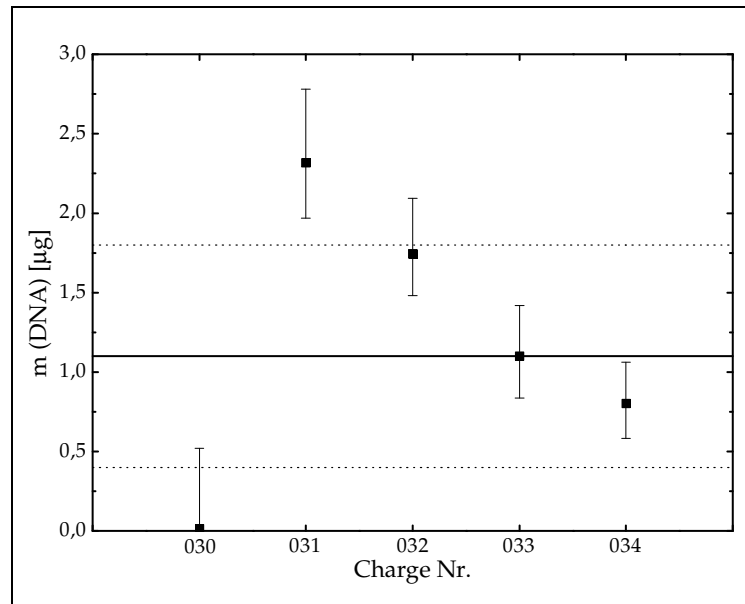
Über die zweite, im Vergleich dazu größere Fraktion, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Es könnte sich hierbei um Bruchstücke der genomischen DNA handeln, wofür die Migrationszeit sowie die recht breite Verteilung sprechen würde. Eine weitere Vermutung wäre, dass diese Fraktion die einzelsträngige Form der genomischen DNA enthält. Eine Identifizierung konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Wie auch immer, es kann also nicht gesagt werden, dass die genomische DNA die einzige P-haltige Spezies in den Referenzmaterialien ist. Daher müsste bei deren Quantifizierung mit der beschriebenen Methode mit einer Überbestimmung gerechnet werden. Es sei vorweg genommen, dass dieses jedoch nicht der Fall ist. Eine weitere Voraussetzung, wie im Fall des bereits quantifizierten DNA-Standards mit 5 Fragmenten, muss hier nicht geprüft werden, da ausschließlich eine Mengenangabe für eine Spezies getroffen werden soll.

Jeweils fünf verschiedene Chargen der Referenzmaterialien IRMM-447 und IRMM-449 wurden nach dem beschriebenen Vorgehen mit Perchlorsäure hydrolysiert, entsprechend verdünnt und mittels Standardaddition quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 39 für das IRMM-447 sowie in der Abbildung 40 für das IRMM-449 graphisch dargestellt. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass der in der Probe zu findende Phosphor ausschließlich in DNA gebunden vorliegt.

Da die Standardaddition bei jeder Charge nur einmal durchgeführt wurde, sind die Fehlerdarstellungen der Einzelwerte als die Konfidenzintervalle bei 95%iger Sicherheit dargestellt. Weiterhin wurde in den Graphiken der indikative Wert für den Gehalt der Referenzmaterialien sowie dessen Unsicherheit als durchgezogene bzw. gepunktete Linien veranschaulicht.

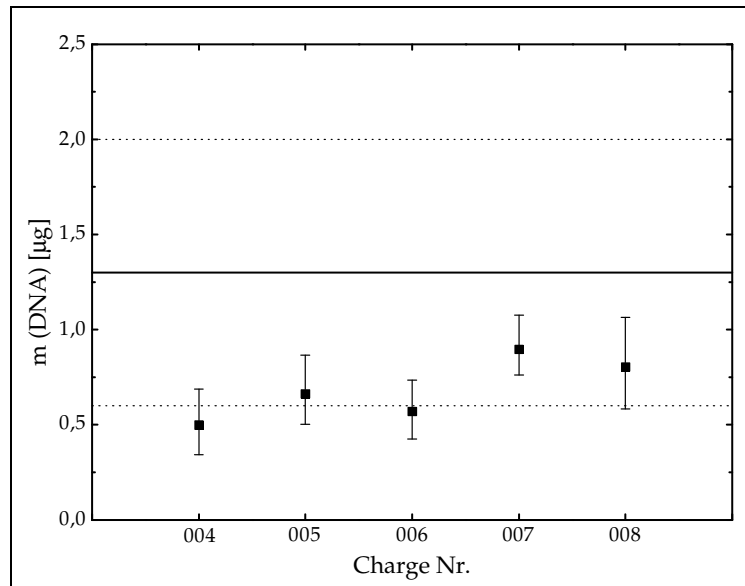
---

<sup>128</sup> SIMON et. al. (1996) *Appl. Envir. Microbiol.* **62**, 822



**Abbildung 39: Quantitative Untersuchung genomischer DNA in dem zertifizierten Standardreferenzmaterial IRMM-447**

Zunächst kann festgestellt werden, dass alle bestimmten Werte, bis auf einen, mit den indikativen Werten im Rahmen der Unsicherheiten übereinstimmen. Ansonsten liefern die Quantifizierungsergebnisse ein sehr unterschiedliches Bild, abhängig von dem jeweiligen Referenzmaterial. Während bei dem IRMM-447 keine systematischen Abweichungen der Messwerte von dem indikativen Wert festzustellen sind, liegen alle gemessenen Werte bei dem IRMM-449 systematisch niedriger. Dafür variieren die Werte zwischen den einzelnen Chargen bei dem IRMM-449 wesentlich weniger stark, als es bei den Chargen des IRMM-447 der Fall ist.



**Abbildung 40: Quantitative Untersuchung genomischer DNA in dem zertifizierten Standardreferenzmaterial IRMM-449**

Über die Ursachen für diese Phänomene könnte man spekulieren, was aber nicht Teil dieser Arbeit sein soll. Was hier diskutiert werden soll, ist, ob sich die Resultate dazu eignen, die Legitimation für die angewandte Methode zu erbringen. Das Übereinstimmen der Werte im Rahmen der Unsicherheiten mit den indikativen Werten würde auf jeden Fall schon einmal dafür sprechen. Doch darf eines nicht außer Acht gelassen werden: Mittels der GE-ICP-MS wurde festgestellt, dass neben der genomischen DNA noch weitere P-haltige Verbindungen in den Referenzmaterialien enthalten waren. Handelt es sich bei der zweiten Fraktion nicht um die einzelsträngige Form der genomischen DNA, so müssten bei Berücksichtigung dieses Befundes gesagt werden, dass alle bestimmten Werte zu hoch angesetzt wären. Vor diesem Hintergrund müssten gerade die Messwerte für das IRMM-449 neu beurteilt werden, da diese dann noch weiter unterhalb des indikativen Werts liegen würden. Da keine systematischen Abweichungen, also weder ein durchgängiger Mehr- bzw. Minderbefund, festzustellen ist, wenn beide Referenzmaterialien berücksichtigt werden, erscheint ein systematischer Fehler in der Methode eher unwahrscheinlich.

Auch wenn hier keine letztendlich gültige Aussage über die Funktionstüchtigkeit der entwickelten Methode getroffen werden kann, so besteht doch die begründete Vermutung, dass die Methode potentiell richtige Ergebnisse liefern kann. Mit dieser Legitimation im Hintergrund sollen nun die gewonnen Erkenntnisse auf die Quantifizierung von einzelnen DNA-Fragmenten angewandt werden.

### III.3.2 Quantifizierung über externe Kalibration

Ein gängiges Verfahren zur Quantifizierung stellt die externe Kalibration dar und soll hier auf die Quantifizierung von einzelnen DNA-Fragmenten übertragen werden. Zu diesem Zweck muss eine Kalibrationsgerade erzeugt werden, welche es erlaubt, den Signalintensitäten der Fraktionen aus der GE-ICP-MS eine quantitative Information zuzuordnen. Daher müssen die Bedingungen bei der Findung einer Kalibrationsfunktion denen der späteren Trennung der DNA-Fragmente vergleichbar sein. Hierfür wird der in III.3.1 quantifizierte DNA-Standard benötigt.

Wesentlich einfacher wäre es doch, wenn beispielsweise Phosphat als Kalibrator verwendet werden könnte, da dieser sowohl mittels der GE-ICP-MS untersucht werden kann als auch in gut quantifizierter Form zur Verfügung steht. Leider verstößt die Verwendung von Phosphat gegen eine Voraussetzung, welche für die Kalibration unabdingbar ist. Es ist zwingend notwendig, dass die Eigenschaften des Kalibrators und der Analyten bezüglich des Verhaltens im Detektor weitest möglich identisch sind. Dieses Problem wurde im Rahmen dieser Arbeit schon öfter genannt und trifft hier in besonderem Maße zu. Auch wenn es nicht unbedingt sein muss, dass der Phosphor im Phosphat mit anderen Effizienzen ionisiert wird als der in den wesentlich größeren DNA-Fragmenten, so muss bezweifelt werden, ob die beiden Spezies ein gleiches Verhalten im Zerstäubersystem zeigen. Weiterhin besteht bei der GE-ICP-MS das Problem, dass Phosphat durch die Dialysemembran migrieren kann und damit auch hier ein anderes Verhalten zeigen kann als die DNA-Fragmente, wie an anderer Stelle bereits demonstriert wurde. Zwar konnten bei 200V immer noch ungefähr 95% des injizierten Phosphats wieder gefunden werden, jedoch basierten die gewonnenen Daten auf einer Extrapolation und sind daher mit entsprechender Vorsicht zu bewerten, gerade wenn es um eine exakte Quantifizierung gehen soll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein anderer Weg beschritten werden, um zu einer geeigneten Kalibrationsfunktion zu gelangen.

Der beschriebene und quantitativ charakterisierte DNA-Standard bietet gute Voraussetzungen für eine Quantifizierung von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 1000 bp, da in diesem quantifizierte DNA-Fragmente dieses Größenbereichs enthalten sind. Es konnte gezeigt werden, dass keine Unterschiede im Verhalten der einzelnen Fragmente am Detektor festzustellen waren, was sich daher auch auf andere Fragmente in diesem Bereich übertragen lässt. Weiterhin kann der Standard unter den exakt gleichen Bedingungen gelelektrophoretisch getrennt werden, wie die zu untersuchenden DNA-Fragmente. Die Signalintensitäten können also ohne weiteres miteinander

verglichen werden, woraus sich direkt eine quantitative Information ableiten lassen kann.

Als Untersuchungsbeispiel wurde ein DNA-Standard gewählt, in welchem 11 Fragmente zwischen 100 und 1000 bp enthalten sind und für welchen eine gute Trennleistung erzielt werden konnte. Die Trennung desselben wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit in Abbildung 24 vorgestellt.

Dieser DNA-Standard eignet sich für die hier angestrebten Untersuchungen in besonderem Maße, da für sieben der elf Fragmente eine Basislinientrennung erreicht werden konnte. Außerdem wird seitens des Herstellers dieses Standards eine Mengenangabe für jedes einzelne Fragment geliefert, was den Vergleich mit den eigenen ermittelten Daten erlaubt.

Für die Erstellung einer Kalibrationsfunktion wurde das vierte Aliquot des in III.3.1 quantifizierten Standards unter den gleichen Bedingungen untersucht, wie der in Abbildung 24 dargestellte DNA-Standard. Der Kalibrationsstandard wurde in verschiedenen Endkonzentrationen eingesetzt, um die Kalibrationsfunktion um mehrere Datenpunkte zu erweitern und so eine bessere Präzision zu erreichen. Es wurden natürlich die ermittelten korrigierten Werte als Grundlage der Kalibrierung herangezogen. Die so erhaltene Kalibrationsgerade ist in Abbildung 41 dargestellt.

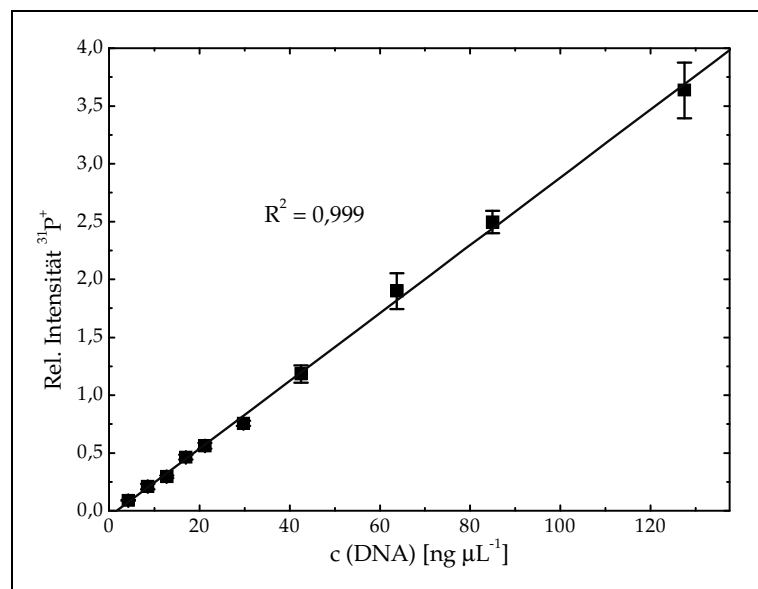
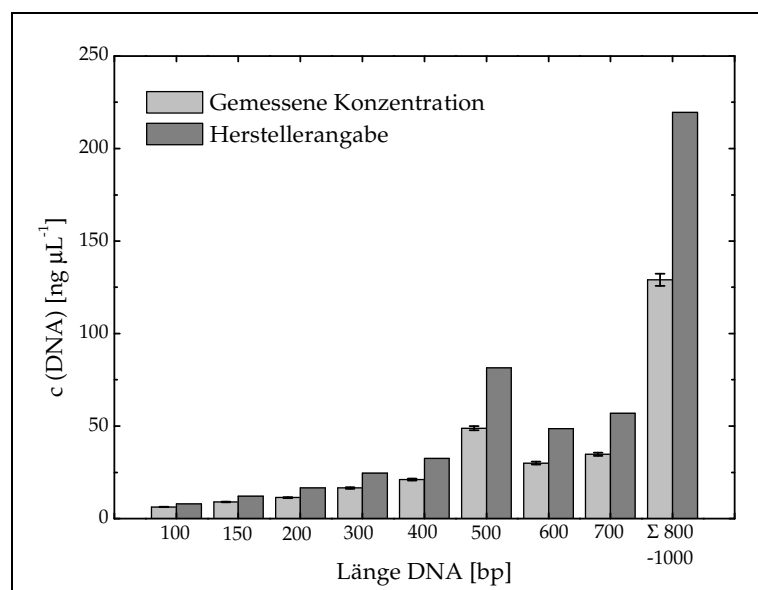


Abbildung 41: Kalibrationsfunktion für DNA-Fragmente zwischen 100 und 1000 bp



Die Kalibrationsfunktion zeigt eine außerordentlich gute Linearität ( $R^2 = 0,999$ ) über den gesamten Konzentrationsbereich, der für die folgenden Untersuchungen relevant ist.

Nun wurden die relativen Signalintensitäten der einzelnen DNA-Fragmente mit der Kalibrationsgerade verglichen und daraus direkt eine quantitative Information abgeleitet. Aufgrund der schlechten Trennung der Fragmente zwischen 800 und 1000 bp wurden diese als Summe zusammengefasst. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 42 dargestellt. Zum Vergleich wurden die Werte der Herstellerangabe mit in die Graphik eingefügt.



**Abbildung 42: Quantifizierung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und Vergleich mit den indikativen Werten**

Es fällt auf, dass alle bestimmten Werte unterhalb der Herstellerangabe liegen. Ein grundsätzliches Problem bei dem Vergleich der Werte untereinander ist, dass bei der Gehaltsangabe des Herstellers keine Unsicherheit mit angegeben ist, wie es sich eigentlich für eine analytisch korrekte Gehaltsangabe gehört. Dieses Problem bestand letztendlich auch für den zur Quantifizierung herangezogenen DNA-Standard. So könnte es natürlich sein, dass die Werte im Rahmen der Unsicherheiten übereinstimmen, was aber hier leider nicht nachgeprüft werden kann.

Hinsichtlich der Präzision bei der eigenen Bestimmung der Gehalte kann gesagt werden, dass diese mit einer maximalen relativen Standardabweichung

von 3% aus analytischer Sicht durchaus als zufriedenstellend bezeichnet werden kann.

Interessant wäre es nun noch, eine Nachweisgrenze für die entwickelte Methode zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten zu bestimmen. Hierfür wurde wiederum das  $3\sigma$ -Kriterium zur Berechnung herangezogen. So ergibt sich unter Berücksichtigung des Untergrundrauschens bei der beschriebenen Untersuchung der DNA-Fragmente und der zugrunde liegenden Kalibrationsfunktion eine Nachweisgrenze für DNA-Fragmente zwischen 100-1000 bp von

$$\text{NWG} = 0,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \text{ DNA}$$

Dieser Nachweisgrenze entspricht ein Phosphorgehalt von ungefähr  $50 \text{ ng g}^{-1}$ , was weit höher ist als die im ersten Abschnitt bestimmte Nachweisgrenze für Phosphor (als Phosphat). Auch wenn die Bedingungen nicht völlig äquivalent waren bei der Bestimmung so zeigt sich hier doch, dass eine immer wieder geäußerte Vermutung zutrifft. Das Verhalten der DNA-Fragmente am Detektor kann nicht gleichgesetzt werden mit dem kleinerer Ionen. Die Empfindlichkeit für den Phosphor in den DNA-Fragmenten liegt weit unter der, welche für niedermolekular gebundenen Phosphor erreicht werden kann. Hier spielen sicher die Vorgänge im Zerstäubersystem die bedeutendste Rolle, doch dies müsste durch weiterführende Untersuchungen geprüft werden.

In diesem Zusammenhang könnte der Einwand kommen, dass die ganze Quantifizierung durch diesen Effekt fehlerhaft wird, was sich in der Tatsache manifestiert, dass bis auf wenige Ausnahmen immer weniger DNA gefunden wurde, als es seitens der Hersteller angegeben war. Doch lässt sich dieses sehr leicht entkräften durch das gesamte Vorgehen während der Quantifizierung. Um gerade jenen Effekt zu vermeiden wurde zunächst die Hydrolyse der DNA durchgeführt, woraus ein gut quantifizierter DNA-Standard hervorging. Mit diesem Standard konnte nun eine dem Analyten in allen Eigenschaften angepasste Quantifizierung durchgeführt werden. Störende Effekte, wie der beschriebene, wirken sich in gleichem Maße auf den Kalibrator wie auf die Analyten aus, wodurch eine Kompensation dieser Effekte erreicht werden kann.

### III.3.3 Zusammenfassung

Es sollte eine Methode entwickelt werden, wie mittels der GE-ICP-MS eine Quantifizierung von DNA-Fragmenten möglichst präzise und richtig durchgeführt werden kann. Die Motivation für ein solches Unterfangen entspringt der Tatsache, dass zwar einige Methoden zur DNA-Quantifizierung bestehen, alle jedoch gemeinsam haben, dass berechtigte Zweifel hinsichtlich der Präzision und der Richtigkeit der daraus erhaltenen Ergebnisse bestehen müssen.

Daraus entspringt auch die Tatsache, dass kein exakt quantifizierter DNA-Standard zur Verfügung steht, was aber die Voraussetzung für eine DNA-Quantifizierung mittels der GE-ICP-MS darstellt. Daher wurde zunächst eine Methode entwickelt, wie ein solcher Standard selbst charakterisiert werden kann.

Hierzu wurden kommerziell erhältlich DNA-Fragmente hydrolysiert, um das darin enthaltene Phosphat freizusetzen. Dieses konnte mittels Standardaddition und Fließinjektion in das ICP-MS sehr präzise quantifiziert werden ( $RSD < 2\%$ ), woraus sich der Rückschluss auf die ursprünglich enthaltene Menge an DNA ziehen lassen konnte. Ein solches Vorgehen war an zwei Voraussetzungen gebunden, die aber beide erfüllt werden konnten.

Das so entwickelte Verfahren wurde an zwei zertifizierten Standardreferenzmaterialien getestet, für welche ein indikativer Wert für den Gehalt an genomischer DNA gefunden werden konnte. Im Rahmen der Unsicherheiten konnte in 90% der Fälle eine Übereinstimmung der eigens ermittelten Werte mit den indikativen Werten erzielt werden, was für die prinzipielle Funktionstüchtigkeit der Methode spricht.

Der so charakterisierte DNA-Standard wurde zur Quantifizierung von verschiedenen DNA-Fragmenten herangezogen. Hierfür wurde eine externe Kalibrationsfunktion erstellt, mit welcher unterschiedliche DNA-Fragmente mittels der GE-ICP-MS sehr präzise ( $RSD > 3\%$ ) quantifiziert werden konnten. Eine Übereinstimmung mit der Angabe des Herstellers konnte nicht erzielt werden.

Die Richtigkeit der Methode konnte aufgrund des Fehlens von Referenzmaterialien nicht verifiziert werden, jedoch besteht Grund zu der Annahme, dass die entwickelte Methode prinzipiell dazu geeignet ist, richtige Ergebnisse zu erzielen.

Eine Nachweisgrenze für die Quantifizierung von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 1000 bp wurde bestimmt und mit der Nachweisgrenze für Phosphat korreliert. Hieraus konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die

Empfindlichkeit der GE-ICP-MS für DNA-Fragmente wesentlich niedriger liegt als die für niedermolekulare Verbindungen wie Phosphat.

## IV Cisplatin-DNA-Addukte

### IV.1 Cisplatin-DNA-Addukte und ihre Bedeutung

#### IV.1.1 Einführung

Metallhaltige Verbindungen spielen in der Medizin eine nicht unbedeutende Rolle. Neben beispielsweise den goldhaltigen Präparaten in der Rheumabehandlung oder den techneciumhaltigen Kontrastmitteln müssen die platinhaltigen Zytostatika als die wohl wichtigsten Vertreter ihrer Art angesehen werden<sup>129</sup>.

Die tumorhemmende Wirkung der am besten charakterisierten platinhaltigen Verbindung, des Cisplatin ( $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ ), wurde eher zufällig entdeckt. Ein Experiment, welches eigentlich die Wirkung eines elektrischen Feldes auf Bakterien untersuchen sollte, zeigte den Befund, dass es zu einer stark verminderten Zellteilung kam<sup>130</sup>. Dieses konnte nur durch bestimmte Elektrolyseprodukte der eingesetzten Platinelektroden erklärt werden, welche in weiteren Experimenten als Pt(II)-Komplexe identifiziert werden konnten. In nachfolgenden Arbeiten wurde die tumorhemmende Wirkung von Cisplatin in Tierversuchen nachgewiesen<sup>131</sup>, woraus im Jahre 1979 die Zulassung dieser Verbindung als Therapeutikum in den USA resultierte.

Cisplatin wird besonders wirkungsvoll eingesetzt gegen Tumore im Kopf-, Blasen-, Nacken- und Halsbereich sowie gegen Hodenkrebs. Bei jungen Hodenkrebspatienten beispielsweise kann die Überlebenschance mit einer Cisplatinbehandlung auf 80% gesteigert werden. Typischerweise beträgt die verabreichte Dosis Cisplatin zwischen 50-100 mg m<sup>-2</sup> pro Tag, wobei aber auch Hochdosistherapien mit bis zu 200 mg m<sup>-2</sup> pro Tag denkbar wären<sup>132</sup>. Die Flächenangabe in der Einheit mg m<sup>-2</sup> bezieht sich auf die Körperoberfläche des Patienten, welche sich durch verschiedene Berechnungen aus der Körpergröße und dem Gewicht des Patienten ergibt.

Obwohl sich Cisplatin als Zytostatikum durch eine relativ gute Verträglichkeit sowie ein breites Anwendungsspektrum auszeichnet, zeigen sich bei der Anwendung doch eine Reihe von Nachteilen. Hier wären die Nebenwirkungen, wie beispielsweise Übelkeit, Erbrechen oder Nierenversagen sowie die zunehmende Resistenz von Tumoren zu nennen.

---

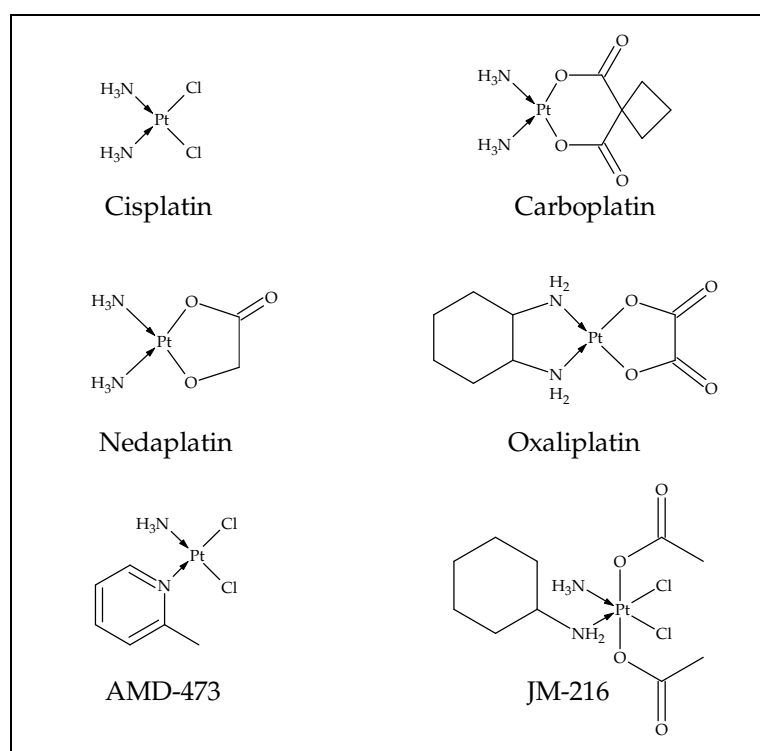
<sup>129</sup> GUO und SADLER (1999) *Angew. Chem.* **111**, 1610

<sup>130</sup> ROSENBERG et. al. (1965) *Nature* **205**, 698

<sup>131</sup> ROSENBERG et. al. (1969) *Nature* **222**, 385

<sup>132</sup> CALVERT et. al. (1993) *Cancer Surveys* **17**, 189

Daher sind bis zum heutigen Tage über 3000 dem Cisplatin analoge Verbindungen synthetisiert worden, von denen aber nur knapp 30 in klinische Studien kamen<sup>133,134</sup>. Bisher werden weltweit in der Krebstherapie neben dem Cisplatin drei weitere platinhaltige Verbindungen eingesetzt: das Carboplatin, das Nedaplatin und das Oxaliplatin. Die Struktur dieser Verbindungen ist der Abbildung 43 zu entnehmen sowie die Strukturen zweier weiterer platinhaltiger Zytostatika, welche sich in der klinischen Erprobungsphase III befinden<sup>135</sup>.



**Abbildung 43: Strukturen tumorhemmender Platinkomplexe**

All diesen Verbindungen ist gemeinsam, dass sie sich entweder durch gemäßigte Nebenwirkungen als das Cisplatin auszeichnen oder für ganz spezielle Tumorarten eine wesentlich verbesserte Wirksamkeit zeigen. Diese Entwicklungen zeigen, dass weiterhin große wissenschaftliche Anstrengungen zu unternehmen sind, um das große Potential der Platin-komplexe in der Tumorthherapie voll auszuschöpfen.

<sup>133</sup> HAMBLEY (1993) *Coord. Chem. Rev.* **166** 181

<sup>134</sup> ZIEGLER et. al. (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 774

<sup>135</sup> CHEN et. al. (1999) *Angew. Chem.* **111**, 2192

#### IV.1.2 Wirkungsweise und Addukte des Cisplatins

Obwohl das Cisplatin schon seit Jahrzehnten erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt wird, ist der genaue Wirkmechanismus des Cisplatins noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch als gesichert angesehen, dass die Zielregion aller platinhaltigen Zytostatika die DNA ist<sup>136</sup>.

Bevor das Cisplatin überhaupt seine Wirkung entfalten kann, muss es zunächst hydrolysiert werden, wobei mindestens eines der Chlorid-Ionen gegen ein Wasser-Molekül ausgetauscht werden muss. Eine solche Hydrolyse ist direkt nach der intravenösen Injektion im Blut aufgrund der hohen Chlorid-Konzentration nicht möglich. Nach einem Transport in die Zelle hingegen ist eine solche Hydrolyse begünstigt, da hier eine wesentlich niedrigere Konzentration an Chlorid vorzufinden ist. Diese Tatsache erklärt, warum das Cisplatin zielgerichtet in der Zelle wirken kann. Für den Transport des Cisplatins in die Zelle werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, worüber aber noch keine letztgültige Klarheit herrscht<sup>137</sup>.

In der Zelle hydrolysiert, bindet das Cisplatin nun bevorzugt an die N7-Stickstoffatome des Guanins, da diese im Sinne von Lewis die stärkste Basizität aufweisen, also am elektronenreichsten sind<sup>138,139,140</sup>. Es verwundert daher nicht, dass neben den so möglichen monovalenten Addukten die Verknüpfung zweier benachbarter Guaninbasen (1,2-GpG) das Hauptaddukt bivalenter Art von Cisplatin mit der DNA darstellt<sup>141</sup>. Hierbei ist es gleich, ob die DNA in einzelsträngiger Form oder doppelsträngiger Form vorliegt. Dieses bivalente Addukt wird in vivo zu 65% gebildet, gefolgt mit 25% von einem 1,2-GpA-Addukt. Beide Addukte sind in Abbildung 44 graphisch dargestellt.

---

<sup>136</sup> SUNDQUIST und LIPPARD (1990) *Coord. Chem. Rev.* **100**, 293

<sup>137</sup> REEDIJK (1996) *Chem. Comm.*, 801

<sup>138</sup> MANSY ET. AL. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 607

<sup>139</sup> JOHNSON ET. AL. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6376

<sup>140</sup> BAIK et. al. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14082

<sup>141</sup> FICHTINGER-SCHEPMAN et. al. (1985) *Biochemistry* **24**, 707

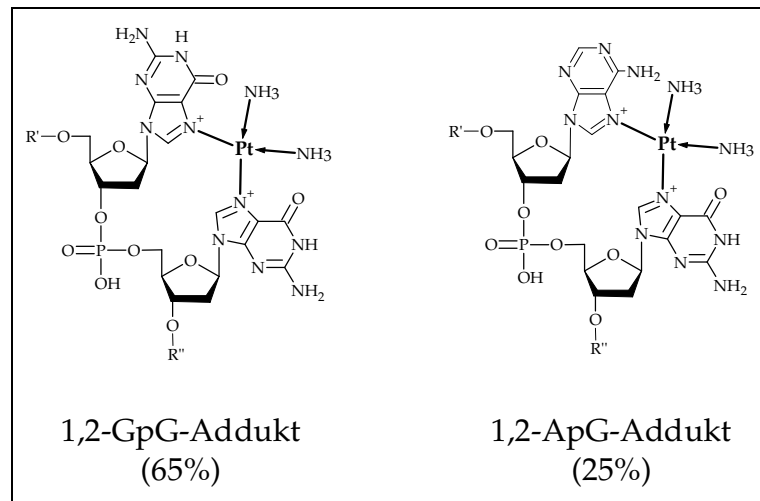


Abbildung 44: Hauptsächlich gebildete Addukte des Cisplatin mit DNA *in vivo*

Neben diesen Hauptaddukten kann jedoch noch eine Vielzahl weiterer Addukte gefunden werden, wobei auch hier der Hauptteil auf Addukte mit dem Guanin entfällt<sup>142,143,144</sup>. So werden auch 1,3-GpNpG-Addukte gefunden, was bedeutet, dass die verbrückten Guanine durch eine andere Base (N) getrennt vorliegen. Bei doppelsträngiger DNA finden sich ebenfalls Guanin-Guanin-Verbrückungen, welche aber beide Stränge verbinden.

Die Bildung aller bivalenten Addukte verläuft über eine monovalente Zwischenstufe, wie im Folgenden für ein 1,2-GpG-Addukt dargestellt werden soll und in der Abbildung 45 zu sehen ist. Als reagierendes Agens wurde das mindestens einfach hydrolysierte Cisplatin identifiziert, welches in einem ersten Schritt an das N7-Stickstoffatom eines Guanins angreift<sup>145</sup>. Sehr interessant in diesem Zusammenhang ist, dass dieser Angriff mitnichten gleichwertig an beiden möglichen Guaninen stattfindet<sup>146, 147</sup>. Kinetische Analysen haben gezeigt, dass ein monovalentes Addukt am 5'-Guanin wesentlich schneller gebildet wird, als an dem 3'-Guanin<sup>148</sup>. Eine schlüssige Erklärung für dieses Phänomen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gefunden. Ein Erklärungsansatz geht jedoch davon aus, dass das Cisplatin bevorzugt von dem 5'-Ende der DNA an derselben entlang

<sup>142</sup> EASTMAN (1983) *Biochemistry* **22**, 3927

<sup>143</sup> JAMIESON und LIPPARD (1999) *Chem. Rev.* **99**, 2467

<sup>144</sup> HAGEMEISTER und LINSCHIED (2002) *J. Mass Spectrom.* **37**, 731

<sup>145</sup> KOZELKA et. al. (1999) *Coord. Chem. Rev.* **190-192**, 61

<sup>146</sup> LAOUI et. al. (1988) *Inorg. Chem.* **27**, 2751

<sup>147</sup> REEDER et. al. (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**, 370

<sup>148</sup> LEGENDRE et. al. (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 3964



wandert, bis eine entsprechend elektronenreiche Stelle zur Bindung erreicht ist.

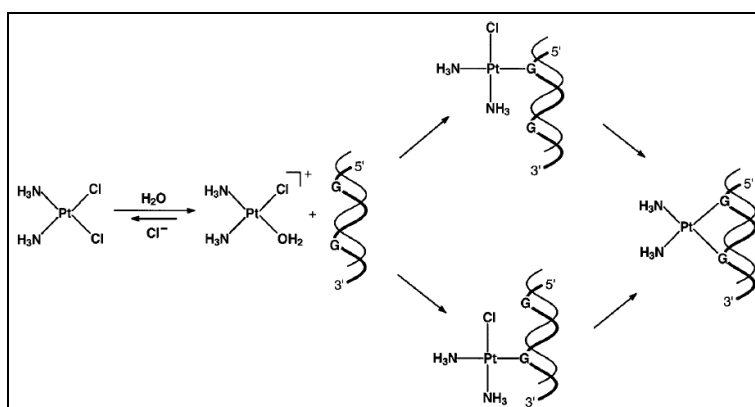


Abbildung 45: Mechanismus der Reaktion von DNA mit Cisplatin [aus 129]

Mit diesem Phänomen zusammenhängend kann beobachtet werden, dass die Bildung des 1,2-GpG-Addukts durch Ringschluss ausgehend von dem 3'-Addukt wiederum schneller vonstatten geht als von dem 5'-Addukt. Für dieses kann im Vergleich zum 3'-Addukt eine doppelt so lange Halbwertszeit festgestellt werden. Hierfür wird die 3D-Struktur der DNA verantwortlich gemacht, und zwar entweder durch die Abschirmung des Cl-Liganden und Schutz vor weiterer Hydrolyse für das 5'-Addukt oder durch Erzwingung eines Ringschlusses für das 3'-Addukt.

Durch die Bildung eines 1,2-GpG-Addukts kommt es zu einer Veränderung in der 3D-Struktur der DNA, welche durch bestimmte Reparaturproteine, den HMG-Proteinen (HMG = *high mobility group*), erkannt werden kann. Zusätzlich wird die Replikation der DNA und somit das Wachstum eines Tumors verhindert. Diese Vorgänge gestalten sich auf molekularer Ebene jedoch wesentlich komplexer als hier dargestellt werden kann und es muss auf die Literatur verwiesen werden<sup>149,150</sup>.

Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass die Untersuchungen der biochemischen Vorgänge rund um das Cisplatin in biologischen Systemen bei Weitem noch nicht abgeschlossen sind und eine Herausforderung für die moderne Bioanalytik darstellen.

<sup>149</sup> FUERTES et. al. (2003) *Chem. Rev.* **103**, 645

<sup>150</sup> CHANEY et. al. (2005) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, 3

### IV.1.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung von Cisplatin-DNA-Addukten

Die Analytik von Cisplatin-DNA-Addukten wird vor allem von zwei Techniken getragen: der NMR und der Massenspektrometrie. Daher soll im Folgenden auch nur auf Methoden eingegangen werden, welche auf diesen beiden Techniken basieren.

Seit dem Beginn der Untersuchung von platinhaltigen Verbindungen und deren Wechselwirkung mit der DNA, wird die NMR in diesem Zusammenhang intensiv eingesetzt<sup>151</sup>. Sowohl durch die Verwendung der <sup>195</sup>Pt-NMR als auch der <sup>15</sup>N-NMR konnten fundamentale Erkenntnisse über den Aufbau solcher Cisplatin-Addukte gewonnen werden<sup>152</sup>. Eine entscheidende Limitierung erfuhr diese Technik jedoch durch die sehr beschränkte Empfindlichkeit, welche nicht ausreichte, um Untersuchungen von Cisplatin-DNA-Addukten *in vivo* zu realisieren. Diese Limitierung konnte relativiert werden durch die Entwicklung der 2D-<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-NMR in den frühen 90er Jahren sowie durch kontinuierliche instrumentelle Verbesserungen<sup>153</sup>.

Mittels dieser verschiedenen NMR-Techniken wurden in der Vergangenheit umfassende Untersuchungen zum Aufbau der Cisplatin-DNA-Addukte, zu den Mechanismen, welche zu deren Bildung führen sowie kinetisch orientierte Untersuchungen *in vitro* durchgeführt. Gerade für die kinetischen Aspekte ist die Verwendung der NMR von großem Vorteil, da die Spektren in Echtzeit aufgenommen werden können, ohne dass eine zusätzliche Probenpräparation stattfinden muss. Trotz des Erfolgs dieser so entwickelten Methoden können natürlich auch grundsätzliche Nachteile benannt werden. Zum einen müssen bestimmte strukturelle Gesichtspunkte der Addukte der NMR verborgen bleiben, nämlich dann, wenn keine ausreichende chemische Verschiebung zu beobachten ist. Zum anderen eignet sich die NMR nur sehr begrenzt für quantitative Untersuchungen, gerade im physiologisch relevanten Spurenbereich.

Was die Ermittlung struktureller Eigenschaften der Cisplatin-DNA-Addukte anbelangt, kann die Massenspektrometrie, vor allem vertreten durch die ESI-MS, hilfreiche Dienste leisten. Es ist daher nicht verwunderlich, dass hierauf basierende Methoden in den letzten Jahren zunehmend Einsatz finden.

---

<sup>151</sup> BERNERS-PRICE et. al. (2006) *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **49**, 65

<sup>152</sup> BANCROFT et. al. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6860

<sup>153</sup> BERNERS-PRICE et. al. (1992) *Chem. Comm.*, 789

Die ESI-MS bietet zunächst einmal die Möglichkeit, durch eine präzise Massenbestimmung der in einer Reaktionsmischung oder auch einer Realprobe befindlichen Moleküle eine erste Einordnung der vorliegenden Addukte zu bewerkstelligen<sup>154</sup>. Darüber hinaus ist es jedoch auch möglich durch gezielte MS/MS-Experimente Aussagen über die Struktur bestimmter Cisplatin-DNA-Addukte zu treffen<sup>155</sup>. Über ein solches Vorgehen können die Lücken, welche die NMR-Untersuchungen zwangsläufig lassen müssen, mehr als hinreichend gefüllt werden<sup>156,157</sup>.

Ein weiterer Aspekt lässt gerade die ESI-MS für die Untersuchung von Cisplatin-Addukten in den Vordergrund rücken, nämlich die Möglichkeit zur Kopplung mit einer Separationsmethode. Gerade aus komplexen Adduktgemischen heraus gestaltet sich eine direkte Analyse sehr schwierig, da chemisch sehr ähnliche Addukte darin vorliegen können. Durch eine vorgeschaltete Trennung wird die Analyse solcher Mischungen deutlich vereinfacht, und neue Erkenntnisse können daraus gewonnen werden<sup>158</sup>. Als Trennmedien haben sich die HPLC sowie die CE bewährt und wurden in Kombination mit der ESI-MS für verschiedenste Fragestellungen die Eigenschaften von Cisplatin-DNA-Addukten erfolgreich eingesetzt<sup>159, 160</sup>. Limitiert werden solche Methoden durch die Tatsache, dass die notwendigen Trennbedingungen teilweise nicht mit dem Detektor kompatibel sind. Hier seien die Elutionsbedingungen der HPLC oder die niedrigen Analytmengen bei der CE genannt.

Auch quantitative Untersuchungen wurden mit solchen Methoden durchgeführt, doch stellt die ESI-MS vor diesem Hintergrund nicht den idealen Detektor dar. Es verwundert daher nicht, dass vor wenigen Jahren auch Methoden zur Analytik von Cisplatin-Addukten entwickelt wurden, welche auf einer Detektion mit dem ICP-MS basieren.

Hier lassen sich wiederum zwei mögliche Wege finden, wie diese hilfreich einsetzbar ist. Einerseits finden sich Methoden, wo die ICP-MS ausschließlich dafür eingesetzt wird, Gesamtgehalte für Platin in medizinisch relevanten Proben zu bestimmen, woraus dann Aussagen über das Verhalten von

---

<sup>154</sup> GUPTA et. al. (2001) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **15**, 2472

<sup>155</sup> FRANSKA et. al. (2005) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **19**, 970-974

<sup>156</sup> CARTE et. al. (2000) *Anal. Biochem.* **284**, 77

<sup>157</sup> BECK et. al. (2001) *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 61

<sup>158</sup> GUPTA et. al. (2005) *J. Inorg. Biochem.* **99**, 552

<sup>159</sup> ZÖLLNER et. al. (2001) *J. Mass Spectrom.* **36**, 742-753

<sup>160</sup> WARNKE et. al. (2001) *Electrophoresis* **22**, 97

Cisplatin im Organismus abgeleitet werden<sup>161</sup>. Für die explizite Analytik von Cisplatin-Addukten eignet sich ein solches Vorgehen jedoch nicht.

Erst durch die Kopplung einer Separationsmethode an die ICP-MS ist die effektive Analytik von Cisplatin-Spezies und Cisplatin-DNA-Addukten möglich, was vereinzelt in der Literatur beschrieben wird<sup>162,163,164,165</sup>. Die ICP-MS bietet hier den Vorteil der sehr hohen Empfindlichkeit für das Element Platin sowie, bei entsprechendem Instrumentation, die Möglichkeit zur Korrelation der Elemente Platin und Phosphor. In der Regel entbindet eine solche analytische Vorgehensweise jedoch nicht von der Pflicht, für strukturelle Fragestellungen eine komplementäre Art der Massenspektrometrie einzusetzen, also beispielsweise die ESI-MS oder die MALDI-TOF-MS<sup>166</sup>.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bereits bedeutsame Arbeiten auf dem Bereich der Analytik von Cisplatin-DNA-Addukten geleistet wurden, sich jedoch immer noch Bereiche finden, in welchen ein deutlicher Bedarf an entsprechend neuen Techniken festzustellen ist. Hier sei beispielsweise die exakte Quantifizierung solcher Addukte genannt.

---

<sup>161</sup> YAMADA et. al. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1702

<sup>162</sup> HANN et. al. (2003) *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 1391

<sup>163</sup> BELL et. al. (2006) *J. Chromatogr. B* **837**, 29

<sup>164</sup> HANN et. al. (2001) *Fres. J. Anal. Chem.* **370**, 581

<sup>165</sup> SAR et. al. (2006) *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 861

<sup>166</sup> TIMERBAEV et. al. (2006) *Tr. Anal. Chem.* **25**, 868

## IV.2 Experimentelles Vorgehen

### IV.2.1 Strategie

Bei den im Rahmen dieser Arbeit geplanten Untersuchungen von Cisplatin-DNA-Addukten sollten verschiedene Ansätze verfolgt werden unter Einsatz unterschiedlicher Methoden. Um überhaupt einen Zugriff auf diese Form von Analyten zu bekommen, soll auf ein selbst hergestelltes Cisplatin-DNA-Addukt zurückgegriffen werden. Wie aus der Literatur bekannt ist, reagiert hydrolysiertes Cisplatin sehr effektiv mit Oligonukleotiden, in welchen Sequenzen der Form GpG bzw. ApG enthalten sind. Um das Analytensystem so einfach wie möglich zu gestalten, wurde für das Oligonukleotid eine Sequenz gewählt, welche nach der Theorie nur eine Hauptbindungsstelle mit dem Cisplatin aufweisen sollte. Die Sequenz des Oligonukleotids mit 8 Basen (8-mer) lautet wie folgt:



Da Cisplatin nur in sehr untergeordnetem Maße an Thymin und Cytosin bindet<sup>142</sup>, wäre in diesem Oligonukleotid nur die Möglichkeit zur Bindung an die beiden benachbarten Guanine (GpG). Um nun ein Addukt dieses Oligonukleotids mit Cisplatin herzustellen, ist nichts weiter notwendig, als das Nukleotid und das hydrolysierte Cisplatin in wässriger Lösung miteinander bei erhöhter Temperatur in Kontakt zu bringen. Da Cisplatin als ein in Wasser schwer löslicher Feststoff vorliegt, muss die Hydrolyse vor der eigentlichen Reaktion stattfinden.

Zunächst soll herausgefunden werden, ob sich die entwickelte GE-ICP-MS überhaupt für die Trennung eines Oligonukleotids von dessen Cisplatin-Addukt eignet. Hier sollte sich das ICP-MS als idealer Detektor erweisen, da die Parallelbestimmung von Platin und Phosphor möglich ist.

Wenn dies der Fall ist, soll weiter untersucht werden, ob mit der entwickelten Kopplung strukturelle Aspekte der Addukt-Bildung zugänglich sind. Hierbei soll einerseits die Kinetik der Addukt-Bildung beleuchtet werden, was aufgrund der unkomplizierten und zügigen Probenvorbereitung problemlos möglich sein sollte.

Da die ICP-MS allein nicht geeignet ist, um eine wirkliche Identifizierung der einzelnen Spezies durchzuführen, soll eine komplementäre Form der Massenspektrometrie zum Einsatz kommen, die MALDI-TOF-MS. Mit dieser sollte es möglich sein, die Addukte zu identifizieren und weitere interessante Erkenntnisse zu gewinnen.

Schließlich soll wiederum eine Quantifizierung durchgeführt werden, jedoch soll bei den Cisplatin-Addukten der große Vorteil genutzt werden,

dass durch das enthaltene Platin eine massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse möglich ist.

Ganz zum Schluss, und mehr schon als Ausblick zu verstehen, sollen die gewonnen Erkenntnisse auf Addukte des Cisplatins mit größeren DNA-Fragmenten übertragen werden.

### IV.2.2 Herstellung der Cisplatin-Oligonukleotid-Addukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zur Herstellung der Cisplatin-DNA-Addukte wie im Folgenden beschrieben vorgegangen.

#### Hydrolyse des Cisplatins

- I. 13,2 mg des Cisplatins werden mit 10 mL MilliQ-H<sub>2</sub>O versetzt, was einer Endkonzentration von 4,4 mmol L<sup>-1</sup> entspricht.
- II. Diese Suspension wird für mindestens 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt.
- III. Die Lösung wird für weitere 24 h geschüttelt.

#### Bildung der Addukte

- I. Die Oligonukleotid-Lösung ( $c = 4,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) wird 2:1 mit der Cisplatin-Lösung gemischt und bei 37°C in den Trockenschrank verbracht.
- II. Zum jeweilig beabsichtigten Zeitpunkt wird die Reaktion dadurch gestoppt, dass die gesamte Lösung oder ein Teil davon, auf Trockeneis gestellt wird.
- III. Direkt vor der Analyse wird die Probe wieder aufgetaut, entsprechend verdünnt und im Fall der GE-ICP-MS wie gehabt vorbereitet.

### IV.2.3 Durchführung der MALDI-TOF-MS-Messungen

Für die MALDI-TOF-MS-Messungen wurde ein MALDI-ToF/ToF-Massenspektrometer Modell 4800 der Firma Applied Biosystems ausgestattet

mit einem Nd-YAG-Laser ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ) genutzt. Die Spektren wurden aufgenommen im positiven Ionen-Reflektormodus über einen Massenbereich von  $m/z = 800 - 6000$  mit einem Fokus auf  $m/z = 2500$  und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Die Massenauflösung betrug 10.000.

Bekanntermaßen bildet die Wahl der adäquaten Matrix einen entscheidenden Schritt für die erfolgreiche Durchführung von Messungen in der MALDI-TOF-MS. Daher wurden 5 verschiedene Matrizes sowie zwei verschiedene Matrix-Additive getestet, welche bereits vorher erfolgreich zur Untersuchung von Oligonukleotiden mit der MALDI-TOF-MS eingesetzt wurden<sup>167,168</sup>. Diese sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

**Tabelle 22: Verwendete Matrizes für die MALDI-TOF-MS**

Matrix Nr.	Matrix	Additiv
1	Anthranilsäure	-
2	Nicotinsäure	-
3	DHB	-
4	DHB	Phosphorsäure
5	THAP	-
6	THAP	Citrat
7	HPA	-
8	HPA	Citrat

Die Matrizes 1 und 2 wurden mit einer Konzentration von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (9:1) hergestellt, alle anderen Matrizes mit gleicher Konzentration in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (2:8).

Das Additiv Phosphorsäure wurde mit einer Endkonzentration  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  zugesetzt, das Additiv Citrat mit einer Endkonzentration von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Die Matrix sowie die entsprechende Analysenlösung wurden im Verhältnis 5:1 (v:v) gemischt,  $1 \text{ }\mu\text{L}$  davon auf das MALDI-Target appliziert und bei Raumtemperatur getrocknet.

<sup>167</sup> PIELES et. al. (1993) *Nucl. Acids Res.* **21**, 3191

<sup>168</sup> GUITTARD et. al. (1995) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 33

## IV.3 Ergebnisse der Untersuchungen

### IV.3.1 Trennung von Cisplatin-DNA-Addukten

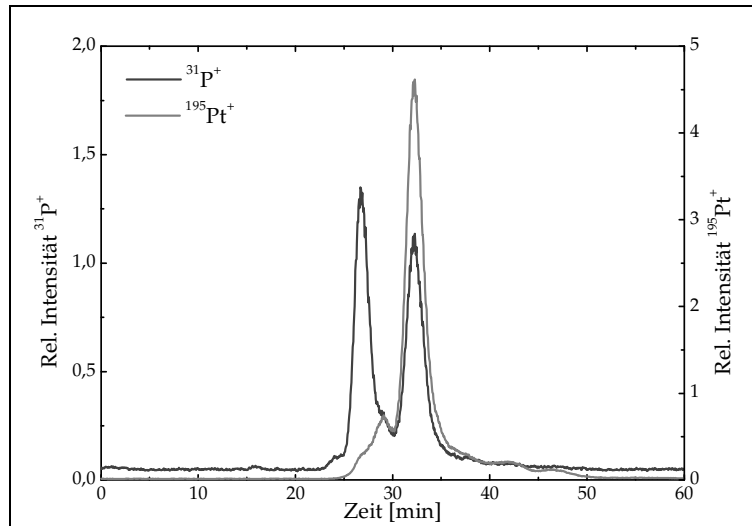
Zunächst soll untersucht werden, ob eine Trennung des freien Oligonukleotids von seinem Cisplatin-Addukt mittels der GE möglich ist.

Hier stellt sich das Problem, dass beide Spezies wesentlich kleiner sind als die bisher untersuchten und zusätzlich keine Angaben gefunden werden konnten, welche Gelbedingungen für die Trennung solch kleiner Moleküle zu wählen sind. Daher wurde als Ausgangspunkt die höchst mögliche Gelkonzentration gewählt, welche mit der verwendeten Agarose praktisch zu erreichen ist, was im konkreten Fall eine Konzentration von 4% bedeutet. Zwar ist es durchaus möglich, noch konzentriertere Gele herzustellen, jedoch lassen sich diese aufgrund der hohen Viskosität der Schmelze nicht mehr in das Glasröhrchen hinein präparieren.

Die Länge des Gels wurde willkürlich auf 40 mm festgelegt, der Gelinnendurchmesser aufgrund der bisherigen Erfahrungen auf 2,2 mm. Auch der Elektrolyt Ammonium-Acetat mit einem pH-Wert von 8,0 wurde genutzt, da hiermit die besten Trenn- und Detektionsergebnisse für die DNA-Fragmente erzielt werden konnten. In diesem Punkt sollte durchaus eine Vergleichbarkeit mit den Oligonukleotiden vorliegen.

Zur Untersuchung wurde zunächst ein Cisplatin-Oligonukleotid-Inkubat nach 24 Stunden Inkubationszeit herangezogen, da hier davon auszugehen war, dass das Cisplatin vollständig mit dem Oligonukleotid zu einem bivalenten 1,2-GpG-Addukt reagiert hatte. Als Ergebnis der Trennung wurde also das freie Oligonukleotid (I) sowie ein Cisplatin-DNA-Addukt (II) erwartet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 46 dargestellt.





**Abbildung 46: Untersuchung eines Inkubats (24h) von einem Oligonukleotid (GpG) mit Cisplatin<sup>169</sup>**

Auf den ersten Blick lässt sich das erwartete Ergebnis beobachten, was zunächst erläutert werden soll. Rein formal lassen sich drei Hauptfraktionen ausmachen, welche aus der GE heraus migrieren. Zwei davon enthalten Phosphor, eine Fraktion Platin. Die exakte Koelution einer P-haltigen Fraktion mit einer Pt-haltigen Fraktion lässt - auch aufgrund des sehr überschaubaren Analytensystems - den Schluss zu, dass es sich hierbei um nur eine Fraktion handelt, in welcher Moleküle eluieren, die sowohl Phosphor als auch Platin enthalten. Es ist also davon auszugehen, dass das Oligonukleotid (P-haltige Fraktion) von seinem Cisplatin-Addukt (P- und Pt-haltige Fraktion) getrennt werden konnte. Um auszuschließen, dass es sich bei der Pt-haltigen Fraktion vielleicht um freies Cisplatin handelt und die Koelution nur einem reinen Zufall zuzuschreiben ist, wurde das Migrationsverhalten von Cisplatin unter diesen Bedingungen getestet. Wie zu erwarten, konnte keine Elution einer Pt-haltigen Fraktion beobachtet werden. Dies ist deswegen nicht weiter verwunderlich, da es sich bei Cisplatin um eine kationische Verbindung handelt, welche unter den entsprechenden Bedingungen im Vergleich zu Oligonukleotiden in die entgegengesetzte Richtung wandern sollte.

Die Inkubationsbedingungen sowie die Sequenz des Oligonukleotids lassen weiterhin den Schluss zu, dass es sich bei dem Addukt um die bivalente Form 1,2-GpG handelt.

<sup>169</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V

Dieses Beispiel demonstriert eindrücklich die Möglichkeiten, aber auch die Einschränkungen des ICP-MS als Detektor. Durch die Möglichkeit zur parallelen Detektion verschiedener Elemente kann eine Aussage bezüglich der Elementzusammensetzung einer aus der GE migrierenden Fraktion getroffen werden. Eine direkte Identifizierung hingegen ist nicht möglich, da alle Molekülinformationen im Plasma verloren gehen. Bis hierher kann also eine Aussage über die Identität der getrennten Moleküle nur als begründete Mutmaßung angesehen werden. Über eine wirkliche Identifizierung wird später gesprochen werden.

Was aber mittels der entwickelten Methode möglich ist, bezieht sich auf die Ermittlung des molaren Verhältnisses der Elemente Phosphor und Platin in der eluierenden Verbindung. Dieses sollte nach der Annahme, dass es sich um ein bivalentes Addukt handelt, genau 8:1 betragen, da ein Platin-Atom an ein Oligonukleotid mit 8 Phosphor-Atomen gebunden ist. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ionisierungseffizienzen von Phosphor und Platin, welche sich durch Einführung von Standardlösungen der beiden Elemente unter den entsprechenden Bedingungen ermitteln lassen, sowie der Isotopenhäufigkeiten von Platin lässt sich dieses Verhältnis aus dem Elektropherogramm heraus ermitteln. In dem konkreten Fall wurde für die besagte Fraktion ein molares P/Pt-Verhältnis von  $7,9 \pm 0,5$  bestimmt, was als Beleg für die Anwesenheit eines bivalenten Addukts in dieser Fraktion angesehen werden kann.

Es soll daher davon ausgegangen werden, dass die Trennung des 1,2-GpG-Addukts von dem freien Oligonukleotid mit der entwickelten Methode möglich ist. Bei genauerer Betrachtung des Elektropherogramms in Abbildung 46 muss jedoch noch festgestellt werden, dass zwischen den beiden Hauptfraktionen eine weitere Komponente zu vermuten ist. Diese Fraktion enthält sicher Platin, ein Phosphor-Anteil kann wiederum vermutet werden. Worum kann es sich nun hierbei handeln? In der Literatur wird beschrieben, dass die Bildung des bivalenten Addukts über eine monovalente Zwischenstufe verläuft. Es könnte also sein, dass in der Reaktionsmischung noch Reste dieses Intermediats vorhanden sind und zu der entsprechenden Zeit aus der GE eluieren.

Da eine direkte Identifizierung mit der entwickelten Methode noch nicht möglich ist, muss ein anderer Weg gefunden werden, um diese Vermutung zu stützen. Wie bereits beschrieben, ist die Bildung dieser Addukte kinetisch kontrolliert, und das monovalente Addukt bildet für die Anfangsphase der Reaktion das Hauptprodukt. Daher soll versucht werden, die Zusammensetzung des Inkubats zu einem früheren Zeitpunkt (3 h) zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 47 dargestellt.

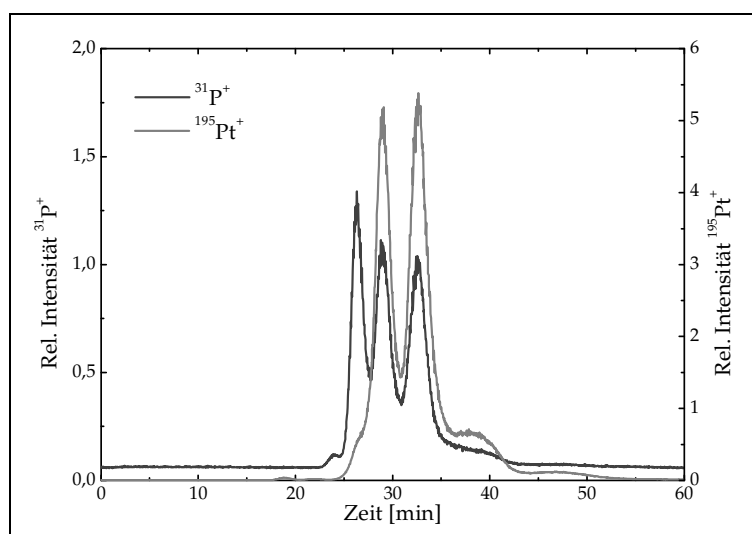


Abbildung 47: Untersuchung eines Inkubats (3 h) von einem Oligonukleotid (GpG) mit Cisplatin<sup>170</sup>

Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich das Bild im Vergleich zu einer 24 stündigen Inkubationszeit deutlich gewandelt hat. Es lassen sich drei Hauptfraktionen ausmachen, von den zwei neben Phosphor auch Platin enthalten. Die erste dieser P-Pt-haltigen Fraktionen kann über einen Vergleich der Retentionszeiten der Nebenfraktion in dem 24h-Inkubat zugeordnet werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei um das monovalente Addukt handelt wird dadurch gestützt, da es zu diesem früheren Zeitpunkt nach der Theorie als eine Hauptkomponente auftreten sollte, sowie die Tatsache, dass auch in dieser Fraktion ein molares P/Pt-Verhältnis von  $8,2 \pm 0,6$  gefunden werden kann. Das freie Oligonukleotid sowie das angenommene bivalente Addukt lassen sich daher den anderen beiden Fraktionen zuschreiben.

Diese einzelne Untersuchung zeigt, dass mit der entwickelten Methode durchaus kinetische Untersuchungen zur Bildung von Cisplatin-Addukten durchführbar sind. Diese Tatsache soll nun weiter genutzt werden, um die vermutete Identität des monovalenten Addukts zu stützen.

Hierfür wurde ein Inkubat aus dem Oligonukleotid und Cisplatin wie beschrieben hergestellt und in gewissen Abständen Proben entnommen, die bestimmten Inkubationszeiten entsprechen. Diese Proben wurden mittels der GE-ICP-MS untersucht und die Signalintensitäten aller drei Fraktionen bezogen auf das Element Phosphor ermittelt. Da in allen drei Fraktionen das

<sup>170</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V

gleiche Oligonukleotid vermutet wird und sich nur die Art der Bindung des Cisplatins ändern sollte, kann daraus eine relative Verteilung der einzelnen Spezies zueinander abgeleitet werden. Es ist nicht davon auszugehen, dass das Verhalten der einzelnen Spezies am Detektor deutlich unterschiedlich ist, was die einzige Einschränkung für ein solches Vorgehen darstellen würde. Hier tritt der große Vorteil der ICP-MS hinsichtlich quantitativer Bestimmungseigenschaften zutage, da zumindest semi-quantitative Informationen über Analyten erhalten werden können, ohne deren genaue Struktur zu kennen.

Trägt man nun die so erhaltenen in der Lösung vorfindlichen relativen Anteile der drei Spezies gegen die entsprechende Inkubationszeit auf, so sollten die Daten das kinetische Verhalten der einzelnen Spezies widerspiegeln.

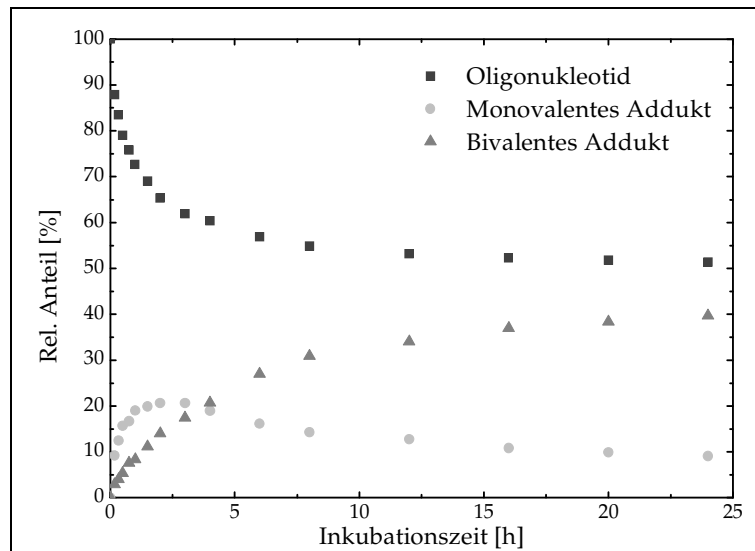


Abbildung 48: Kinetik der Bindung von Cisplatin an eine -GG- Sequenz

Das so ermittelte kinetische Verhalten der drei Spezies entspricht rein qualitativ exakt jenem, was mit anderen Methoden hierfür ermittelt worden ist. Über einen quantitativen Vergleich soll weiter unten gesprochen werden. Zunächst kann anhand der Abbildung 48 aber festgestellt werden, dass die Darstellung die vermutete Existenz des monovalenten Intermediats stützt. Die Abnahme der Konzentration des Oligonukleotids korreliert mit der Zunahme des bivalenten Addukts. Zuvor jedoch wird in verstärktem Maße das Intermediat gebildet, welches aber nach einiger Zeit zugunsten des bivalenten Addukts wieder verbraucht wird. Wie gesagt, lassen sich diese

Daten hervorragend vergleichen mit den Befunden, welche beispielsweise mittels der NMR erhalten wurden.

Um die Verifizierung der Existenz dieses monovalenten Addukts mittels der GE-ICP-MS noch weiter zu betreiben, wurde ein weiteres Experiment unternommen. Nach der Theorie ist davon auszugehen, dass bei nur einem Guanin in der Sequenz ohne weitere Guanine oder Adenine in der Nachbarschaft fast ausschließlich ein monovalentes Addukt gebildet werden kann, da keine bevorzugten Bindungsmöglichkeiten für das Cisplatin nach der ersten Bindung an das Oligonukleotid bestehen. Ein so erhaltenes monovalentes Addukt müsste sich unter vergleichbaren Bedingungen sehr ähnlich verhalten, wie des Intermediat in dem vorher genannten Zusammenhang.

Für die experimentelle Verwirklichung dieser Untersuchung wurde ein Oligonukleotid hergestellt, welches den geforderten Ansprüchen möglichst genau gerecht wird. Die Sequenz dieser Verbindung lautet wie folgt:



Durch den Austausch eines Guanins durch ein Thymin im Vergleich zum ursprünglichen Oligonukleotid wird zweierlei erreicht. Erstens wird durch die Sequenz TpGpT ein Abschnitt in dem Oligonukleotid geschaffen, wo davon auszugehen ist, dass bei der Bindung des Cisplatins überwiegend ein monovalentes Addukt entstehen sollte. Zweitens entspricht die Änderung in der Sequenz der kleinst möglichen im Vergleich zu der ursprünglichen. Das so gestaltete Oligonukleotid wurde nun den gleichen Inkubations- und Trennbedingungen unterworfen, wie es bei dem Oligonukleotid der Fall war, von welchem die Untersuchungen ausgingen. Das Ergebnis eines solchen Vorgehens ist in Abbildung 49 dargestellt.

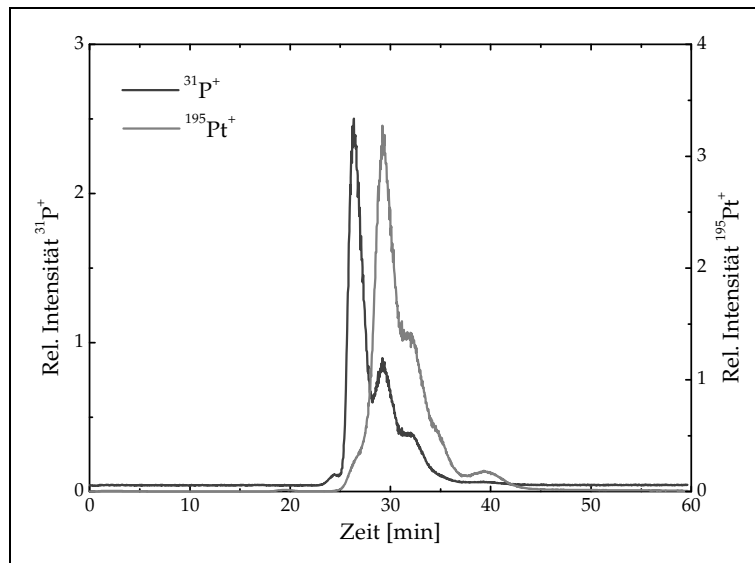


Abbildung 49: Untersuchung eines Inkubats (3 h) von einem Oligonukleotid (TpG) mit Cisplatin<sup>171</sup>

Es kann zunächst festgestellt werden, dass auch dieses Oligonukleotid mit Cisplatin unter Bildung, mindesten eines, Addukts reagiert, was durch die Koelution von Phosphor und Platin belegt werden kann. Eine P-Pt-haltige Hauptfraktion bei einer Migrationszeit von knapp 30 min. kann beobachtet werden. Hierbei sollte es sich um das monovalente Addukt des Cisplatins mit dem Oligonukleotid handeln, welches durch die Bindung des Cisplatins an das Guanin zustande kommt. Vergleicht man nun die Migrationszeit dieses Addukts mit der Migrationszeit des vermuteten monovalenten Addukts in Abbildung 47, so stimmen diese mit einer Abweichung von wenigen Sekunden hervorragend überein. Auch das ermittelte molare P/Pt-Verhältnis von  $7,8 \pm 0,6$  in dieser Fraktion stützt diese Vermutung. Wie mehrfach erwähnt, kann eine solche Übereinstimmung noch nicht als letztendlicher Beweis gelten, doch fundamementiert sie die getroffene Annahme erheblich.

Bei genauerer Betrachtung der Abbildung 49 fällt jedoch noch etwas Weiteres ins Auge. Es wurde davon ausgegangen, dass das gewählte Oligonukleotid überwiegend ein monovalentes Addukt bildet, da zu einer Formierung eines bivalenten Addukts keine weiteren bevorzugten Bindungsstellen für das Cisplatin vorhanden sein sollten. Es muss aber konstatiert werden, dass schon nach den 3 Stunden Inkubationszeit eine weitere Fraktion als Schulter nach dem monovalenten Addukt aus der GE eluiert. Die Migrationszeit dieser Fraktion stimmt mit der des bivalenten 1,2-

<sup>171</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2  $\mu$ L; U=150V

GpG-Addukts aus Abbildung 47 übereinstimmen. Zwar ist der Anteil dieses Addukts im Verhältnis zu dem monovalenten wesentlich niedriger als bei dem Oligonukleotid mit der GpG-Sequenz, doch lässt sich die Existenz mindestens eines weiteren Addukts nicht leugnen. Offensichtlich wird doch ein bivalentes Addukt der Form 1,2-TpG in verstärktem Maße gebildet, was so nicht unbedingt zu erwarten gewesen wäre.

Wiederum kann das molare P/Pt-Verhältnis, welches zu  $8,3 \pm 0,7$  bestimmt werden kann, als Hinweis in Richtung eines bivalenten Addukts gewertet werden.

Um auch in diesem Fall die Möglichkeiten der GE-ICP-MS zur Identifizierung auszuschöpfen, wurde das Inkubat dieses Oligonukleotids mit Cisplatin nach 24 Stunden Inkubationszeit untersucht. Das Resultat ist in Abbildung 50 zu sehen.

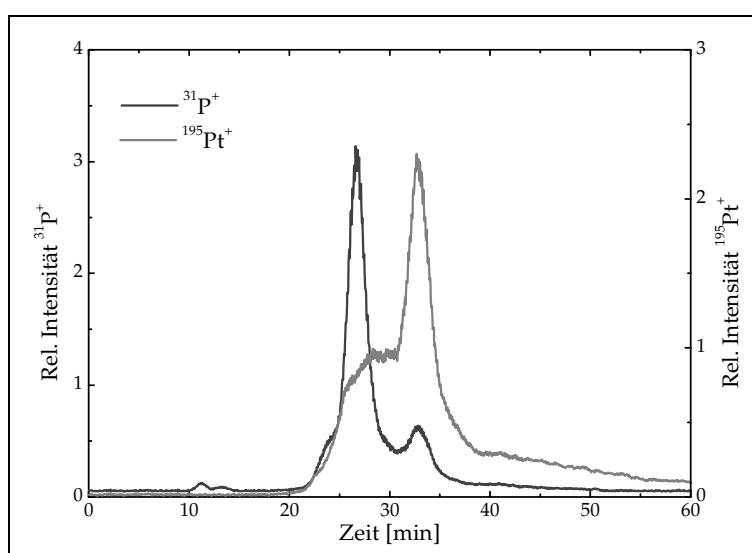


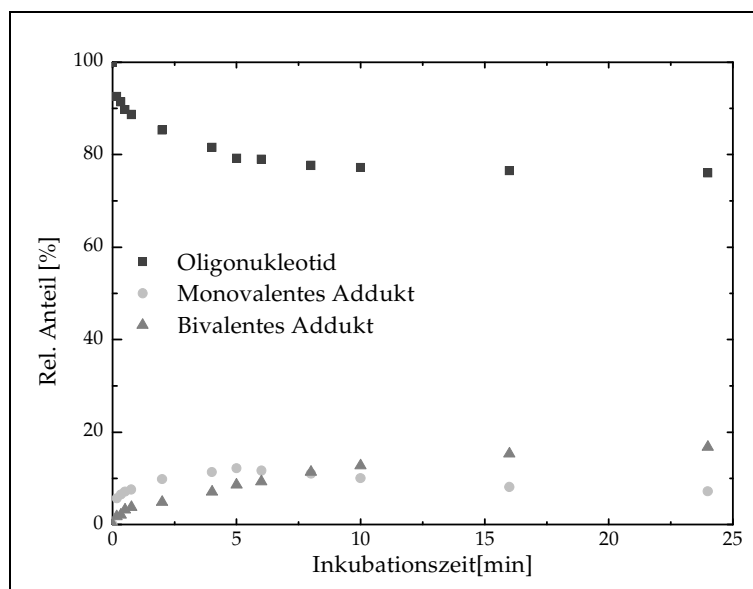
Abbildung 50: Untersuchung eines Inkubats (24h) von einem Oligonukleotid (TpG) mit Cisplatin<sup>172</sup>

Die Trennung funktioniert bei Weitem nicht so effektiv wie bei dem ursprünglichen Oligonukleotid, da anscheinend einige zusätzlich Spezies vorliegen. Doch wird deutlich, dass eine P-Pt-haltige Hauptfraktion unter diesen Bedingungen aus der GE eluiert, welche von der Migrationszeit her mit einem bivalenten Addukt übereinstimmt. Im Vergleich zur dem Resultat in Abbildung 49 kann festgestellt werden, dass das monovalente Addukt

<sup>172</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V

zugunsten eines möglichen bivalenten Vertreters fast vollständig verschwunden ist.

Dieser Sachverhalt drückt sich auch in einer kinetischen Analyse der erhaltenen Daten aus, die wie dem ursprünglichen Oligonukleotid auch realisiert wurde und in Abbildung 51 zu sehen ist.



**Abbildung 51: Kinetik der Bindung von Cisplatin an eine TpG-Sequenz**

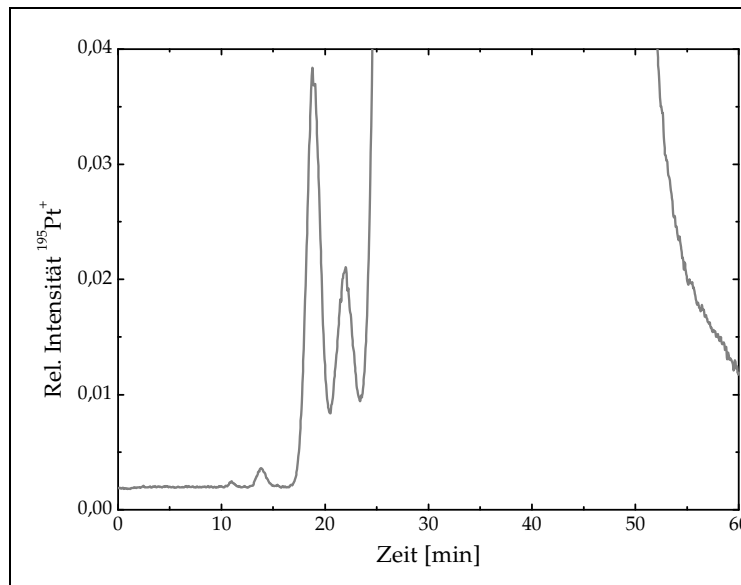
Rein phänomenologisch ergibt sich bei dieser kinetischen Analyse das gleiche Bild wie der Analyse des GpG-haltigen Oligonukleotids. Ein Intermediat wird nach einer zunächst stärkeren Bildung zugunsten eines Produkts wieder abgebaut. Der Schluss liegt nahe, dass es sich bei dem Intermediat um ein monovalentes, bei dem Produkt um ein bivalentes Addukt handelt. Die Unterschiede zu dem ursprünglich untersuchten Oligonukleotid liegen lediglich an der Geschwindigkeit und der Effektivität der Bildung. Beides ist in diesem Fall wesentlich niedriger zu veranschlagen, wobei für letzteres sicher thermodynamische Aspekte als Ursache zu vermuten sind. Nichtsdestotrotz deutet dieser Befund darauf hin, dass auch bei Vorliegen einer TpG-Sequenz bivalente Addukte gebildet werden können. Bei einer wirklichen Identifizierung dieser Addukte stößt die entwickelte Methode jedoch an ihre Grenzen und es müssen komplementäre Strategien verfolgt werden, wovon im nächsten Abschnitt die Rede sein wird.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es die entwickelte Methode grundsätzlich erlaubt, Addukte des Cisplatins mit verschiedenen Oligonukleotiden zu untersuchen, selbst solche, für die bislang in der



Literatur nur unzureichend beschrieben sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Trennbedingungen so gestaltet sind, dass keine signifikanten Veränderungen der Spezies stattfinden, was einen grundsätzlichen Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen darstellt. Das ICP-MS als Detektor zeigt seine vorzüglichen Eigenschaften dadurch, dass simultan die Elemente Phosphor und Platin bestimmt werden können und ohne genaue Kenntnis der Struktur der Analyten semi-quantitative Untersuchungen möglich sind. Für die Identifizierung der Spezies müssen jedoch andere Detektionsmethoden zurate gezogen werden, was im Folgenden demonstriert werden soll.

Bevor dies jedoch geschieht, muss mindestens noch ein Wort über die erhaltenen Elektropherogramme verloren werden. Bei kritischer Betrachtung derselben kann nicht verschwiegen werden, dass neben den besprochenen Fraktionen noch weitere P- und P-Pt-haltige Fraktionen aus der GE heraus eluieren. Dieses gilt für alle gezeigten Separationen und ist auch bei nicht gezeigten Resultaten zu beobachten. Die Zahl der unidentifizierten Spezies steigt mit der Inkubationsdauer, was den Schluss nahe legt, dass neben den besprochenen Addukten noch weitere entstehen können. Als Beispiel sei hier vielleicht die Möglichkeit genannt, dass Cisplatin zwei Oligonukleotide miteinander verknüpfen kann. Solche Addukte wären unter den gewählten Bedingungen später aus dem Gel heraus migrierend zu erwarten und tatsächlich tauchen in allen gezeigten Elektropherogrammen Fraktionen nach den bivalenten Addukten auf. Die Empfindlichkeit der entwickelten Methode für die Detektion solcher Addukte sei aber an einem anderen Beispiel demonstriert. In Abbildung 52 ist die gleiche Trennung wie in Abbildung 47 dargestellt, nur in extremer Vergrößerung des Pt-Signals.



**Abbildung 52: Weitere Fraktionen bei der Untersuchung eines Inkubats (3 h) von einem Oligonukleotid (GpG) mit Cisplatin<sup>173</sup>**

Was man erkennen kann, ist, dass vor der ersten Hauptfraktion, welche einem monovalenten Addukt zugeordnet wurde, mindestens drei weitere Addukte eluieren, eben nur in wesentlich niedrigeren Konzentrationen. Hierbei könnte es sich um Addukte mit kürzeren Oligonukleotiden handeln, welche als Verunreinigung in der Lösung vorhanden waren. Eine Koelution mit Phosphor ist nicht zu beobachten, da etwaige P-Signale bei den niedrigen Konzentrationen im Untergrundrauschen verschwinden würden. Es scheint also möglich, durch die Behandlung mit Cisplatin Oligonukleotide für das ICP-MS detektierbar zu machen, ein Sachverhalt, der uns zum Abschluss dieser Arbeit noch begegnen wird. Hier soll es bei dieser reinen Beobachtung bleiben, mit dem Verweis auf zukünftige Arbeiten, welche auf diesem Gebiet sicherlich noch zu bewerkstelligen sind.

### IV.3.2 Strukturelle Identifizierung mittels der MALDI-TOF-MS

Zur Identifizierung der vermuteten Cisplatin-Oligonukleotid-Addukte aus dem vorangegangenen Abschnitt wurden zwei Strategien verfolgt.

---

<sup>173</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V

Um die grundsätzliche Anwesenheit und Existenz dieser Addukte in den Inkubaten nachzuweisen, wurden diese direkt nach entsprechender Verdünnung mittels der MALDI-TOF-MS untersucht. Die Verdünnung erfolgte schon im Hinblick auf die Untersuchung im Rahmen der zweiten Strategie, was bedeutet, dass die Inkubate um den Faktor 100 mit dem Elutionsmittel der GE verdünnt wurden.

Da mittels dieser Gesamtbestimmung noch keine Zuordnung zu den aus der GE erhaltenen Fraktionen möglich ist, wurde die GE von der ICP-MS getrennt und offline Fraktionen der entsprechenden Trennungen gesammelt, welche wiederum mittels der MALDI-TOF-MS untersucht wurden. Eine Verdünnung erfolgte in diesem Fall nicht mehr, da die Analyten die GE bedingt durch den Elutionsmittelfluss bereits in verdünnter Form verlassen.

Als Inkubationsdauer wurde für alle durchgeführten Untersuchungen 3 Stunden gewählt, da hier in allen Fällen die vermuteten mono- und bivalenten Addukte in ausreichender Menge in dem Inkubat vorliegen sollten. Dieses geht es den Untersuchungen mit der GE-ICP-MS hervor und kann anhand der Abbildungen im vorhergehenden Abschnitt nachvollzogen werden.

Bevor mit der eigentlichen Analyse der Cisplatin-Oligonukleotid-Addukte begonnen werden konnte, musste zunächst die geeignete Matrix für solche Analysen gefunden werden. Wie in IV.2.3 beschrieben, können verschiedene Matrizes hierfür sinnvoll eingesetzt werden, wobei jede ein anderes Verhalten hinsichtlich der Ionisierung der Analyten zeigt.

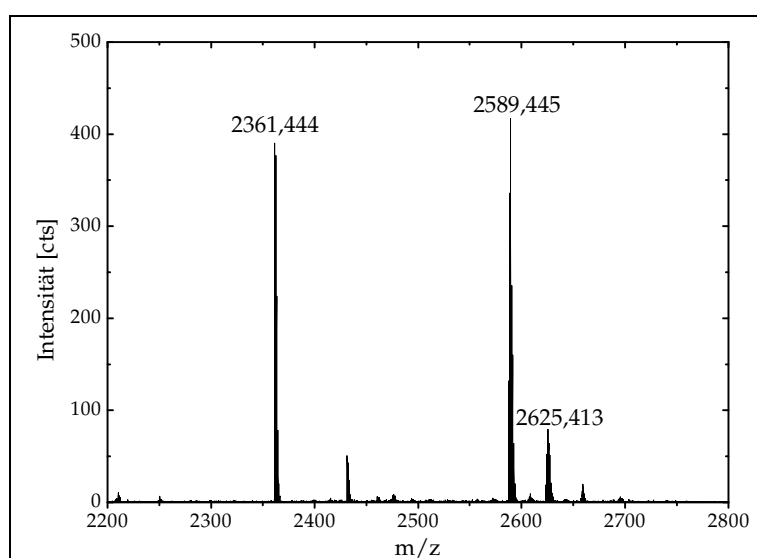
Durch systematische Untersuchungen anhand einer Modelllösung, in welchem nur das freie Oligonukleotid enthalten war, konnte die Matrix 6 als die geeignetste identifiziert werden. Hierbei wurden als Qualitätskriterien die absoluten Signalintensitäten sowie die Bildung von ionisierungsbedingten Addukten, wie beispielsweise Na-Addukten, welche möglichst vermieden werden sollen, berücksichtigt.

Die Interpretation der erhaltenen Spektren und die daraus resultierende Identifizierung der Verbindungen, wurde wie folgt durchgeführt. Das  $m/z$ -Verhältnis des intensivsten Peaks in einem zusammenhängenden Isotopenmuster wurde mit der theoretischen monoisotopischen Masse der vermuteten Spezies verglichen. Bei den freien Oligonukleotiden wurden keine weiteren Angaben gemacht, welche Isotope in dieser monoisotopischen Masse enthalten sind, da der intensivste Peak aufgrund der entsprechenden Isotopenhäufigkeiten grundsätzlich aus den Isotopen  $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  und  $^{31}\text{P}$  besteht. Bei den Addukten wird immer angegeben sein, welche Isotope des Platins bzw. des Chlors zur Berechnung der monoisotopischen Masse herangezogen wurden. Die Abweichung der

gemessenen Werte von den theoretisch errechneten wird angegeben in der Massenabweichung ( $\Delta m/m$ ) in ppm.

Um die Identifizierung der Spezies weiter abzusichern, wird zusätzlich das erhaltene Isotopenmuster in dem entsprechenden Massenbereich mit dem theoretischen verglichen. Eine Übereinstimmung in beiden Fällen kann als legitimes Maß für eine Identifizierung gelten.

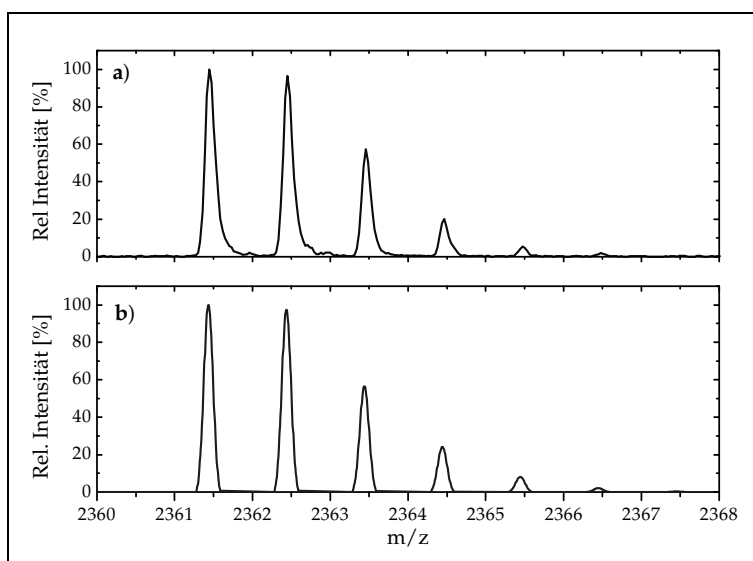
Zunächst soll in den reinen Inkubations-Lösungen, welche noch nicht einer Separation mittels der GE unterworfen wurden, nach den vermuteten Addukten gesucht werden. In der Abbildung 53 ist das Resultat einer solchen Untersuchung für das Oligonukleotid dargestellt, in welchem eine GpG-Sequenz enthalten ist.



**Abbildung 53: MALDI-TOF-MS-Spektrum eines Cisplatin-Oligonukleotid(GpG)-Inkubats (3h) in Matrix 6**

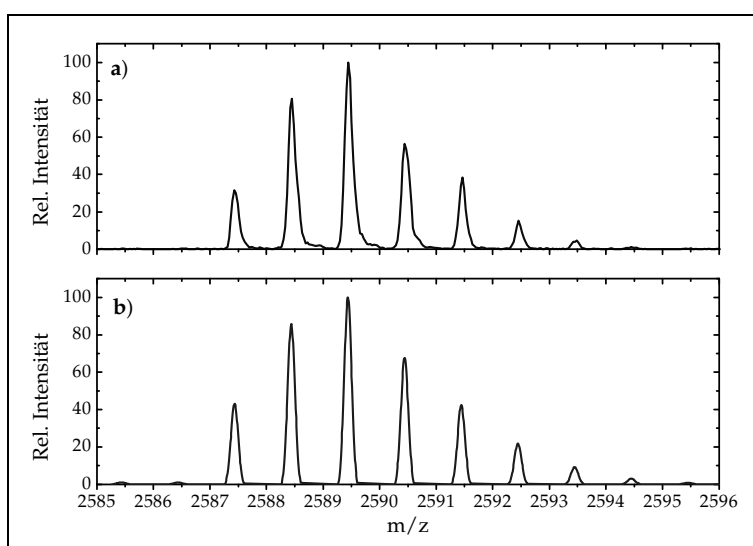
Es lassen sich zwei dominante Signale bei  $m/z = 2361,444$  und  $m/z = 2589,445$  erkennen, sowie ein weiteres, weniger intensives bei  $m/z = 2625,413$ .

Das Signal bei  $m/z = 2361,444$  ist mit einer Abweichung von 4 ppm dem freien Oligonukleotid als  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + \text{H}]^+$  ( $M = 2361,434 \text{ g mol}^{-1}$ ) zuzuordnen, was sich anhand des gefundenen Isotopenmusters leicht nachvollziehen lässt. Dieses ist im Vergleich mit dem theoretischen Isotopenmuster für diese Verbindung bei einer Massenauflösung von 10.000 in der Abbildung 54 zu sehen.



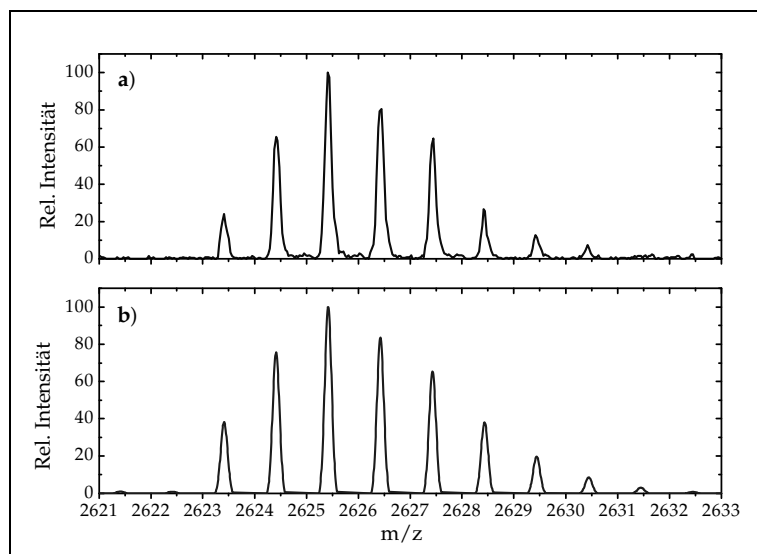
**Abbildung 54: Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2361,444$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + \text{H}]^+$  (b)**

Das zweite dominante Signal bei  $m/z = 2589,445$  kann mit einer Abweichung von 3 ppm als  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 - \text{H}]^+$  ( $M = 2589,437 \text{ g mol}^{-1}$ ) identifiziert werden, was wiederum durch den Vergleich der Isotopenmuster, welche in Abbildung 55 zu sehen sind, bestätigt werden kann. Diese Verbindung entspricht dem vermuteten bivalenten Addukt.



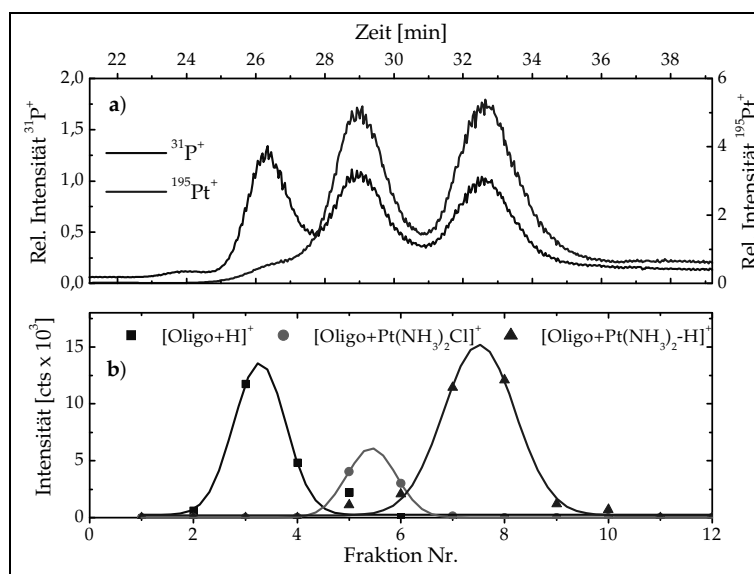
**Abbildung 55: Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2589,445$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 - \text{H}]^+$  (b)**

Das Signal bei  $m/z = 2625,413$  kann mit einer Abweichung von 0,4 ppm als  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2{}^{35}\text{Cl}]^+$  ( $M = 2625,414 \text{ g mol}^{-1}$ ) beschrieben werden. Der Vergleich der Isotopenmuster ist in der Abbildung 56 dargestellt. Damit wäre die Existenz eines monovalenten Intermediats bestätigt. Interessanterweise liegt das Cisplatin hier noch nicht in der vollständig hydrolysierten Form vor, was jedoch auch mit anderen Befunden in der Literatur in Einklang zu bringen ist.



**Abbildung 56: Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2625,413$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{GpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2{}^{35}\text{Cl}]^+$  (b)**

Damit wären für die Reaktion eines Oligonukleotids mit einer GpG-Sequenz die entsprechenden Reaktionsteilnehmer nachgewiesen, wie sie in IV.3.1 bereits vermutet wurden. Zur Wiederholung waren dies: das freie Oligonukleotid, das bivalente Produkt und das monovalente Intermediat. Der Nachweis erfolgte aber zunächst aus der unbehandelten Lösung, welche noch nicht mit der GE untersucht wurde. Eine wirkliche Zuordnung zu den aus der GE erhaltenen und mit der ICP-MS detektierten Fraktionen ist damit aber noch nicht realisiert. Hierzu müssen die Fraktionen der GE getrennt voneinander mit der MALDI-TOF-MS untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende Trennung mit der GE, jedoch ohne ICP-MS-Detektion, wiederholt und in regelmäßigen Abständen Fraktionen gesammelt. Diese Fraktionen wurden wiederum mit der MALDI-TOF-MS gezielt auf die drei interessierenden Spezies hin untersucht. Es kann hier also legitimerweise von einer Offline-GE-MALDI-TOF-MS gesprochen werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 57 dargestellt, zusätzlich im Vergleich mit dem entsprechenden Resultat der GE-ICP-MS.



**Abbildung 57: Offline-GE-MALDI-TOF-MS <sup>174</sup> eines Inkubats (3h) eines Oligonukleotids (GpG) mit Cisplatin (a) und Vergleich mit dem entsprechenden Resultat der GE-ICP-MS (b)**

Diese Abbildung ist in zweierlei Hinsicht als sehr interessant zu bewerten. Zum einen kann hiermit nachgewiesen werden, dass es sich bei den in der GE-ICP-MS beobachteten Fraktionen um die vermuteten Spezies handelt. Dieses wird offensichtlich, durch das Auftauchen der Addukte in den entsprechenden Fraktionen in der MALDI-TOF-MS. Im Hinblick auf die Identität spiegelt die Offline-GE-MALDI-TOF-MS also exakt das Ergebnis wider, welches mit der GE-ICP-MS erhalten werden kann.

Der gravierende Unterschied jedoch liegt in der quantitativen Aussage beider Methoden, was hier als zweiter interessanter Punkt gesehen wird. Im Bezug auf die quantitative Korrelation der beiden Ergebnisse in Abbildung 57 kann nur gesagt werden, dass die MALDI-TOF-MS andere Resultate liefert als die ICP-MS. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der zweiten Fraktion, dem monovalenten Intermediat. Erscheinen die Gehalte dieser Fraktion sowie der des bivalenten Addukts in der ICP-MS äquivalent, so wird in der MALDI-TOF-MS wesentlich weniger davon gefunden. Welcher Art der Massenspektrometrie ist in diesem Fall nun Glauben zu schenken?

Zunächst soll illustriert werden, wie weit die Möglichkeiten der MALDI-TOF-MS zur Tätigung qualitativer Aussagen in diesem konkreten Fall reichen. Zu diesem Zweck ist in Abbildung 58 vergleichend dargestellt, wie das oben gezeigte Resultat aussieht, wenn eine andere Matrix benutzt wird.

<sup>174</sup> Extrapolation unter Annahme einer Gauss-Verteilung

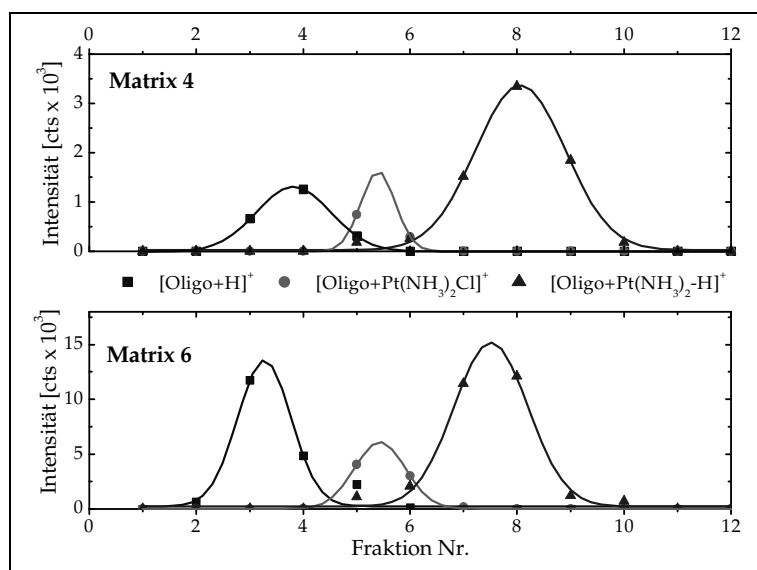


Abbildung 58: Offline-GE-MALDI-TOF-MS eines Inkubats (3h) eines Oligonukleotids (GpG) mit Cisplatin bei Verwendung verschiedener Matrices

Wie deutlich zu erkennen ist, sind nicht nur die absoluten Intensitäten bei den beiden Matrices unterschiedlich, was für eine Quantifizierung nicht unbedingt notwendig wäre. Viel gravierender wirkt sich die Tatsache aus, dass die Verhältnisse der einzelnen Spezies zueinander unterschiedlich sind. So hängt die Ionisierungseffizienz in der MALDI offensichtlich nicht nur von der verwendeten Matrix ab, sondern auch von einem spezifischen Verhalten der Matrix zu einzelnen Analyten, auch wenn diese, wie im bedeuteten Fall, chemisch eine sehr ähnliche Struktur aufweisen. Quantitative Aussagen zu fällen erscheint vor diesem Hintergrund sehr schwer. Über solche Phänomene, ihre Ursachen und vielleicht auch Lösungswege soll an dieser Stelle nicht weiter gesprochen werden, da dieses den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde und letztendlich auch nicht Objekt der Untersuchungen war. Hierfür sei auf die Literatur verwiesen<sup>175,176,177</sup>.

Es bleibt nur festzustellen, dass eben aufgrund solcher Eigenschaften der organischen Massenspektrometrie der Einsatz der ICP-MS für quantitative Zwecke als konsequenter Schluss verstanden werden muss. Sie kann mit ihren herausragenden Eigenschaften, was die Quantifizierung von Elementen in den unterschiedlichsten Verbindungen anbelangt, die Lücke füllen, welche die organische Massenspektrometrie nicht zu füllen in der Lage ist.

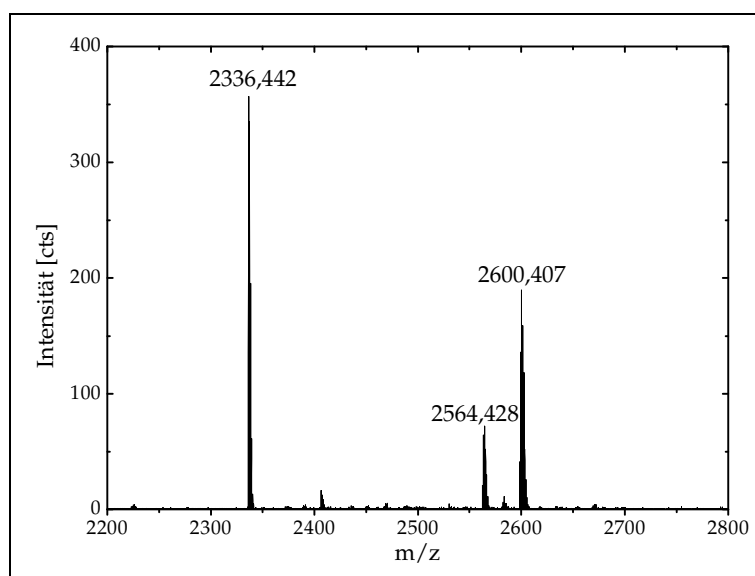
<sup>175</sup> GUSEV et. al. (1996) *Anal. Bioanal. Chem.* **354**, 455

<sup>176</sup> BUNGERT et. al. (2004) *Anal. Biochem.* **326**, 167

<sup>177</sup> ONG und MANN (2005) *Nature Chem. Biol.* **1**, 252



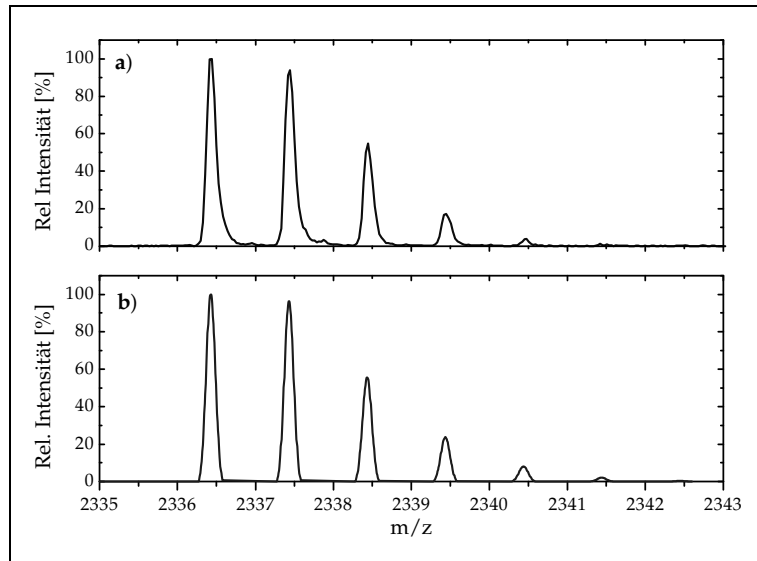
Nachdem nun die Identifizierung der Reaktionsteilnehmer bei der Bildung von Cisplatin-Addukten mit benachbarten Guaninen abgeschlossen ist, soll das gleiche für Oligonukleotide geschehen, welche eine TpG-Sequenz enthalten.



**Abbildung 59:** MALDI-TOF-MS-Spektrum eines Cisplatin-Oligonukleotid(TpG)-Inkubats (3h) in Matrix 6

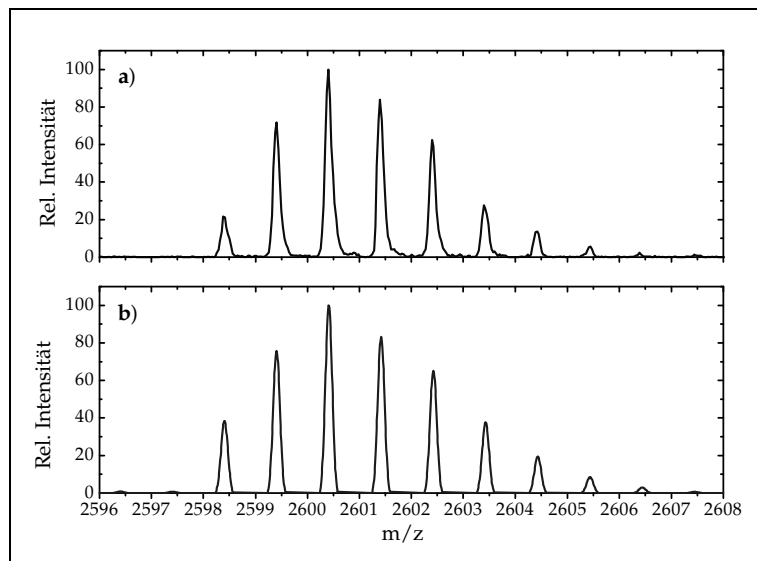
In der Abbildung 59 ist der interessierende Teil des Spektrums zu sehen, welches bei der Analyse der Inkubationslösung eines Oligonukleotids (TpG) mit Cisplatin mittels der MALDI-TOF-MS erhalten werden kann. Wiederum lassen sich zwei dominante Signale bei  $m/z = 2336,442$  und  $m/z = 2600,407$  sowie ein weniger dominantes bei  $m/z = 2564,428$  erkennen.

Das Signal bei  $m/z = 2336,442$  lässt sich mit einer Abweichung von 6 ppm dem freien Oligonukleotid in der Form  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + \text{H}]^+$  ( $M = 2336,428 \text{ g mol}^{-1}$ ) zuordnen, wofür das gefundene Isotopenmuster den weiteren Beweis liefert (siehe Abbildung 60).



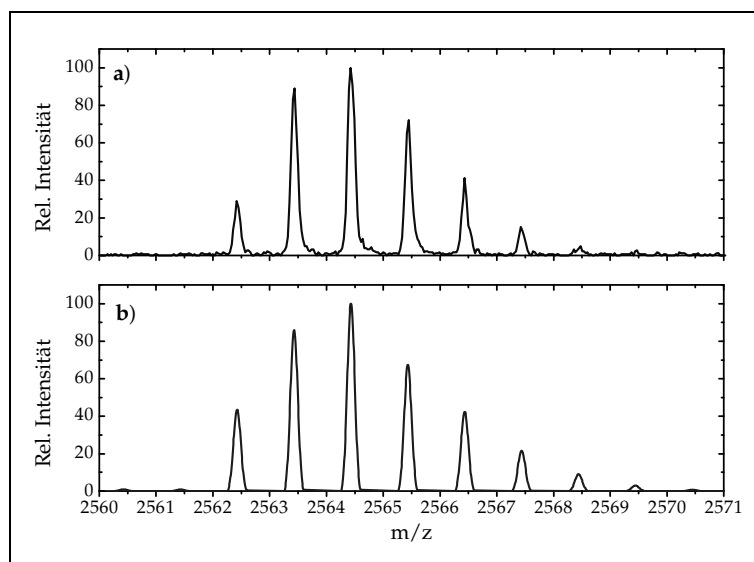
**Abbildung 60:** Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2336,442$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + \text{H}]^+$  (b)

Weiterhin lässt sich das erwartete monovalente Cisplatin-Addukt bei  $m/z = 2600,407$  als  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2{}^{35}\text{Cl}]^+$  ( $M = 2600,404 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit einer Abweichung von 1 ppm identifizieren. Die Sicherheit für eine solche Identifizierung liefert das gefundene Isotopenmuster, welches sehr genau mit dem theoretischen für diese Verbindung übereinstimmt, wie in der Abbildung 61 zu erkennen ist.



**Abbildung 61:** Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2600,407$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2{}^{35}\text{Cl}]^+$  (b)

Wirklich überraschend jedoch ist die Existenz des Signals bei  $m/z = 2564,428$ , da dieses mit einem bivalenten Addukt in der Form  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 - \text{H}]^+$  ( $M = 2564,431 \text{ g mol}^{-1}$ ) ganz hervorragend mit einer Abweichung von 1 ppm übereinstimmt und damit den Befund aus der GE-ICP-MS unterstützt. Den letzten Beweis für ein solches Addukt liefert das gefundene Isotopenmuster, welches in der Abbildung 62 zu sehen ist.

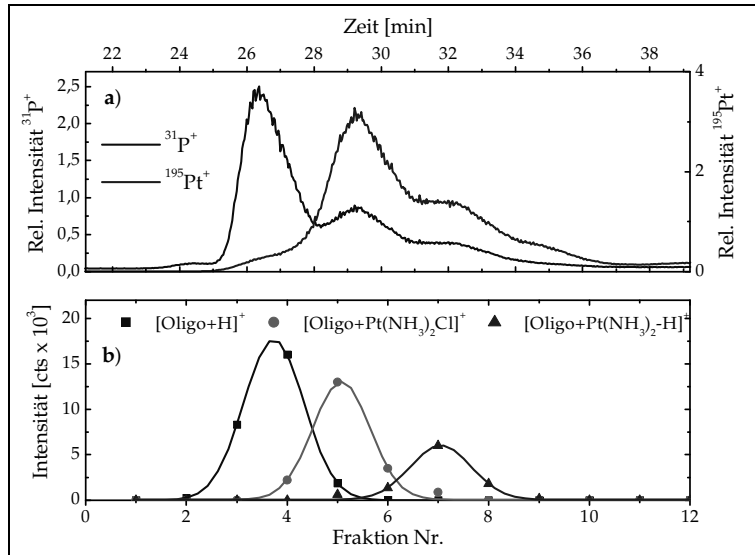


**Abbildung 62:** Vergleich des beobachteten Isotopenmusters bei  $m/z = 2564,428$  (a) mit dem theoretischen für ein  $[\text{Oligo}(\text{TpG}) + {}^{196}\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 - \text{H}]^+$  (b)

Es kann also zusammengefasst werden, dass aus der unbehandelten Inkubationslösung heraus alle drei vermuteten Spezies mittels der MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden können, wobei die Existenz eines bivalenten Addukts besonders interessant erscheint. Wie genau die Bindungsverhältnisse in diesem bivalenten Addukt zu beschreiben sind, konnte jedoch nicht geklärt werden, da hierfür weitergehende MS/MS-Experimente notwendig gewesen wäre. Ein solches war leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Abschließend seien die Ergebnisse der Offline-GE-MALDI-TOF-MS gezeigt, welche wiederum dazu geeignet sind, die Befunde aus der GE-ICP-MS und der MALDI-TOF-MS hinsichtlich der Identifizierung zur Deckung zu bringen. Wie in der Abbildung 63 zu sehen ist, handelt es sich bei den in der GE-ICP-MS beobachteten Fraktionen um die entsprechend vermuteten Spezies. Hinsichtlich quantitativer Aspekte kann nur wiederholt werden, was bereits vorher gesagt wurde, nämlich dass die MALDI-TOF-MS ein wenig exaktes Bild bezüglich der Quantitäten der einzelnen Spezies liefert,

obwohl es sich in diesem Fall weniger gravierend darstellt als in dem vorangegangenen Beispiel.



**Abbildung 63: Offline-GE-MALDI-TOF-MS eines Inkubats (3h) eines Oligonukleotids (TpG) mit Cisplatin (a) und Vergleich mit dem entsprechenden Resultat der GE-ICP-MS (b)**

Zusammenfassend für diesen Abschnitt kann gesagt werden, dass die MALDI-TOF-MS sehr erfolgreich zur Identifizierung von verschiedenen Cisplatin-Addukten eingesetzt werden konnte und zur Bestätigung der bisherigen Resultate aus der GE-ICP-MS beigetragen hat. Zusätzlich zu diesem positiven Synergismus konnten grundlegende Unterschiede zwischen diesen beiden Formen der Massenspektrometrie hinsichtlich der Quantifizierung studiert werden.

### IV.3.3 Bestimmung einer Geschwindigkeitskonstanten

Nachdem die Identität der auftretenden mono- und bivalenten Addukte geklärt wurde, lassen sich die in IV.3.1 und IV.3.2 gewonnenen Erkenntnisse kombinieren und die Geschwindigkeitskonstanten für die zugrunde liegenden Reaktionen berechnen.

Prinzipiell lässt die Reaktion von Cisplatin mit einem Oligonukleotid, in welchem mindestens ein Guanin gebunden ist, unter Beteiligung des beobachteten Intermediats, wie folgt beschreiben:

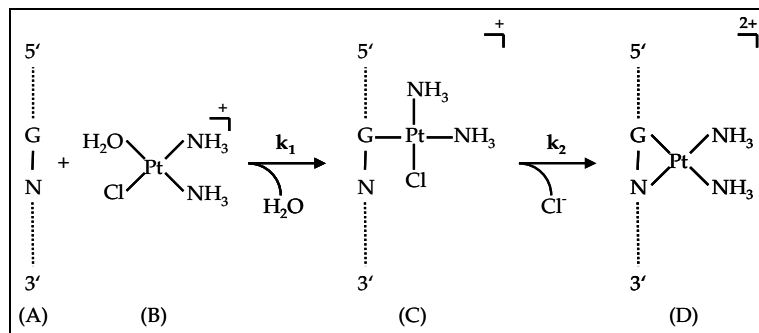


Abbildung 64: Reaktion von Cisplatin (B) mit einem Oligonukleotid (A) zu einem monofunktionalem Addukt (C) und weiter zu einem bifunktionalem Addukt (D)

Diese Darstellung kann natürlich nur als vereinfachter Reaktionsweg verstanden werden, da weitere Intermediate eine Rolle spielen können, wie es bereits beschrieben wurde. Es drückt sich aber darin aus, was mittels der entwickelten Methode zu beobachten war und soll daher als Grundlage für die weiteren Ausführungen herangezogen werden. Es wird eine Reaktion 1. Ordnung bezüglich des Reaktionsprodukts angenommen, was konsistent mit den Annahmen in der Literatur verläuft.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  können demnach folgende Gleichungen formuliert werden:

$$d[C]/dt = k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_2 \cdot [C] \quad \text{Gleichung I}$$

$$d[D]/dt = k_2 \cdot [C] \quad \text{Gleichung II}$$

Die Konstante  $k_2$  kann direkt aus Gleichung II durch Umstellen errechnet werden. Zur Berechnung von  $k_1$  muss Gleichung II in Gleichung I eingesetzt und entsprechend umgestellt werden. Daraus ergeben sich folgende Ausdrücke für  $k_1$  und  $k_2$ .

$$k_1 = (d[C] - d[D]) / (dt \cdot [A] \cdot [B]) \quad \text{Gleichung III}$$

$$k_2 = d[D] / (dt \cdot [C]) \quad \text{Gleichung IV}$$

Da davon ausgegangen wird, dass die Konzentrationsänderung des Cisplatins ausschließlich durch die Bildung der Produkte C und D beeinflusst wird, lässt sich zusätzlich formulieren:

$$[B] = [B_0] - ([C] + [D]) \qquad \text{Gleichung V}$$

Diese Annahme berücksichtigt demnach nicht, dass auch andere Produkte entstehen können, wie beispielsweise durch ein Cisplatin verknüpfte Oligonukleotide.

Welche Konzentrationen sollen nun in diese Gleichungen eingesetzt werden, da doch noch keine absolute Gehaltsbestimmung durchgeführt wurde? Hier sei auf die Abbildung 48 bzw. Abbildung 51 verwiesen. Hier wurden die relativen Anteile der drei Fraktionen bezogen auf den Phosphor bestimmt. Auch hier wurde davon ausgegangen, dass neben dem freien Oligonukleotid nur das monovalente Addukt sowie die entsprechende bivalente Form in dem Inkubat vorhanden waren. Alle drei Fraktionen zusammen genommen gehen daher aus der Anfangskonzentration des Oligonukleotids vor der Inkubation mit dem Cisplatin hervor, welche bekannt ist. In einer Gleichung lässt sich dies so formulieren:

$$[A_0] = [A] + [C] + [D] \qquad \text{Gleichung VI}$$

Mittels dieser Annahme und den ermittelten kinetischen Daten lässt sich nun die numerische Lösung der Gleichungen durchführen, womit die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  bestimmt werden können. Bei der numerischen Lösung der Gleichungen III und IV werden anstatt der infinitesimalen Größen  $d[X]$  die entsprechenden endlichen Größen  $\Delta[X]$  eingesetzt. Diese so erhaltenen Werte für  $k_1$  und  $k_2$  sind in der Tabelle 23 angegeben.

**Tabelle 23: Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion eines Oligonukleotids mit Cisplatin in Abhängigkeit der jeweils bindenden Sequenz**

Sequenz	$k_1$ [L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_2$ [10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> ]
GpG	0,35 ± 0,06	6,3 ± 1,3
TpG	0,03 ± 0,01	2,3 ± 0,3

Die ermittelten Daten spiegeln den qualitativen Verlauf der kinetischen Kurven wider und fundieren die Erkenntnis, dass die Bildung des bivalenten Addukts als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion von Oligonukleotiden mit Cisplatin angesehen werden kann. Dieses kann durch die Daten in der Literatur bestätigt werden.

Besonders interessant stellt sich der Vergleich zwischen der Kinetik der Bildung von GpG-Addukten und TpG-Addukten dar. Eigentlich hätte man erwarten sollen, dass  $k_1$  für beide Addukte mehr oder weniger gleich sein sollte, da die Bindung in beiden Fällen an das Guanin stattfindet. Jedoch wird  $k_1$  für das TpG-Addukt um den Faktor 10 niedriger bestimmt als die entsprechende Geschwindigkeitskonstante für das monovalente GpG-Addukt. Was auf den ersten Blick überrascht, deckt sich doch voll und ganz mit den bisherigen Erkenntnissen. So ist bekannt, dass zumindest bei der Bildung von monovalenten GpG-Addukten der Angriff des Cisplatins wesentlich schneller an dem 5'-Guanin stattfindet als an dem 3'-Guanin. In den hier untersuchten Oligonukleotid wurde im Vergleich zu dem Ausgangsnukleotid das 5'-Guanin gegen ein Thymin ausgetauscht, was den gefundenen Sachverhalt der unterschiedlichen  $k_1$ -Werte erklären kann und auch im Einklang mit den Resultaten in der Literatur steht<sup>178</sup>.

Der Vergleich der  $k_2$ -Werte fällt weniger überraschend aus, da zu erwarten war, dass die Bildung eines 1,2-GpG-Addukts schneller vonstatten geht als die Bildung eines 1,2-TpG-Addukts.

Für einen weiterführenden Vergleich mit den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung eines 1,2-GpG-Addukts, welche mit anderen Methoden erhalten wurden, sind die Literaturwerte in der Tabelle 24 zusammengefasst. Es muss jedoch vorweg geschickt werden, dass keines der Wertepaare unter den gleichen Inkubationsbedingungen bestimmt wurde, was die quantitative Vergleichbarkeit stark einschränkt. Die Inkubationsbedingungen wie Temperatur und Art sowie Konzentration des Elektrolyten haben naturgemäß einen erheblichen Einfluss auf die Reaktionskinetik<sup>179,180</sup>.

---

<sup>178</sup> DAVIES et. al. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11380

<sup>179</sup> DAVIES et. al. (2000a) *Inorg. Chem.* **39**, 5603

<sup>180</sup> DAVIES et. al. (2000b) *J. Inorg. Chem.* **79**, 167-172

**Tabelle 24: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung eines 1,2-GpG-Addukts**

$k_1$ [L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_2$ [10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> ]	Quelle
0,35 ± 0,06	6,3 ± 1,3	diese Arbeit
0,31 ± 0,04	1,72 ± 0,15	181
0,32 ± 0,06	1,36 ± 0,07	179
1,97 ± 0,15	8,3 ± 3,3	182
4,6 ± 1,0	2,5 ± 0,5	147
1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,3	147
1,2 ± 0,1	10,5 ± 1,0	148

Auch wenn aus den erwähnten Gründen die Werte nicht direkt miteinander vergleichbar sind, so kann doch gesagt werden, dass sowohl die Größenordnung als auch die qualitativen Zusammenhänge der eigenen Messungen mit den Literaturdaten in Einklang zu bringen sind. Daraus kann geschlossen werden, dass das gewählte Vorgehen prinzipiell dazu geeignet erscheint, die entsprechenden Reaktionen hinsichtlich der Kinetik zu untersuchen.

#### IV.3.4 Quantifizierung mittels der MSIVA

Die großartigen Möglichkeiten zur Quantifizierung bei der Verwendung des ICP-MS als Detektor können noch gesteigert werden, wenn die massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse zur Quantifizierung herangezogen wird<sup>39</sup>. Dieses als sehr präzise und richtig bekannte Verfahren basiert auf der Messung von Isotopenverhältnissen in einer Probe, welche gegenüber dem natürlich vorkommenden artifiziell verändert wurden. Dieses wird erreicht durch den Zusatz einer so genannten Spike-Lösung, in welcher das zu analysierende Element in einer veränderten Isotopenzusammensetzung enthalten ist. Bei genauer Kenntnis dieser Isotopenzusammensetzung sowie der Konzentration dieser Lösung kann aus den Isotopenverhältnissen in der mit dem Spike gemischten Probe deren Gehalt bestimmt werden. Der große Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, dass zur Quantifizierung Isotopenverhältnisse bestimmt werden müssen und keine absoluten Intensitäten. Diese sind, im Gegensatz zu den Verhältnissen,

<sup>181</sup> BERNERS-PRICE et. al. (1996) *Chem. Eur. J.* **2**, 1283

<sup>182</sup> BERNGES und HOLLER (1991) *Nuc. Acid. Res.* **19**, 1483



von vielerlei äußeren Einflüssen abhängig und können daher nicht zu einer definitiven Quantifizierung herangezogen werden.

Diese MSIVA ist nicht nur für die Gesamtgehaltsbestimmung in einer Probe einsetzbar, sondern auch in der Elementspeziesanalytik mittels *hyphenated techniques*. Hier ist insbesondere die Gruppe um Prof. Heumann zu nennen, welche auf diesem Gebiet Pionierarbeit geleistet hat<sup>183</sup>. Zur Verwirklichung dieser Art der MSIVA stehen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits kann der Spike in Form des jeweiligen Analyten direkt zu der Probe hinzugegeben und mit dieser zusammen der Separationsmethode unterworfen werden (spezies-spezifische MSIVA). Ist der betreffende Analyt jedoch nicht in isotonen-angereicherter Form herzustellen, so kann der Spike auch kontinuierlich nach der Separation mit dem Eluat gemischt und zusammen mit diesem analysiert werden (spezies-unspezifische MSIVA). Daraus ergibt sich dann ein Massenfluss-Chromatogramm, aus welchem der Gehalt des Analyten in der Probe errechnet werden kann.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die spezies-unspezifische MSIVA verwandt, da kein Cisplatin-Spike zur Verfügung stand. Hier zeigt sich ein großer Vorteil des entwickelten Systems gegenüber chromatographischen Separationsmethoden. Bei diesen muss für die Zuführung des Spikes eine zusätzliche Konstruktion nach der Trennsäule angebracht werden. Bei der GE-ICP-MS muss der Spike lediglich dem Elutionsmittel zugefügt werden, was keinen weiteren Einfluss auf die Trenneigenschaften des Systems hat.

---

<sup>183</sup> ROTTMANN und HEUMANN (1994) *Fres. J. Anal. Chem.* **350**, 221

Die Berechnungsgrundlage für die spezies-unspezifische MSIVA bildet im konkreten Fall die Formel 5.

**Formel 5: Berechnung des Massenflusses in der spezies-unspezifischen MSIVA [aus 183]**

$$M_{\text{Probe}}(t) = M_{\text{Spike}} \cdot \frac{h_{\text{Spike}}^{194} - R(t) \cdot h_{\text{Spike}}^{195}}{h_{\text{Probe}}^{195} \cdot R(t) - h_{\text{Probe}}^{194}} - M_{\text{Blank}}$$

$M_{\text{Probe}}(t)$  : Massenfluss Probe zum Zeitpunkt t  
 $M_{\text{Spike}}$  : Massenfluss Spike  
 $M_{\text{Blank}}$  : Massenfluss Untergrund  
 $h$  : Häufigkeit der Isotope  $^{194}\text{Pt}$  und  $^{195}\text{Pt}$  in Spike und Probe  
 $R(t)$  : Gemessenes Isotopenverhältnis  $^{194}\text{Pt}/^{195}\text{Pt}$  zum Zeitpunkt t

Aus der Gleichung geht hervor, dass bevor die eigentliche MSIVA durchgeführt werden kann, der Spike hinsichtlich Isotopenzusammensetzung und Massenfluss charakterisiert werden muss. Die Isotopenzusammensetzung kann über die von der GE unabhängige Messung des Spikes mittels der ICP-MS bestimmt werden. Die Ermittlung des Massenflusses hingegen gestaltet sich weniger einfach. Prinzipiell können hierfür zwei Methoden eingesetzt werden. Zum einen kann der Massenfluss aus der Konzentration des Spikes und der Fließgeschwindigkeit des Eluenten errechnet werden. Hierfür muss jedoch die Fließgeschwindigkeit exakt bestimmt werden. Die andere Möglichkeit bezieht sich auf die Vermessung einer unabhängigen Standardsubstanz mittels der entsprechenden Kopplungstechnik. Da eine solche in diesem Fall nicht zur Verfügung steht, muss der Weg über die Fließgeschwindigkeit gegangen werden. Die Konzentration des Spikes kann über eine inverse MSIVA des Gesamtgehalts des Spikes ermittelt werden.

Zunächst wurden die notwendigen Isotopenverhältnismessungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden der Spike sowie das Cisplatin-Hydrolysat nach entsprechender Verdünnung durch Fließinjektion mit dem ICP-MS untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 25 dargestellt, erweitert durch die natürliche Isotopenzusammensetzung des Platins.

**Tabelle 25: Isotopenhäufigkeiten  $h$  im Spike und der Probe im Vergleich zu den natürlichen Isotopenhäufigkeiten**

Isotop	$h_{\text{Spike}}$ [%]	$h_{\text{Probe}}$ [%]	$h_{\text{Natürlich}}$ [%]
$^{190}\text{Pt}$	< 0,1	< 0,1	0,01
$^{192}\text{Pt}$	< 0,1	$0,80 \pm 0,2$	0,79
$^{194}\text{Pt}$	$81,5 \pm 0,2$	$32,9 \pm 0,1$	32,9
$^{195}\text{Pt}$	$14,8 \pm 0,1$	$33,9 \pm 0,2$	33,8
$^{196}\text{Pt}$	$3,33 \pm 0,08$	$25,3 \pm 0,1$	25,3
$^{198}\text{Pt}$	$0,37 \pm 0,02$	$7,2 \pm 0,1$	7,2

Wie man deutlich erkennen kann, ist der Spike zugunsten des Isotops  $^{194}\text{Pt}$  angereichert. Weiterhin kann gesagt werden, dass die Isotopenzusammensetzung der Cisplatin-Standards der natürlichen entspricht, womit auch gleichzeitig eine Aussage über die Isotopenzusammensetzung der einzelnen Analyten getroffen werden kann. Deutliche Isotopie-Effekte bei der Bildung von Cisplatin-Addukten sind nicht zu erwarten.

Nun muss die Konzentration des Spikes bestimmt werden. Dieses kann am korrektesten mittels einer inversen MSIVA geschehen. Hierzu wird der Spike mit einer exakten Menge eines Pt-Standard bekannter Konzentration und natürlicher Isotopenzusammensetzung gemischt und das resultierende Isotopenverhältnis bestimmt. Auch dieses Verhältnis kann mittels Fließinjektion am ICP-MS analysiert werden, da nicht davon auszugehen ist, dass die Vorgänge in der GE einen Einfluss auf die Isotopenzusammensetzung haben sollten. Die inverse MSIVA entspricht letztendlich einer MSIVA des Spikes und lässt sich durch die Formel 6 ausdrücken.

**Formel 6: Berechnung der Spike-Konzentration mittels inverser MSIVA**

$$c_{Sp} = c_{St} \cdot \frac{E_{St}}{E_{Sp}} \cdot \frac{M_{Sp}}{M_{St}} \cdot \frac{h_{St}^{195} \cdot R - h_{St}^{194}}{h_{Sp}^{194} - R \cdot h_{Sp}^{195}}$$

$c_{Sp}/c_{St}$	: Spike/Standard
$c$	: Konzentration [ $\text{ng g}^{-1}$ ]
$E$	: Einwaage [g]
$M$	: Molmasse Platin [ $\text{g mol}^{-1}$ ]
$h$	: Häufigkeit der Isotope $^{194}\text{Pt}$ und $^{195}\text{Pt}$ in Spike und Standard
$R$	: Gemessenes Isotopenverhältnis $^{194}\text{Pt}/^{195}\text{Pt}$

Durch Einsetzen der entsprechenden Daten gelangt man im konkreten Fall zu einer Konzentration des Spikes von

$$c_{\text{Spike}} = (3050 \pm 40) \mu\text{g g}^{-1}$$

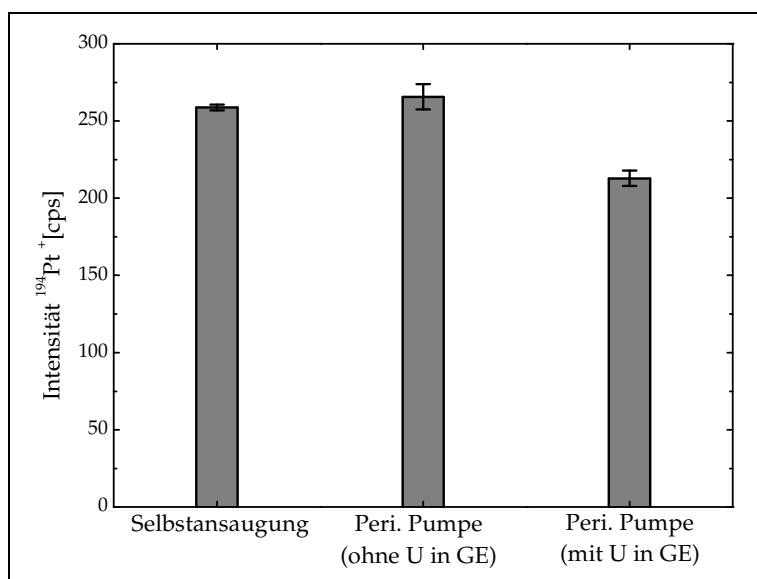
Neben der so erhaltenen Konzentration des Spikes muss zur Ermittlung des Massenflusses noch die Fließgeschwindigkeit exakt bestimmt werden. Diese sollte  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  betragen. Um das zu prüfen und eventuell einen Korrekturfaktor einführen zu können, muss der Umweg über die Fließinjektion mittels des selbst ansaugenden Zerstäubers gegangen werden. Eine direkte Bestimmung ist nicht möglich, da hierfür der Zerstäuber von der Sprühkammer getrennt werden müsste. Prinzipiell ist dieses möglich, doch besteht hierbei die Gefahr, dass der Zerstäuber ohne den Gegendruck des Sprühkammersystems andere Flussraten produziert als während einer laufenden Messung.

Daher wurde eine Einpunktkalibrierung unter Verwendung des Zerstäuberzertifikats durchgeführt. Hierfür wurde der Spike mit dem Elutionsmittel gemischt, um die Elutionsbedingungen am Detektor zu simulieren. Diese Lösung wurde mittels des selbstansaugenden Zerstäubers für 30 Minuten in das ICP-MS eingetragen und hinsichtlich eines Platinisotops ( $^{194}\text{Pt}$ ) analysiert. Das Zertifikat des Zerstäubers gibt an, dass unter optimierten Bedingungen damit eine Fließgeschwindigkeit von  $100 \pm 1,2 \mu\text{L min}^{-1}$  erreicht werden, was hier als Grundlage dienen muss.

Wie bei einer späteren Analyse auch, wurde sodann die GE mittels der peristaltischen Pumpe an den Zerstäuber angeschlossen und die Elutionsmittel/Spike-Lösung durch die GE zum Zerstäuber transportiert, jedoch ohne die Spannung der GE zu aktivieren. Hiermit wurden wiederum

30 Minuten lang die Signalintensitäten für das Platinisotop verfolgt. Dieses Vorgehen wurde für weitere 30 Minuten bei aktivierter Spannung fortgesetzt.

In der Abbildung 65 sind die so erhaltenen, durchschnittlichen Signalintensitäten für diese drei Messperioden für das Isotop  $^{194}\text{Pt}$  dargestellt. Es wird deutlich, dass die Fließgeschwindigkeit bei der Selbstansaugung niedriger sein muss als bei der Verwendung der peristaltischen Pumpe. Damit wäre im Gegenzug der Massenfluss für den Spike höher zu veranschlagen und müsste dementsprechend berücksichtigt werden. Woher rührt aber nun die Signalerniedrigung beim Aktivieren der Spannung? Die Erklärung dafür liegt in der Tatsache, dass das Platin im Spike in ionischer Form vorliegt und beim Passieren des elektrischen Feldes in der Elutionsregion der GE zu einem gewissen Teil aus dem Elutionsmittel herausmigriert. Ein solcher Effekt ist natürlich ebenfalls bei der Bestimmung des Massenflusses zu berücksichtigen, da er diesen erniedrigt.



**Abbildung 65: Abhängigkeit der Signalintensität für  $^{194}\text{Pt}^+$  von der Art des Transports**

So wird für die Bestimmung des tatsächlichen Massenflusses des Spikes folgendes vorgeschlagen. Ein Massenfluss wird errechnet für eine Fließgeschwindigkeit von  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  und diesem die Signalintensitäten zugeschrieben, welche durch die Selbstansaugung erreicht werden können. Dieser Massenfluss wird korrigiert durch einen Faktor, welcher sich aus der entsprechenden Signalabnahme bei Verwendung der peristaltischen Pumpe und aktivierter Spannung errechnet. Hierdurch sollte es möglich sein,

zumindest das prinzipielle Funktionieren einer spezies-unspezifischen MSIVA in Verbindung mit der GE-ICP-MS zu überprüfen.

Aus einer so gestalteten Kalkulation entspringt ein korrigierter Massenfluss für den Spike unter den gewählten Trennbedingungen von

$$M_{\text{Spike}} = 2,5 \text{ ng min}^{-1}$$

Bevor nun mit dem eigentlichen Experiment begonnen werden kann, muss noch der Blindwert, ausgedrückt durch den Massenfluss  $M_{\text{Blank}}$ , bestimmt werden. Da bei diesen Untersuchungen jedoch kein bedeutender Blindwert für Platin zu verzeichnen war, wurde darauf im Rahmen dieser Untersuchungen verzichtet.

Die MSIVA für die Cisplatin-Addukte soll exemplarisch an einem 24h-Inkubat eines Oligonukleotids mit einer GpG-Sequenz durchgeführt werden. Das so erhaltene Elektropherogramm ist in der Abbildung 66 zu sehen.

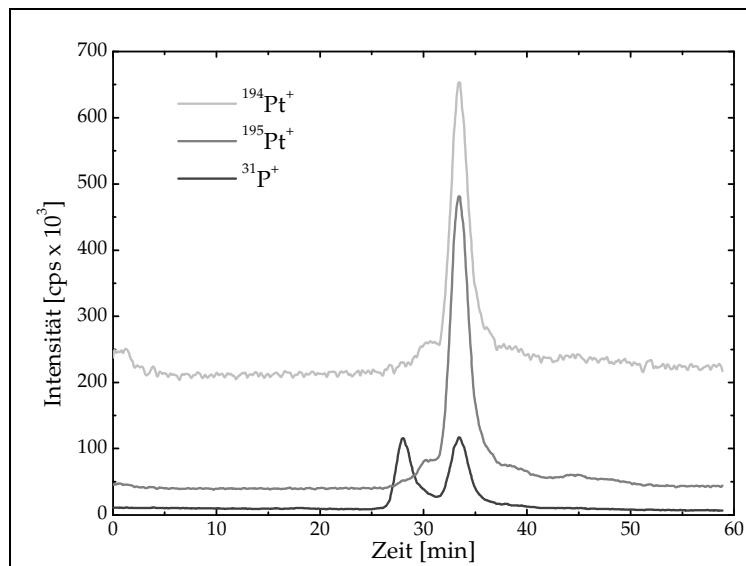
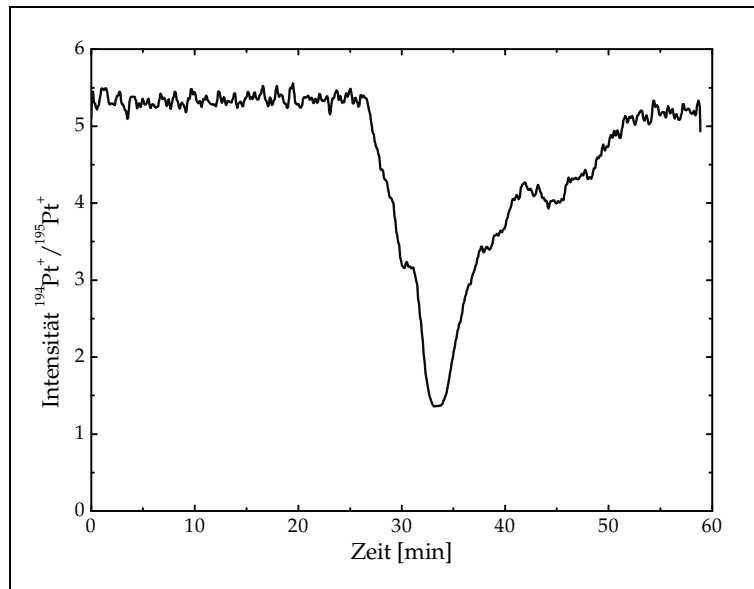


Abbildung 66: MSIVA eines Cisplatin-Addukts<sup>184</sup>

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Trennung des Addukts von dem freien Oligonukleotid durch den Zusatz des Spikes in das Elutionsmittel nicht weiter beeinflusst wird. Auch ist die erwähnte Abnahme der Signalintensität beim Einschalten der Spannung zu beobachten. Die Zeitverzögerung resultiert aus der Totzeit des Systems.

<sup>184</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V

Mittels der so erhaltenen Daten lässt sich nun das Isotopenverhältnis R zwischen  $^{194}\text{Pt}$  und  $^{195}\text{Pt}$  zu jedem Zeitpunkt der Trennung bestimmen und daraus ein Isotopenverhältnis-Elektropherogramm erstellen, wie es in Abbildung 67 zu sehen ist.



**Abbildung 67:** Änderung der Isotopenverhältnisse zwischen  $^{194}\text{Pt}$  und  $^{195}\text{Pt}$  während der MSIVA<sup>185</sup>

Dieses Isotopenverhältnis-Elektropherogramm zeigt deutlich, dass sich während der Trennung das Isotopenverhältnis zwischen  $^{194}\text{Pt}$  und  $^{195}\text{Pt}$  ändert, was auf die Elution des Cisplatin-Addukts zurückzuführen ist, in welchem das natürliche Isotopenverhältnis vorliegt. Diese Art der Darstellung sollte also die beobachtete elektrophoretische Trennung abbilden, was durchaus mit den Daten in Abbildung 66 in Einklang zu bringen ist.

Es kann auch als durchaus wichtig erachtet werden, dass das Isotopenverhältnis vor der Elution des Addukts konstant bleibt und keine Änderung, wie bei den absoluten Intensitäten in Abbildung 66, zu beobachten ist. Dieses kann nämlich als Beleg für zweierlei angesehen werden: Der Prozess der Elektrophorese besitzt keine Auswirkungen auf die Isotopenzusammensetzung, verändert das Isotopenverhältnis in dem Spike also nicht. Auch entstehen keine signifikanten Untergrundsignale durch die Elektrophorese (beispielsweise durch die Platinelektroden), da diese der

<sup>185</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2  $\mu\text{L}$ ; U=150V

natürlichen Isotopenzusammensetzung entsprechen müssten, was zu einer Veränderung der Isotopenverhältnisse führen würde.

Unter Zuhilfenahme des berechneten Massenflusses des Spikes, der bestimmten Isotopenverhältnisse und der Formel 5 lässt sich nun ein Massenfluss-Elektropherogramm für das Element Platin erstellen, wie es in Abbildung 68 zu sehen ist.

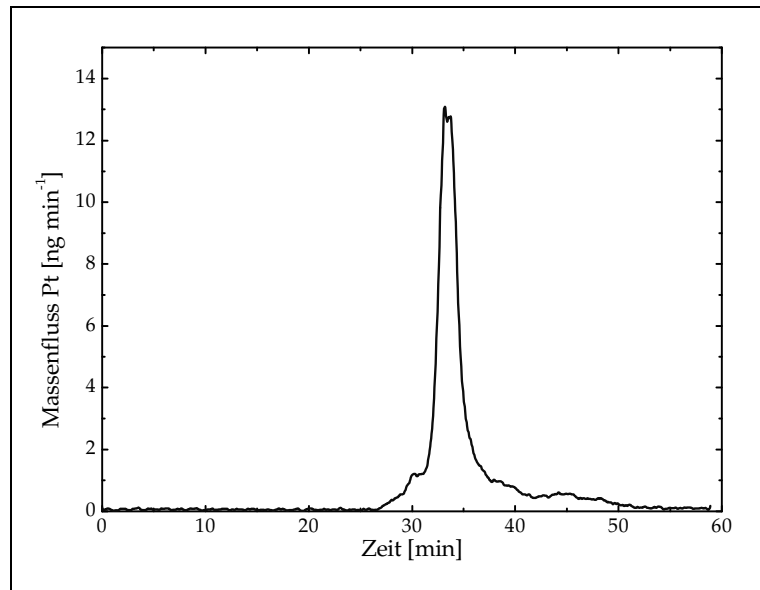


Abbildung 68: Massenfluss-Elektropherogramm für die Untersuchung von Cisplatin-Addukten<sup>186</sup>

Durch Integration der Massenfluss-Fraktion lässt sich nun die Menge an Platin bestimmen, die in dieser Fraktion enthalten ist. In diesem Fall wurde über die ganze Breite der Fraktion integriert, um alle Pt-haltigen Addukte mit in die Kalkulation einbeziehen zu können. Daraus ergibt sich ein Platingehalt von

$$m(\text{Pt}) = (41,6 \pm 1,6) \text{ ng}$$

Wie ist dieses Ergebnis nun zu beurteilen? Der große Vorteil der MSIVA liegt darin, dass die analytischen Ergebnisse sich durch ein hohes Maß an Richtigkeit auszeichnen, sofern die MSIVA entsprechend richtig durchgeführt wurde. Um dieses in dem konkreten Fall zu überprüfen, kann der erhaltene Wert mit der bekannten Menge an Platin, welches in Form von Cisplatin in das System injiziert wurde, verglichen werden. Bei einer

---

<sup>186</sup> Gel: 40x2,2 mm, 4,0% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 2 µL; U=150V



Inkubationsdauer von 24 Stunden und einem Überschuss an Oligonukleotid besteht die Möglichkeit, dass alles Cisplatin mit dem Oligonukleotid Addukte gebildet hat, welche in dem Massenfluss-Elektropherogramm auftauchen müssten.

Diese Überprüfung ist schnell durchgeführt. Es wurden 66 ng Cisplatin als Inkubat injiziert, was einer Masse für Platin von **42,9 ng** entspricht. Dieser Wert liegt zwar ein wenig höher als der in den Pt-haltigen Fraktionen gefundene, stimmt aber im Rahmen der Unsicherheiten mit diesem überein. Bei Berücksichtigung der Tatsache, dass vielleicht nicht alles Cisplatin mit dem Oligonukleotid reagiert hat und damit für eine Detektion nicht zu Verfügung stand, kann dieses Ergebnis als Bestätigung dafür gesehen werden, dass eine spezies-unspezifische MSIVA mit der GE-ICP-MS problemlos möglich ist und richtige Ergebnisse liefern kann.

Verbesserungen müssen sicherlich noch realisiert werden, gerade bei der Bestimmung des Massenflusses des Spikes. Die experimentelle Verwirklichung einer solchen MSIVA wäre denkbar einfach, da keine Veränderungen an der GE-Apparatur vorgenommen werden müssen. Gerade für bioanalytische Fragestellungen, in welchen die Analyten in vielen Fällen noch nicht genau identifiziert sind, könnte diese spezies-unspezifische MSIVA hilfreiche Dienste bei der Quantifizierung leisten.

### **IV.3.5 Anwendung auf DNA-Fragmente**

Um zu überprüfen, ob die entwickelte Methode prinzipiell auch dazu geeignet ist, Cisplatin-Addukte mit längeren, doppelsträngigen DNA-Fragmenten zu untersuchen, wurde ein exemplarisches Experiment durchgeführt. Sollte dieses Experiment erfolgreich sein, so würde dies die herausragende Eigenschaft der GE-ICP-MS unterstreichen, Cisplatin-DNA-Addukte ohne vorherige Aufarbeitung, wie einem enzymatischen Verdau, zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde ein DNA-Standard mit 11 verschiedenen Fragmenten für 2 Stunden mit Cisplatin inkubiert und direkt im Anschluss mit der GE-ICP-MS untersucht. Dieser DNA-Standard wurde bereits in den ersten beiden Teilen dieser Arbeit unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht. Die Trennbedingungen wurden für dieses Experiment beibehalten, da hiermit ein sehr gutes Trennergebnis erzielt werden konnte (vgl. Abbildung 24). Das Ergebnis der Trennung der mit Cisplatin behandelten DNA-Fragmente ist in Abbildung 69 zu sehen.

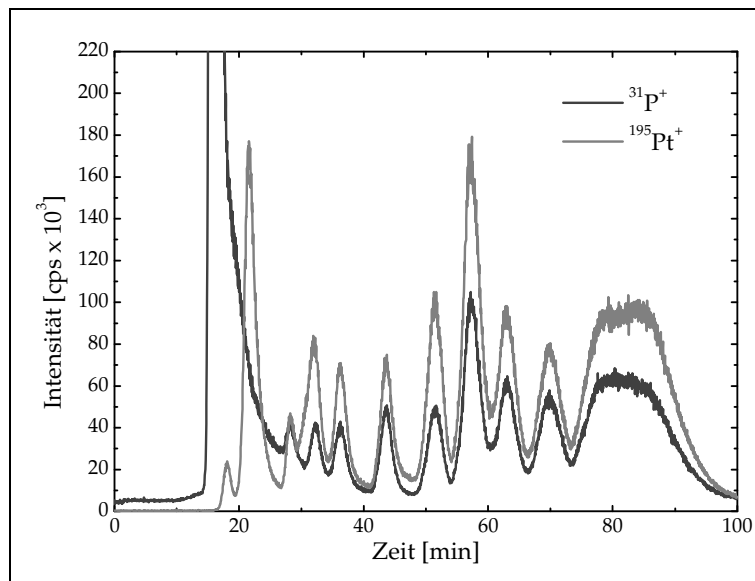


Abbildung 69: Untersuchung eines Inkubats (2h) von verschiedenen DNA-Fragmenten mit Cisplatin<sup>187</sup>

Die gezeigte Abbildung ist aus mehrerer Hinsicht sehr interessant. Zunächst kann festgestellt werden, dass alle DNA-Fragmente Cisplatin gebunden haben, was an der Koelution von Phosphor und Platin bei jeder eluierenden Fraktion festgemacht werden kann. Die Bindung von Cisplatin scheint aber nicht bei allen Fragmenten in gleichem Maße geschehen zu sein. Dieser Befund lässt sich damit erklären, dass nicht alle Fragmente die gleiche Sequenz aufweisen und somit in einigen DNA-Fragmenten bessere Bindungsmöglichkeiten bestehen als in anderen. Da die Sequenz der Fragmente nicht bekannt ist, kann nur gemutmaßt werden, dass die stärker bindenden einen höheren Anteil an Guanin und Adenin aufweisen.

Weiterhin fallen die Pt-haltigen Fraktionen auf, welche vor den DNA-Fragmenten eluieren und nicht einer bestimmten P-haltigen Fraktion zuzuordnen sind. Zwar liegen diese beiden Fraktionen zum Teil unterhalb des dominanten P-Signals zu Beginn, welches hervorgerufen wird durch Abbauprodukte der DNA-Fragmente, wie einzelnen Nukleotiden oder Oligonukleotiden, doch lässt sich hier keine spezifische Koelution nachweisen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass in der Probe Cisplatin-bindende Substanzen vorliegen, welche erst durch das Platin für das ICP-MS detektierbar gemacht werden.

<sup>187</sup> Gel: 40x2,2 mm, 2,2% AG; Elektrolyt: AA 0,05 M, pH=8; Injektion: 5 µL; U=200V

Beim Vergleich dieses Trennergebnisses mit dem der unbehandelten DNA-Fragmente fällt auf, dass die Bindung von Cisplatin das Migrationsverhalten der DNA-Fragmente deutlich beeinflusst, was sich nachteilig auf diese Trennung auswirkt.

Prinzipiell kann festgestellt werden, dass die Untersuchung von Cisplatin-DNA-Addukten mit der entwickelten Methode möglich ist. Zusammenfassend für dieses abschließende Experiment muss jedoch gesagt werden, dass es mehr Fragen aufwirft als dass es sie beantwortet. Doch wurde es nicht aus dem Grund mit in diese Arbeit aufgenommen, um das Thema der Untersuchung von Cisplatin-DNA-Addukten mittels der GE-ICP-MS abzuschließen. Vielmehr ist es eine wegweisende Perspektive zu verstehen, was in diesem Bereich noch alles möglich scheint. Dieser Faden soll in dem Ausblick am Ende dieser Arbeit nochmals aufgenommen werden.

Zuvor sollen die Ergebnisse dieses Kapitels kurz zusammengefasst werden.

### IV.3.6 Zusammenfassung

Ziel der diesem Kapitel zugrunde liegenden Untersuchungen war es, Cisplatin-Addukte mit Oligonukleotiden und DNA-Fragmenten mittels der GE-ICP-MS zu charakterisieren.

Es konnte anhand der Trennung und Detektion von Cisplatin-Addukten mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden gezeigt werden, dass eine Untersuchung solcher Verbindungen mit der GE-ICP-MS prinzipiell möglich ist. Die GE gewährleistet die Separation der Cisplatin-Addukte von dem entsprechenden freien Oligonukleotid sowie eine Separation von unterschiedlichen Addukten. Durch die Fähigkeit der ICP-MS zur simultanen Detektion von Phosphor und Platin konnte eine erste Zuordnung der aus der GE eluierenden Fraktionen getroffen werden. Da eine direkte Identifizierung hierdurch jedoch nicht möglich ist, wurden verschiedene Strategien angewandt, um sich einer solchen anzunähern.

Hier kamen zunächst die inhärenten Möglichkeiten des Systems, die Elementdistribution in einer Fraktion semi-quantitativ zu ermitteln, zum Einsatz. Durch die Bestimmung des molaren P/Pt-Verhältnisses konnte die Aussage darüber getroffen werden, dass in den beiden Addukten jeweils ein Cisplatin an das Oligonukleotid gebunden vorlag. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Cisplatin-Addukt als Intermediat bei der Bildung des zweiten Addukts anzusehen ist. Hieraus wurde geschlossen, dass in dem Inkubat sowohl die monovalente als auch die

bivalente Form des Addukts zu finden sind. Dieser Befund war für ein Oligonukleotid mit einer GpG-Sequenz nicht weiter verwunderlich, für eines ohne eine solche hingegen schon.

Um die aus den Ergebnissen mit der GE-ICP-MS erhaltenen Resultate zu verifizieren, wurde eine komplementäre Form der Massenspektrometrie zum Einsatz gebracht. Da eine Identifizierung mittels der ICP-MS hinsichtlich der Molekülstruktur *per se* nicht möglich ist, wurde der Versuch angestellt, die Cisplatin-Addukte mit der MALDI-TOF-MS zu identifizieren. Hierbei wurde zunächst das reine Inkubat untersucht, um die Existenz der vermuteten Addukte nachzuweisen, was in allen Fällen gelang. Sodann wurden die aus GE erhaltenen Fraktionen analysiert, um diesen die entsprechenden Addukte zuordnen zu können. Es hat sich gezeigt, dass die mittels der GE-ICP-MS erhaltenen Resultate gestützt werden können und in den Fraktionen die vermuteten mono- und bivalenten Addukte nachzuweisen waren. Es hat sich jedoch auch gezeigt, dass quantitative Aussagen mit der MALDI-TOF-MS nur sehr eingeschränkt möglich sind, was den Einsatz der ICP-MS für solche Zwecke in den Vordergrund hebt.

In diesem Zusammenhang wurde versucht, eine absolute Quantifizierung der Cisplatin-Oligonukleotid-Addukte unter Einsatz der spezies-unspezifischen Isotopenverdünnungsanalyse, welche bekanntermaßen präzise und richtige Ergebnisse zu produzieren in der Lage ist, zu realisieren. Die prinzipielle Möglichkeit für ein solches Vorgehen wurde an einem Beispiel demonstriert.

Abschließend wurden DNA-Fragmente zwischen 100 und 1000 bp mit Cisplatin inkubiert und mit dem entwickelten System untersucht. Es hat sich gezeigt, dass das entwickelte System grundsätzlich dazu in der Lage ist, solche Analyten ohne weitere Aufbereitung zu analysieren. Es müssen jedoch vielerlei Effekte berücksichtigt werden, was nur durch umfangreiche systematische Arbeiten auf diesem Gebiet bewerkstelligt werden kann.

Zusammenfassend für dieses Kapitel lässt sich sagen, dass durch die Untersuchung von Cisplatin-Addukten die hervorragenden analytischen Eigenschaften der *hyphenated techniques* im Allgemeinen und die der GE-ICP-MS im Besonderen in ihrer ganzen Breite eindrücklich demonstriert werden konnten und gleichzeitig der Weg für zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet eröffnet wurde.

## V Schlussbetrachtung

Bevor im Rückgriff auf das Kapitel I dieser Arbeit die Frage beantwortet werden soll, ob dem hier formulierten Anspruch genüge getan werden konnte, sollen zunächst die Erkenntnisse der drei Hauptteile dieser Arbeit nochmals zusammengefasst und inhaltlich zusammengeführt werden.

Ausgangspunkt war die Frage, ob es möglich ist, die Gelelektrophorese (GE) in einem Online-Verfahren an die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) zu koppeln. Diese Frage wurde hergeleitet aus der Tatsache, dass dieses für alle etablierten Trenntechniken bereits verwirklicht wurde und substanzielle wissenschaftliche Arbeit mit diesen Online-Kopplungen durchgeführt werden kann. Nur die bioanalytisch bedeutsamste Trenntechnik, die GE steht außerhalb dieser Methodologie, da sie bislang nur über den umständlichen Umweg der Laserablation mit der ICP-MS in eine apparative Verbindung gebracht wurde. Zu demonstrieren, dass dieser Mangel behoben werden kann, war Bestandteil des ersten Hauptkapitels.

Hierzu wurde zunächst die allgemeine Konzeption einer GE-ICP-MS dargestellt, welche auf der kontinuierlichen Elution der Analyten aus dem Gel während der laufenden Elektrophorese beruht. Die genaue apparative Verwirklichung wurde im Detail erläutert sowie alle mit dieser neuen Technik zusammenhängenden Arbeitsschritte. Anhand verschiedener Testsubstanzen konnte demonstriert werden, dass mit der GE-ICP-MS prinzipiell analytisch verwertbare Signale erhalten werden können und dieses durchaus vergleichbar mit flüssigchromatographischen Kopplungsmethoden.

Anhand eines DNA-Standards wurde die entwickelte GE-ICP-MS systematisch untersucht. So wurden die verschiedenen Einflussfaktoren, welche für eine effektive Trennung verantwortlich sind, identifiziert, die Trennleistung optimiert und verifiziert, Reproduzierbarkeiten evaluiert sowie Empfindlichkeit und Nachweisgrenze bestimmt. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die GE-ICP-MS durchaus den strengen Qualitätskriterien einer *hyphenated technique* genügen und sinnvoll in deren Methodologie eingefügt werden kann.

Besonders vorteilhaft im Vergleich zu anderen Kopplungstechniken kann für die GE-ICP-MS angeführt werden, dass durch die isokratische Elution mit verdünnten, wässrigen Lösungen bei Flussraten im Bereich um  $100 \mu\text{L min}^{-1}$ , welche *per se* kaum Einfluss auf die Trennleistung besitzt, ideale Voraussetzungen vorliegen, um eine störungsfreie Detektion mit dem ICP-

MS zu gewährleisten. Zusätzlich erlauben die Dimensionen der GE die Untersuchungen von Probenvolumina im unteren  $\mu\text{L}$ -Bereich, was für die Detektion mit dem ICP-MS als massenfluss-empfindlichen Detektor hinsichtlich relativer Nachweisgrenzen ebenfalls als sehr vorteilhaft anzusehen ist.

Als nachteilig müssen jedoch die im Vergleich mäßige Trennleistung sowie relativ hohe Gesamtdauer einer Analyse, auch wenn diese noch weit unter der der LA-GE-ICP-MS liegt, benannt werden.

Im zweiten Hauptteil dieser Arbeit wurde sodann der erste Einsatz der GE-ICP-MS für eine wissenschaftlich relevante Fragestellung erläutert. Wie ausführlich dargelegt wurde, besteht der dringende Bedarf seitens der Bioanalytik an einer Methode zur richtigen und präzisen DNA-Quantifizierung. Diese Fragestellung wurde als ideales Betätigungsfeld für die GE-ICP-MS erkannt, da die GE einerseits das Trennmedium zur Trennung von DNA-Fragmenten darstellt und der ICP-MS andererseits exzellente Eigenschaften hinsichtlich quantitativer Fragestellungen zuzuschreiben sind.

So wurde zunächst eine Methode entwickelt, wie mittels der GE-ICP-MS eine Quantifizierung von DNA-Fragmenten zu verwirklichen ist. Als Kalibrationsmethode wurde die externe Kalibration mit einem quantitativen DNA-Standard gewählt. Um die Angabe des Gehalts an DNA in dem Standard zu überprüfen, wurde die DNA in dem Standard mit Perchlorsäure hydrolysiert und das so freigesetzte Phosphat per Standardaddition bestimmt. Selbst unter der Voraussetzung, dass der gesamte Phosphor in dem Standard in der DNA gebunden vorlag, konnten nur maximal 86% der angegebenen Menge an DNA gefunden werden. Zur Validierung der Quantifizierung von DNA über den Phosphatgehalt wurden zwei verschiedene zertifizierte Standardreferenzmaterialien nach diesem Vorgehen untersucht, was zur Verifizierung der angewandten Methode beitragen konnte. Mittels des so charakterisierten quantitativen DNA-Standards konnte die Quantifizierung verschiedener DNA-Fragmente durchgeführt werden, wobei hier ebenfalls Diskrepanzen zwischen der Herstellerangabe und den gefundenen Werten festgestellt werden mussten.

Insgesamt konnte das Potential der GE-ICP-MS für die dringend notwendige quantitative Bestimmung von DNA-Fragmenten und weiteren Biopolymeren in diesem Kapitel eindrücklich demonstriert werden. Die ICP-MS bietet mitunter ideale Voraussetzungen für die Quantifizierung von biologisch relevanten Verbindungen, sie muss nur auch dementsprechend eingesetzt werden. In der Kombination mit der GE besteht zudem die Möglichkeit, Mischungen aus Makromolekülen ohne zeitaufwändige und

kontaminations-gefährdete Aufarbeitungsschritte direkt mit der ICP-MS zu analysieren.

War in den ersten beiden Hauptteilen das Element Phosphor hauptsächlich im Fokus des Interesses, so kam im dritten und letzten Hauptteil ein weiteres Element hinzu: das Platin. Wie in den Grundlagen zu diesem Teil dargelegt wurde, spielen Cisplatin-DNA-Addukte immer noch eine große Rolle, wenn es um das Verständnis der Wirkungsmechanismen des Cisplatins und seiner Analoga geht. Über die Relevanz einer so orientierten Forschung müssen wenige Worte verloren werden, da die Erforschung von Zytostatika als eine der wichtigsten Aufgaben auch noch in einem neuen Jahrtausend zu sehen ist.

Aus analytischer Sicht eignen sich diese Cisplatin-DNA-Addukte sehr gut, um die Leistungsfähigkeit einer Methode innerhalb der *hyphenated techniques* voll unter Beweis zu stellen. Daher wurde eine Oligonukleotid mit Cisplatin inkubiert und die Reaktionsprodukte mit der GE-ICP-MS untersucht. Zwei dominante Cisplatin-Addukte konnten gefunden werden, jedoch war die Existenz einiger anderer noch zu vermuten. Zur Identifizierung dieser beiden Addukte wurden zunächst mit der GE-ICP-MS verschiedene Experimente angestellt, unter anderem eine kinetische Analyse, woraus später die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung bestimmter Addukte hervorging. Da hiermit jedoch keine eindeutige Identifizierung möglich war, wurde ein weiterer Bestandteil der modernen *hyphenated techniques* in die Methodik mit einbezogen: die MALDI-TOF-MS. Mittels dieser war es ein Leichtes, die vermuteten Addukte eindeutig nachzuweisen, was unter anderem in der Form einer Offline-GE-MALDI-TOF-MS geschah.

Zum Abschluss wurden wiederum die großartigen Möglichkeiten der ICP-MS zur Quantifizierung anhand einer spezies-unspezifischen massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) von Cisplatin-Addukten demonstriert. Es konnte gezeigt werden, dass diese spezies-unspezifischen MSIVA ganz problemlos mit der GE-ICP-MS zu verwirklichen ist und damit richtige Resultate erzielt werden können.

Durch die Analyse der Cisplatin-Addukte konnte gezeigt werden, dass die GE-ICP-MS sich in besonderem Maße dafür eignet, Komplexe aus Metallen und Makromolekülen quantitativ wie auch - in der Kombination mit der organischen Massenspektrometrie – qualitativ zu analysieren. Da nahezu keine Probenvorbereitung für die Analyse mit der GE-ICP-MS stattfinden muss, erlaubt sie selbst die Analyse von relativ kurzlebigen Spezies wie in diesem Teil der Arbeit demonstriert werden konnte.

Wie schon im Vorwort zu dieser Arbeit geschrieben, können die drei experimentellen Hauptteile dieser Arbeit für sich alleine stehen, obwohl sie letztlich aufeinander aufbauen. Was aber noch viel wichtiger ist, und dieses soll hier vielleicht erstmals betont werden, sie umfassen den eigentlichen Kern dieser Arbeit, nämlich die Etablierung der GE-ICP-MS als eigenständige Kopplungsmethode. An dieser Stelle muss zurückgegriffen werden auf die einleitenden Worte im Kapitel I. Es sollte mit dieser Arbeit belegt werden, dass eine Online-Kopplung zwischen Gelelektrophorese und ICP-MS prinzipiell möglich ist. Dieses konnte letztendlich schon mit im ersten Teil bewiesen werden. Was aber eigentlich darunter verstanden wurde, dass eine Methode funktioniert, sollte im Zusammenspiel der drei Teile verdeutlicht werden. Es ist gelungen, in verschiedene Anwendungsgebiete mit eigenen Fragestellungen vorzudringen, ohne dass die Eigenheiten der Methode zu sehr in Mitleidenschaft gezogen wurden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass ein umfangreiches Spektrum an Möglichkeiten für den sinnvollen Einsatz der GE-ICP-MS nicht nur in der Bioanalytik gefunden werden kann. Die GE für sich alleine genommen gestaltet sich so variantenreich, die Massenspektrometrie bildet nicht umsonst das Rückgrat der modernen, instrumentellen Analytik und die Fragestellung, welche an die Analytik herangetragen werden, erfordern soviel Innovation, dass die hier beschriebenen Arbeiten hoffentlich als Ausgangspunkt für ein auch in Zukunft interessantes Betätigungsfeld dienen können.

Auch im Vorgriff auf den noch folgenden Ausblick muss ganz klar festgestellt werden, dass mit der vorliegenden Arbeit das Gebiet „Online-Gelelektrophorese-Massenspektrometrie“ nur oberflächlich angekratzt wurde und noch eine Vielzahl verschiedenster Entwicklungen zu realisieren ist.

Aber, und damit soll diese Arbeit geschlossen werden, es wurde angekratzt.



## VI Ausblick

Nahtlos an die vorangegangene Schlussbetrachtung anschließend soll hier in aller Kürze geschildert werden, was nach Meinung des Autors an wissenschaftlichen Entwicklungen aus dieser Arbeit heraus folgen könnte.

Nun, da die prinzipielle Funktionstüchtigkeit einer GE-ICP-MS-Kopplung demonstriert werden konnte, sollten alle Möglichkeiten der 1-dimensionalen GE ausgeschöpft werden. Hier wird gedacht an diskontinuierliche Gelsysteme, welche aus zwei verschiedenen konzentrierten Gelen mit unterschiedlichen pH-Werten aufgebaut sind. Ein solches Vorgehen kann eine Aufkonzentration der Probe in dem Gel („stacking“) gewährleisten, was gerade für die GE-ICP-MS von großem Vorteil wäre. Aber auch Gradientengele mit einer kontinuierlich veränderten Gelzusammensetzung könnten zu einer verbesserten Trennleistung beitragen.

Eine weitere Idee könnte die Verwirklichung einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) im Online-Betrieb sein. Es ist vorzustellen, dass zunächst eine klassische IEF in dem entwickelten System durchgeführt wird unter Zuhilfenahme mobiler Ampholyten und einem pH-Gradienten. Nach erfolgter Fokussierung sollte durch Veränderung der Pufferzusammensetzung in dem System eine Mobilisierung der Analyten in Richtung der Elutionsregion möglich sein. Besonders für Proteine könnte ein solches Vorgehen ein hohes Maß an Trenneffizienz gewährleisten.

Konsequent weitergedacht müsste sich das System jedoch auch in eine andere Richtung entwickeln, nämlich in die Richtung der Kapillargelelektrophorese (CGE). Zwar wären hiermit wiederum die oft beschriebenen Nachteile eines kapillar-basierenden System verbunden, was bei der CGE vielleicht durch mögliche „stacking“-Verfahren abgemildert werden könnte. Die Trennleistung der CGE ist jedoch so phänomenal gut, dass zumindest der Versuch unternommen werden müsste, eine solche Kopplung zu realisieren.

Natürlich darf eine weitere Kopplung nicht länger auf sich warten lassen, da hieraus große Vorteile zu erwarten sind: die GE-ESI-MS. Einer der größten Vorteile der Online-GE liegt in der Tatsache begründet, dass die Trennung fast vollständig unabhängig ist von dem Elutionsmittel. Dieser Vorteil sollte gerade bei der Kopplung an die ESI-MS in besonderem Maße zum Tragen kommen, da die Ionisierungseffizienz in der ESI-Quelle sehr stark von dem eingetragenen Eluenten abhängt. Selbst eine parallele ICP/ESI-MS-Detektion ließe sich mit der GE als Trennmedium wesentlich besser verwirklichen als mit bestehenden HPLC- oder CE-Kopplungen.

Neben diesen instrumentellen Entwicklungen muss selbstverständlich auch die Seite der untersuchten Analyten weiter ausgebaut werden. Hier besteht dringend der Bedarf die begonnenen Arbeiten zur DNA-Quantifizierung weiter voran zu treiben. Die ICP-MS gewährleistet beste Voraussetzungen zur präzisen und richtigen Quantifizierung, welche gerade in diesem bioanalytischen Bereich besonders wertvoll sind.

Die GE-ICP-MS bietet ideale Möglichkeiten um Interaktionen von Metallen mit Biopolymeren zu studieren, da sehr schonende Trennbedingungen angewandt werden können sowie nur minimale Probenvorbereitungsschritte durchzuführen sind. Dieser Vorteil sollte genutzt werden.

Aber auch wesentlich kleinere Elementspezies, wie beispielsweise niedermolekulare Metallkomplexe, sollten mit dem entwickelten System untersucht werden, da noch kaum Erfahrung hinsichtlich des Verhaltens solcher Analyten in der GE bestehen und vielleicht ganz überraschende Erkenntnisse zu gewinnen sind.

## VII Anhang

### VII.1 Theoretische Betrachtungen zur Gelelektrophorese

Die Einführung der Elektrophorese als analytisch-chemischer Methode wird dem Schweden Arne Tiselius (1902-1971) zugeordnet, wofür er im Jahre 1948 auch den Nobelpreis erhielt.

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von geladenen Teilchen in flüssigen Medien unter Einwirkung eines elektrischen Feldes. Unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Teilchen werden hervorgerufen durch Ladung, Größe, Form und Umgebung der Teilchen<sup>188</sup>. Diese Tatsache soll im Folgenden kurz theoretisch erläutert werden.

Befindet sich ein geladenes Teilchen mit der Ladung  $q$ , welche sich zusammensetzt aus der Anzahl der effektiven Ladungen  $z$  und der Elementarladung  $e$ , in einem elektrischen Feld der Feldstärke  $E$  (V/cm), so wirkt folgende beschleunigende Kraft  $F_e$ :

$$F_e = q \cdot E = z \cdot e \cdot E$$

Bewegt sich ein geladenes Teilchen mit dem Radius  $r$  (unter der Annahme einer kugelförmigen Gestalt) mit der Geschwindigkeit  $v$  in einem Medium der Viskosität  $\eta$ , so wirkt auf dieses eine retardierende Kraft  $F_r$ :

$$F_r = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

Im Gleichgewicht ist die Summe beider Kräfte gleich Null, woraus sich für die elektrophoretische Geschwindigkeit  $v$  ergibt:

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Als spezifische Größe für ein Teilchen lässt sich daraus die elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$  herleiten:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

---

<sup>188</sup> ANDREWS (1988)

Dieser Ausdruck für die elektrophoretische Mobilität enthält die beiden wichtigsten substanz-spezifischen Größen Ladung und Radius. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass es sich hierbei um einen ausgesprochen theoretischen Ausdruck handelt, da er für ein idealisiertes Teilchen in einem trägerfreien, unendlich verdünntem und praktisch salzfreien Medium hergeleitet wurde. In realen Systemen müssen zusätzlich folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- i. der Einfluss der Hydrathülle und der Ionenatmosphäre auf Größe und Ladung des Teilchens
- ii. der Dissoziationsgrad bei schwachen Elektrolyten
- iii. die Wechselwirkung der Analytionen mit den Ionen des Elektrolytmediums
- iv. Relaxationseffekte durch die Ionenhülle

Neben diesen Effekten, welche bei allen Arten der Elektrophorese auftreten, müssen bei der Gelelektrophorese zusätzlich noch die Wechselwirkungen mit dem Gel, wie der molekulare Siebeffekt oder der elektroendosmotische Effekt, berücksichtigt werden.

Der molekulare Siebeffekt ist die zentrale Trenneigenschaft der Gelelektrophorese und wird durch das Gelmaterial selbst hervorgerufen. Liegt die Porengröße des Gels im Bereich der Größe der Analyten, so kommt es zu einer Retardation derselben. In erster Näherung kann hiermit also eine Trennung nach Molekulargewicht erreicht werden, wobei die dreidimensionale Struktur der Moleküle natürlich maßgeblich für die Trennung ist.

Im Prinzip finden in der modernen GE zwei Materialien zur Herstellung von Gelen Anwendung: die Agarose und das Polyacrylamid.

Bei der Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydrogalactose, welche glycosidisch miteinander verknüpft sind. Agarose ist letztlich ein Naturprodukt und wird vornehmlich aus Rotalgen gewonnen. Die auf dem Markt erhältlichen Agarosen unterscheiden sich in dem Grad ihrer Reinheit und der möglichen Porengrößen im präparierten Gel. Die Porengröße wird bei Agarosegelen durch den Anteil an Agarose in der flüssigen Phase eingestellt. Agarosegele eignen sich sehr gut zur Trennung von DNA-Fragmenten, aber auch von größeren Proteinen (> 60 kDa).

Im Gegensatz zur Agarose handelt es sich bei Polyacrylamid um ein gänzlich artifiziell hergestelltes Polymer. Polyacrylamidgele werden

hergestellt aus den Monomeren Acrylamid und Bisacrylamid, welches als Quervernetzer fungiert. Polyacrylamidgele zeichnen sich durch eine außerordentliche Stabilität aus und sind besonders gut für die Trennung von Proteinen geeignet, da die Porengröße generell kleiner ist als bei Agarosegelen. Bei Polyacrylamidgelen wird die Porengröße einerseits durch den Anteil an Monomer und Vernetzer in der flüssigen Phase eingestellt (T-Wert), andererseits durch das Verhältnis zwischen Monomer und Vernetzer (C-Wert).

In einem besonderen Punkt unterscheiden sich die Polyacrylamidgele ebenfalls von den Agarosegelen. Bei der Gelelektrophorese tritt einem dem elektroosmotischen Fluss vergleichbares Phänomen auf: die Elektroendosmose. In der Gelmatrix finden sich fixierte negative Ladungen, hervorgerufen durch Carboxyl- oder Sulfonsäuregruppen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes bildet sich ein elektroosmotischer Fluss in Richtung der Kathode. Dieser Fluß ist bei Weitem nicht so ausgeprägt wie beispielsweise in der CE, jedoch kann er Trennung von Anionen sehr negativ beeinflussen. Daher zeigen Gelmaterialien mit niedriger Elektroendosmose bessere Trenneigenschaften, was für das Polyacrylamid im Vergleich zu herkömmlichen Agarosen zutrifft. Jedoch sind mittlerweile spezielle Agarosen erhältlich, welche praktisch keine Elektroendosmose mehr zeigen.

Insgesamt ist die Ionenbeweglichkeit in der Gelelektrophorese also von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, was sich praktisch in der Tatsache manifestiert, dass sich sehr viele Systemvariablen zur Verwirklichung einer effektiven Trennung verändern lassen.

So stellt die eindimensionale Trennung in einer homogenen Gelmatrix nur die einfachste Form der GE dar. Das Gel kann genauso gut aus zwei Abschnitten unterschiedlicher Geldichte und pH-Werts sein (Disk-GE) oder eine kontinuierliche Veränderung der Porengröße aufweisen (Gradienten-GE). Ebenso ist es möglich, in einem Gel eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchzuführen, wo durch Ausbildung eines pH-Gradienten Ampholyte an ihrem isoelektrischen Punkt immobilisiert werden können. Gerade für die Trennung von Proteinen hat sich der Zusatz von Detergenzien, wie beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS), als sehr hilfreich erwiesen, da den Proteinen hiermit zu einer einheitlichen Ladung und einen vergleichbaren räumlichen Struktur verholfen werden kann. Die Kombination dieser beiden letztgenannten Verfahren führt schließlich zu 2-dimensionalen GE (2D-GE), ohne welche die moderne Proteomanalyse undenkbar wäre.

## VII.2 Kurze Einführung der ICP-SFMS

Die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie hat sich seit ihrer Entwicklung in den frühen 80er Jahren zu einer der wichtigsten elementanalytischen Methoden im Spuren- und Ultraspurenbereich entwickelt. Dieses gilt sowohl für die analytisch ausgerichtete Forschung als auch für die Routineanalytik in der chemischen Industrie.

Diese rasante Entwicklung entspringt der Tatsache, dass sich die ICP-MS durch vielerlei Vorzüge auszeichnet. So kann sie als Multielementmethode mit der zusätzlichen Fähigkeit zur Isotopenanalyse beschrieben werden. Weiterhin zeichnet sie sich durch ein hohes Maß an Empfindlichkeit und Präzision aus sowie einer außerordentlichen Robustheit. Besonderes relevant für umwelt- und bioanalytische Fragestellungen kann die weitere Eigenschaft der ICP-MS angesehen werden, dass sie sehr einfach mit diversen Separationsmethoden zu verbinden ist.

Prinzipiell gewährleistet das ICP als Ionisierungsquelle die Verdampfung, Atomisierung und Ionisierung aller in das ICP eingebrachten Probenbestandteile. Durch Beschleunigung dieser Ionen in den Massenseparator, entsprechender Trennung der Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis und abschließender Detektion der Ionenströme kann eine Probe hinsichtlich ihrer elementaren Zusammensetzung analysiert werden. Soweit das allgemeine Prinzip der ICP-MS. Für weitergehende Ausführungen sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen<sup>189,190,191</sup>. Nur ein Punkt soll hier an dieser Stelle ausführlicher behandelt werden, da er in besonderem Maße für diese Arbeit von Relevanz war.

Ein allgegenwärtiges Problem bei der ICP-MS sind die spektralen Interferenzen. Bei diesen spektralen Interferenzen handelt es sich um die Überlagerungen des Signals eines bestimmten Isotops bei einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis mit anderen Signalen, welche nicht durch die Anwesenheit dieses Isotops in der Probe hervorgerufen werden. Nichtsbeachtung dieser Überlappungen führt zwangsläufig zu einer Fehlinterpretation des Massenspektrums und daher zu falschen analytischen Ergebnissen.

---

<sup>189</sup> JARVIS, GRAY und HOUK (1992)

<sup>190</sup> MONTASER (1998)

<sup>191</sup> BEAUCHEMIN (2004) *Anal. Chem.* **76**, 3395

Hervorgerufen werden diese spektralen Interferenzen durch folgende drei Phänomene:

- i. isobare Isotope verschiedener Elemente,
- ii. mehrfach geladene Ionen,
- iii. Molekülionen.

Zu spektralen Interferenzen durch isobare Isotope kann es kommen, wenn in einer Probe zwei Elemente vorliegen, welche jeweils ein Isotop mit gleicher nominaler Masse besitzen. Beispiele hierfür wäre  $^{54}\text{Cr}$  und  $^{54}\text{Fe}$  oder  $^{58}\text{Fe}$  und  $^{58}\text{Ni}$ . Mehrfach geladene Ionen können ebenfalls zu einer spektralen Überlappung des interessierenden Isotopensignals beitragen, wie an der Anwesenheit von Barium bei der Bestimmung von Gallium verdeutlicht werden soll. Barium mit einer sehr niedrigen 2. Ionisierungsenergie kann im Plasma zweifach geladene Ionen bilden, so auch das  $^{138}\text{Ba}^{2+}$ . Dieses besitzt annähernd das gleiche  $m/z$ -Verhältnis wie  $^{69}\text{Ga}^+$ , dem eigentlichen Analyt.

Das größte Problem stellen jedoch die spektralen Interferenzen dar, welche durch Molekülionen hervorgerufen werden, da diese ausgesprochen vielfältig sein können. Größtenteils entstehen diese Molekülionen nicht aus der Probe heraus, sondern aus den anderen Plasmaeinträgen, wie den Plasmagasen und den Lösungsmitteln<sup>192</sup>. So finden sich beispielsweise auf der nominalen Masse von Phosphor eine Reihe von unterschiedlichen Interferenzen, abhängig von dem jeweiligen Lösungsmittel. Als Beispiel sei hier in Abbildung 70 das Massenspektrum einer wässrigen Lösung von Phosphat ( $61,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und Natriumhydrogencitrat ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) mit den Zusätzen Methanol (10% w/w) und Tetrabutylammoniumhydroxid (0,04% w/w) gezeigt<sup>193</sup>.

---

<sup>192</sup> TAN und HORLICK (1986) *Appl. Spectr.* **40**, 445

<sup>193</sup> HELFRICH und BETTMER (2004) *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 1330

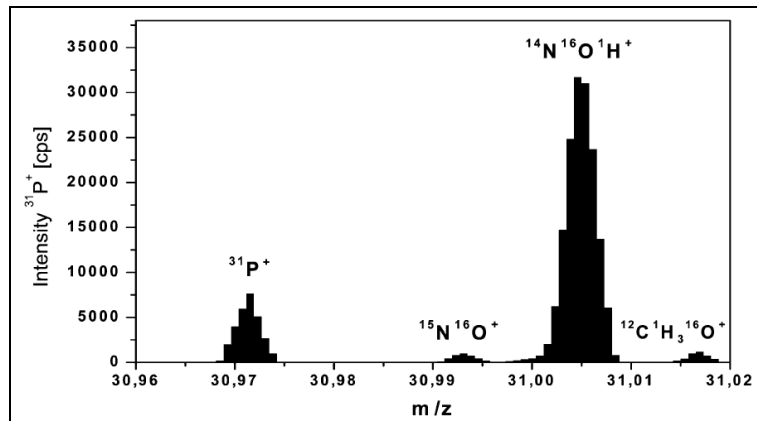


Abbildung 70: Beispiel für ein Massenspektrum auf der nominalen Masse 31 bei einer Massenauflösung  $R$  von 4.000 [aus 193]

Bei hohen Gehalten an Metallen kann es jedoch auch zu Molekülonen in Form von Oxiden oder Argonverbindungen kommen<sup>194</sup>.

Wie kann nun verhindert werden, dass durch diese spektralen Interferenzen analytische Ergebnisse verfälscht werden? Da nicht für jedes Element ein Isotop existiert, welches sich interferenzfrei bestimmen lässt, musste hierfür ein Weg gefunden werden.

Die eleganteste Möglichkeit ist natürlich, das Prinzip der sowieso schon vorhandenen Massenseparation zu verfeinern. Für alle spektralen Interferenzen gilt, dass niemals eine exakte Massengleichheit vorliegt. Jedes Isotop und daher auch jedes zweifach geladene Ion bzw. jedes Molekülon besitzt eine eigene absolute Masse, die mit keinem anderen Isotop übereinstimmt. Die Frage ist nur, ob die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Ionen groß genug sind, um sie mittels eines Massenseparators quantitativ voneinander zu trennen. In diesem Zusammenhang wird als Kenngröße für die Effektivität eines Massenseparators der Begriff der Massenauflösung  $R$  ( $m/\Delta m$ ) genutzt. In der Tabelle 26 sind beispielhaft einige Paare aus Zielisotop und Interferenz angegeben sowie die notwendige Auflösung, welche man benötigt, um eine Abtrennung der Interferenz durchzuführen.

<sup>194</sup> EVANS und GIGLIO (1993) *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 1



**Tabelle 26: Notwendige Massenauflösung R für die Abtrennung verschiedener spektraler Interferenzen**

Zielisotop	Interferenz	R
$^{31}\text{P}^+$	$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	1.500
$^{32}\text{S}^+$	$^{16}\text{O}_2^+$	1.800
$^{52}\text{Cr}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	2.400
$^{56}\text{Fe}^+$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	2.500
$^{63}\text{Cu}^+$	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$	5.000
$^{75}\text{As}^+$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	7.800
$^{80}\text{Se}^+$	$^{40}\text{Ar}_2^+$	9.700

In der Tabelle ist jeweils nur eine Interferenz pro Zielisotop angegeben, was jedoch nicht als vollständige Darstellung zu verstehen ist, da wie bereits gezeigt verschiedene Interferenzen auf einer nominalen Masse vorliegen können.

Massenseparatoren, welche sich der Technik eines Quadrupols bedienen und im überwiegenden Teil der kommerziellen ICP-MS-Geräte eingebaut sind, erreichen eine Massenauflösung von 300. Zur Abtrennung von spektralen Interferenzen reicht dies nicht aus, wie die Tabelle 26 eindrücklich verdeutlicht.

Für die interferenzfreie Bestimmung der in dieser Tabelle angegebenen Isotope mit dem ICP als Ionisierungsquelle kann ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer (SFMS) eingesetzt werden, was für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen auch getan wurde. Der Aufbau des verwendeten ICP-SFMS (Element 2, Thermo Finnigan) ist in Abbildung 71 schematisch dargestellt.

Das doppelfokussierende Sektorfeld-Massenspektrometer besteht aus einem magnetischen Sektorfeld, an welches ein elektrisches Sektorfeld anschließt. Diese Anordnung wird auch als inverse Nier-Johnson-Geometrie bezeichnet. Die Ionen, welche im Plasma entstehen, werden in der Ionenoptik zu einem Ionenstrom geformt. Dieser Ionenstrom wird in dem magnetischen Sektorfeld zunächst hinsichtlich der  $m/z$ -Verhältnisse fokussiert. Dieses ist möglich, da Ionen als geladene Teilchen durch das Magnetfeld beeinflusst werden und daher Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnissen das magnetische Sektorfeld auf unterschiedlichen Bahnen passieren und es an verschiedenen Punkten verlassen. Da Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis jedoch eine unterschiedliche kinetische Energie aufweisen können, werden diese auf verschiedene Punkte fokussiert, woraus eine unzureichende Auflösung resultieren würde. Daher schließt sich mit

dem elektrischen Sektorfeld eine Fokussierung hinsichtlich der kinetischen Energie von Teilchen mit gleichen  $m/z$ -Verhältnissen an, welche dadurch erreicht wird, dass diese Teilchen durch das entsprechende elektrische Feld auf eine einheitliche Flugbahn gezwungen werden, obwohl an unterschiedlichen Punkten in das elektrische Sektorfeld eintreten.

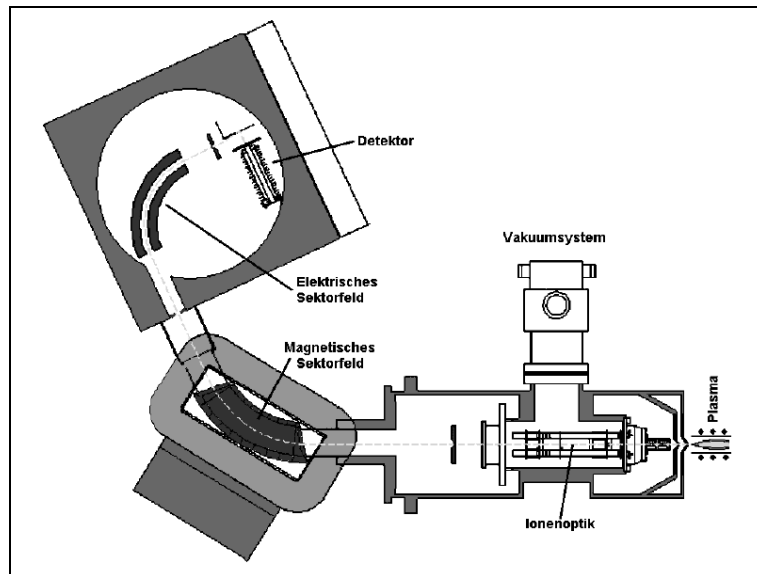


Abbildung 71: Schematischer Aufbau eines ICP-SFMS (Element 2, Thermo Finnigan)

Das Gerät bietet die Wahlmöglichkeit zwischen drei verschiedenen Massenauflösungen, welche da wären: niedrig ( $m/\Delta m = 300$ ), mittel ( $m/\Delta m = 4.000$ ) und hoch ( $m/\Delta m = 10.000$ ), wobei die Massenauflösung von 10.000 noch nicht das Limit für SFMS-Geräte im Allgemeinen darstellt. Die Einstellung der Massenauflösung erfolgt durch die Veränderung der Breite des Eintrittsspalts für den Ionenstrom, welcher sich zwischen der Ionenoptik und dem magnetischen Sektorfeld befindet.

Für die interferenzfreie Bestimmung von  $^{31}\text{P}^+$  ist die Massenauflösung von 4.000 zu wählen. Eine höhere Massenauflösung wäre in diesem Fall wenig sinnvoll, da diese durch die Verkleinerung des Eintrittsspalts zwangsläufig mit einer verminderten Transmission verknüpft ist, woraus ein Verlust an Empfindlichkeit resultiert.

Neben der ICP-SFMS existieren noch andere Möglichkeiten gewisse Interferenzen gezielt zu unterdrücken, doch darüber soll hier nicht weiter berichtet werden. Hierfür sei auf die Literatur verwiesen<sup>195,196</sup>.

---

<sup>195</sup> BARANOV und TANNER (1999) *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1133

<sup>196</sup> TANNER et. al. (2002) *Spectrochim. Acta B* **57**, 1361

## VII.3 Verwendete Chemikalien

### VII.3.1 Agarosen

MetaPhor® Agarose (Cambrex, Rockland, USA)

SeaKem® Agarose (Cambrex, Rockland, USA)

NuSieve® Agarose (Cambrex, Rockland, USA)

### VII.3.2 DNA-Fragmente und Oligonukleotide

DNA QuantLadder® (Cambrex, Rockland, USA)

DNA Ladder 100 bp (lyophilisiert) (Applichem, Darmstadt)

DNA Ladder 100 bp equalized (lyophilisiert) (Applichem, Darmstadt)

Oligonukleotide (entsalzt) (Invitrogen, Karlsruhe)

### VII.3.3 Puffer-Komponenten

Ammoniumacetat, ACS Reagenz (Acros, Geel, Belgien)

Borsäure, Suprapur® (Merck, Darmstadt)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), DNase-, RNase-, Protease-frei (Acros, Geel, Belgien)

Natriumhydroxid, Suprapur® (Merck, Darmstadt)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), DNase-, RNase-, Protease-frei (Acros, Geel, Belgien)

### VII.3.4 Element-Standard-Lösungen

Calcium Standardlösung 1000 µg mL<sup>-1</sup> in HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Chrom Standardlösung 1000 µg mL<sup>-1</sup> in HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Eisen Standardlösung 1000 µg mL<sup>-1</sup> in HNO<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Kupfer Standard Titrisol® 2000 µg mL<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Magnesium Standardlösung 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Phosphor Specpure® 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in HNO<sub>3</sub> 5% (Alfa, Karlsruhe)

Platin Standardlösung 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

Rhodium AA-Standard 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in HCl 20% (Alfa, Karlsruhe)

Schwefel ICP Standard CertiPUR® 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Merck, Darmstadt)

Zink Standardlösung 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt)

### VII.3.5 Testsubstanzen

5'-Adenosintriphosphat (ATP) 98% (Acros, Geel, Belgien)

Bromphenolblau (BPB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Kaliumbromid Suprapur® (Merck, Darmstadt)

Kaliumiodat p.a. (Merck, Darmstadt)

Kaliumiodid Suprapur® (Merck, Darmstadt)

### VII.3.6 Zertifizierte Referenzmaterialien

IRMM-447 (freeze dried genomic DNA from *Listeria monocytogenes*) (IRMM, Geel, Belgien)

IRMM-449 (freeze dried genomic DNA from *Escherichia coli*) (IRMM, Geel, Belgien)

### VII.3.7 MALDI-Matrizen und Additive

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Anthranilsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Nicotinsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

3-Hydroxypicolinsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Diammoniumhydrogencitrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

### VII.3.8 Sonstige

Cisplatin (cis-Diamindichloroplatin(II)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Perchlorsäure p.a. 70-72% (Merck, Darmstadt)

Platin Spike (auf  $^{194}\text{Pt}$  angereichert) (Euriso-top, Saarbrücken)

Salpetersäure p.a. 65% (Acros, Geel, Belgien)

Salzsäure p.a. 37% (Acros, Geel, Belgien)

## VII.4 Verwendete Geräte

*Gelelektrophorese (GE)*

MiniPrepCell, Biorad, München

*Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)*

Element 2, Thermo Finnigan, Bremen

*Matrixunterstützte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeit-Massenspektrometrie*

*(MALDI-ToF-MS)*

Model 4800, Applied Biosystems, Darmstadt

## VIII Literatur

### *Monographien*

- ANDREWS, A.T. (1988): *Electrophoresis. Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*. 2. Auflage. Oxford University Press, New York
- CAMMAN, K. (Hrsg.) (2001): *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Spektrum, Heidelberg
- JARVIS, K.E., GRAY, A.L., HOUK, R.S. (Hrsg.) (1992): *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Chapman and Hall, New York
- LOTTSPEICH, F. (Hrsg.) (1998): *Bioanalytik*. Spektrum, Heidelberg
- MERIAN, E. (Hrsg.) (1984): *Metalle in der Umwelt – Verteilung, Analytik und biologische Relevanz*. Wiley-VCH, Weinheim
- MONTASER, A (1998): *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. Wiley-VCH, New York
- WESTERMEIER, R. (2005): *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. 4. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim

### *Zeitschriftenbeiträge*

- BAIK, M.H., FRIESNER, R.A. und LIPPARD, S.J. (2003): Theoretical Study of Cisplatin Binding to Purine Bases: Why Does Cisplatin Prefer Guanine over Adenine? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14082-14092
- BAKER, S.A. und MILLER-IHLI, N.J. (2000): Determination of cobalamins using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B* **55**, 1823-1832
- BANCROFT, D.P., LEPRE, C.A. und LIPPARD, S.J. (1990): <sup>195</sup>Pt NMR Kinetic and Mechanistic Studies of cis- and trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6860-6871
- BEAUCHEMIN, D. (2004): Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 3395-3416



- BECK, J.L., COLGRAVE, M.L., RALPH, S.F. und SHEIL, M.M. (2001): Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotide Complexes with Drugs, Metals, and Proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 61-87
- BECKER, J.S., BOULYGA, S.F., BECKER, J.S., PICKHARDT, C., DAMOC, E. und PRZYBYLSKI, M. (2003): Structural identification and quantification of protein phosphorylations after gel electrophoretic separation using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **228**, 985-997
- BECKER, J.S., ZORIY, M., BECKER, J.S., PICKHARDT, C. und PRZYBYLSKI, M. (2004): Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 149-152
- BECKER, J.S., ZORIY, M., BECKER, J.S., PICKHARDT, C., DAMOC, E., JUHACZ, G., PALKOVITS, M. und PRZYBYLSKI, M. (2005a): Determination of Phosphorus-, Copper-, and Zinc-Containing Human Brain Proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Anal. Chem.* **77**, 5851-5860
- BECKER, J.S., ZORIY, M., PICKHARDT, C., PRZYBYLSKI, M. und BECKER, J.S. (2005b): Investigation of Cu-, Zn- and Fe-containing human brain proteins using isotopic-enriched tracers by LA-ICP-MS and MALDI-FT-ICR-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **242**, 135-144
- BELL, D.N., LIU, J.J., MALCOLM, D.T und MCKEAGE, M.J. (2006): Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **837**, 29-34
- BERNERS-PRICE, S.J., FRENKIEL, T.A., FREY, U., RANFORD, J.D. und SADLER, P.J. (1992): Hydrolysis Products of Cisplatin: pK, Determinations via [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] NMR Spectroscopy. *Chem. Comm.*, 789-791
- BERNERS-PRICE, S.J., BARNHAM, K.J., FREY, U. und SADLER, P.J. (1996): Kinetic Analysis of the Stepwise Platination of Single- and Double-Stranded GG Oligonucleotides with Cisplatin and cis-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. *Chem. Eur. J.* **2**, 1283-1291
- BERNERS-PRICE, S.J., RONCONI, L. und SADLER, P.J. (2006): Insights into the mechanism of action of platinum anticancer drugs from multinuclear NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **49**, 65-98

- BERNGES, F. und HOLLER, E. (1991): The reaction of platinum(II) complexes with DNA. Kinetics of intrastrand crosslink formation in vitro. *Nuc. Acid. Res.* **19**, 1483-1489
- BOULYGA, S., LORETI, V., BETTMER, J. und HEUMANN, K.G. (2004): Application of SEC-ICP-MS for comparative analyses of metal-containing species in cancerous and healthy human thyroid samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 198-203
- BOUYSSIERE, B., SZPUNAR, J. und LOBINSKI, R. (2002): Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis. *Spectrochim. Acta B* **57**, 805-828
- BOUYSSIERE, B., KNISPEN, T., RUHNAU, C., DENKHAUS, E., PRANGE, A. (2004): Analysis of nickel species in cytosols of normal and malignant human colonic tissues using two dimensional liquid chromatography with ICP-sector field MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 196-200
- BRODY, J.R. und KERN, S.E. (2004a): History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal. Biochem.* **333**, 1-13
- BRODY, J.R. und KERN, S.E. (2004b): Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **36**, 214-216
- BUNGERT, D., HEINZLE, E. und THOLEY, A. (2004): Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Anal. Biochem.* **326**, 167-75
- BUSTIN, S.A., BENES, V., NOLAN, T. und PFAFFL, M.W. (2005): Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **34**, 597-601
- CALVERT, H., JUDSON, I. und VANDERVIJGH, W.J.F. (1993): Platinum Complexes in Cancer Medicine - Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Relation to Toxicity and Therapeutic Activity. *Cancer Surveys* **17**, 189-217
- CARTE, N., LEGENDRE, F., LEIZE, E., POTIER, N., REEDER, F., CHOTTARD, J.C. und DORSSELAER, A.V. (2000): Determination by Electrospray Mass Spectrometry of the Outersphere Association Constants of DNA/Platinum Complexes Using 20-mer Oligonucleotides and ([Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>) or ([Pt(py)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>). *Anal. Biochem.* **284**, 77-86
- CAVALUZZI, M.J., KERWOOD, D.J. und BORER, P.N. (2002): Accurate nucleic acid concentrations by nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* **308**, 373-380

- CHANEY, S.G., CAMPBELL, S.L., BASSETT, E. und WU, Y. (2005): Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, 3-11
- CHARGAFF, E. und ZAMENHOF, S. (1948): The Isolation of Highly Polymerized Desoxyribonucleic Acid from Yeast Cells. *J. Biol. Chem.* **173**, 327-335
- CHEN, Y., PARKINSON, A., GUO, Z., BROWN, T. und SADLER, P.J. (1999): Ein neues Platin-Krebsmedikament bildet hochstereoselektiv ein Addukt mit Duplex-DNA. *Angew. Chem.* **111**, 2192-2196
- CHÉRY, C.C., GÜNTHER, D., CORNELIS, R., VANHAECKE, F. und MOENS, L. (2003): Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Application to selenium. *Electrophoresis* **24**, 3305-3313
- CHÉRY, C.C., MOENS, L., CORNELIS, R. und VANHAECKE, F. (2006): Capabilities and limitations of gel electrophoresis for elemental speciation: A laboratory's experience. *Pure Appl. Chem.* **78**, 91-103
- CREWS, H.M., DEAN, J.R., EBDON, L. und MASSEY, R.C. (1989): Application of High-performance Liquid Chromatography – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry to the Investigation of Cadmium Speciation in Pig Kidney Following Cooking and In Vitro Gastro-intestinal Digestion. *Analyst* **114**, 895-899
- DAVIS, M.S., BERNERS-PRICE, S.J. und HAMBLEY, T.W. (1998): Rates of Platination of AG and GA Containing Double-Stranded Oligonucleotides: Insights into Why Cisplatin Binds to GG and AG but Not GA Sequences in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11380-11390
- DAVIS, M.S., BERNERS-PRICE, S.J. und HAMBLEY, T.W. (2000a): Slowing of Cisplatin Aquation in the Presence of DNA but Not in the Presence of Phosphate: Improved Understanding of Sequence Selectivity and the Roles of Monoaquated and Diaquated Species in the Binding of Cisplatin to DNA. *Inorg. Chem.* **39**, 5603-5613
- DAVIS, M.S., BERNERS-PRICE, S.J. und HAMBLEY, T.W. (2000b): Rates of platination of -AG- and -GA- containing double-stranded oligonucleotides: effect of chloride concentration. *J. Inorg. Biochem.* **79**, 167-172
- DEAN, J.R., MUNRO, S., EBDON, L., CREWS, H.M. und MASSEY, R.C. (1987): Studies of Metalloprotein Species by Directly Coupled High-performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2**, 607-610

- DEL CASTILLO BUSTO, M.E., MONTES-BAYÓN, M., BLANCO-GONZÁLEZ, E., MEIJA, J. und SANZ-MEDEL, A. (2005): Strategies To Study Human Serum Transferrin Isoforms Using Integrated Liquid Chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF Detection: Application to Chronic Alcohol Abuse. *Anal. Chem.* **77**, 5615-5621
- DEL CASTILLO BUSTO, M.E., MONTES-BAYÓN, M., SANZ-MEDEL, A. (2006): Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool. *Anal. Chem.* **78**, 8218-8226
- DING, C. und CANTOR, C.R. (2004): Quantitative Analysis of Nucleic Acids - the Last Few Years of Progress. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 1-10
- DONALD, C.E., STOKES, P., O'CONNOR, G. und WOOLFORD, A.J. (2005): A comparison of enzymatic digestion for the quantitation of an oligonucleotide by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **817**, 173-182
- DUESBERG, P.H. und RUECKERT, R.R. (1965): Preparative Zone Electrophoresis of Proteins on Polyacrylamide Gels in 8M Urea. *Anal. Biochem.* **11**, 342-361
- DUEWER, D.L., KLINE, M.C., REDMAN, J.W., NEWALL, P.J. und REEDER, D.J. (2001): NIST mixed stain studies #1 and #2: interlaboratory comparison of DNA quantification practice and short tandem repeat multiplex performance with multiple-source samples. *J. Forensic Sci.* **46**, 1199-1210
- EASTMAN, A. (1983): Characterization of the Adducts Produced in DNA by cis-Diamminedichloroplatinum(II) and cis-Dichloro(ethylenediamine)-platinum(II). *Biochemistry* **22**, 3927-3933
- EBDON, L., HILL, S. und WARD, R.W. (1986): Directly Coupled Chromatography – Atomic Spectroscopy. Part 1. Directly Coupled Liquid Chromatography – Atomic Spectroscopy. A Review. *Analyst* **112**, 1-16
- EBDON, L., HILL, S. und WARD, R.W. (1987a): Directly Coupled Chromatography – Atomic Spectroscopy. Part 1. Directly Coupled Gas Chromatography – Atomic Spectroscopy. A Review. *Analyst* **111**, 1113-1137
- EBDON, L., HILL, S. und JONES, P. (1987b): Application of Directly Coupled Flame Atomic Absorption Spectrometry – Fast Protein Liquid Chromatography to the Determination of Protein-bound Metals. *Analyst* **112**, 437-440
- EDLER, M., JAKUBOWSKI, N. und LINSCHIED, M. (2005): Styrene oxide DNA adducts: quantitative determination using <sup>31</sup>P monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 205-211

- ENGLISH, C.A., MERSON, S. und KEER, J.T. (2006): Use of Elemental Analysis To Determine Comparative Performance of Established DNA Quantification Methods. *Anal. Chem.* **78**, 4630-4633
- EUROPEAN COMMISSION (2000): Directive 79/112/EEC. *Official Journal L* **006**, 13-14
- EVANS, E.H. und GIGLIO, J.J. (1993): Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. A Review. *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 1-18
- FERRARELLO, C.N., FERNÁNDEZ DE LA CAMPA, M.R. und SANZ-MEDEL, A. (2002a): Multielement trace-element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 412-421
- FERRARELLO, C.N., DEL ROSARIO FERNÁNDEZ DE LA CAMPA, M., CARRASCO, J.F. und SANZ-MEDEL, A. (2002b): Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* by orthogonal separation mechanisms with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: effect of selenium administration. *Spectrochim. Acta B* **57**, 439-449
- FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.J., VAN DER VEER, J.L., DEN HARTOG, J.H.J., LOHMAN, P.H.M. und REEDIJK, J. (1985): Adducts of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification, and Quantitation. *Biochemistry* **24**, 707-713
- FRANSKA, M., FRANSKI, R., SCHROEDER, G., SPRINGER, A., BECK, S. und LINSCHIED, M. (2005): Electrospray ionization mass spectrometric study of purine base-cisplatin complexes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 970-974
- FUERTES, M.A., ALONSO, C. und PÉREZ, J.M. (2003): Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chem. Rev.* **103**, 645-662
- GARFIN, D.E. (2003): Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *Tr. Anal. Chem.* **22**, 263-272
- GIUSTI, P., SCHAUMLÖFFEL, D., ENCINAR, J.R. und SZPUNAR, J. (2005): Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests. *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 1101-1107
- GIUSTI, P., SCHAUMLÖFFEL, D., PREUD'HOMME, H., SZPUNAR, J. und LOBINSKI, R. (2006): Selenopeptide mapping in a selenium-yeast protein digest by parallel nanoHPLC-ICP-MS and nanoHPLC-electrospray-MS/MS after on-line preconcentration. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 26-32

- GUITTARD, J., PACIFICO, C., BLAIS, J.C., BOLBACH, G., CHOTTARD, J.C. und SPASSKY, A. (1995): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of DNA-Pt(II) complexes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 33-36
- GUO, Z., SADLER, J. (1999): Metalle in der Medizin. *Angew. Chem.* **111**, 1610-1630
- GUPTA, R., KAPUR, A., BECK, J.L. und SHEIL, M.M. (2001): Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of double-stranded DNA/drug complexes. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **15**, 2427-2480
- GUPTA, R., BECK, J.L., SHEIL, M.M. und RALPH, S.F. (2005): Identification of bifunctional GA and AG intrastrand crosslinks formed between cisplatin and DNA. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 552-559
- GUSEV, A. I., WILKINSON, W. R., PROCTOR, A. und HERCULES, D. M. (1996): Direct quantitative analysis of peptides using matrix assisted laser desorption ionization. *Fres. J. Anal. Chem.* **354**, 455-63
- HAGEMEISTER, T. und LINSCHIED, M. (2002): Mass spectrometry of cis-diamminedichloroplatinum(II) adducts with the dinucleosidemonophosphates d(ApG), d(GpG) and d(TpC) in an ion trap. *J. Mass Spectrom.* **37**, 731-747
- HAGEN, F.S. (1979): Large-Scale Preparative Gel Electrophoresis of Ribonucleic Acid. *Anal. Biochem.* **93**, 299-305
- HAMBLEY, T.W. (1993): The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **166**, 181-223
- HANN, S., ZENKER, A., GALANSKI, M., BEREUTER, T.L., STINGEDER, G. und KEPPLER, B.K. (2001): HPIC-UV-ICP-SFMS study of the interaction of cisplatin with guanosine monophosphate. *Fres. J. Anal. Chem.* **370**, 581-586
- HANN, S., KOELLENSPERGER, G., STEFÁNKA, Z., STINGEDER, G., FÜRHACKER, M., BUCHBERGER, W. und MADER, R.M. (2003): Application of HPLC-ICP-MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine. *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 1391-1395
- HELFRICH, A. und BETTMER, J. (2006): Determination of phytic acid and its degradation products by ion-pair chromatography (IPC) coupled to inductively coupled plasma-sector field-mass spectrometry (ICP-SF-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 1330-1334

- HEITKEMPER, D., CREED, J., FRICKE, F.L. und CARUSO, J. (1989): Speciation of Arsenic in Urine Using High-performance Liquid Chromatography With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. *J. Anal. At. Spectrom.* **4**, 279-284
- HERNÁNDEZ-BORGES, J., NEUSÜß, C., CIFUENTES, A. und PELZING, M. (2004): On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Electrophoresis* **25**, 2257-2281
- HEUMANN, K.G. (2004): Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 318-329
- HIRNER, A.V. (2006): Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 555-567
- HOLDEN, M.J., RABB, S.A., TEWARI, Y.B. und WINCHESTER, M.R. (2007): Traceable Phosphorus Measurements by ICP-OES and HPLC for the Quantitation of DNA. *Anal. Chem.* DOI: 10.1021/ac061463b
- JAKUBOWSKI, N., LOBINSKI, R. und MOENS, L. (2004): Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 1-4
- JAMIESON, E.R. und LIPPARD, S.J. (1999): Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* **99**, 2467-2498
- JIN, L.T. und CHOI, J.K. (2004): Usefulness of visible dyes for the staining of protein or DNA in electrophoresis. *Electrophoresis* **25**, 2429-2438
- JOHNSON, N.P., MAZARD, A.M., ESCALIER, J. und MACQUET, J.P. (1985): Mechanism of the Reaction between cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and DNA in Vitro. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6376-6380
- JOVIN, T., CHRAMBACH, A. und NAUGHTON, M.A. (1964): An Apparatus for Preparative Temperature-Regulated Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **9**, 351-369
- KANNAMKUMARATH, S.S., WROBEL, K., WROBEL, K., B'HYMER, C. und CARUSO, J.A. (2002): Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *J. Chromatogr. A* **975**, 245-266
- KLIN, M.C., DUEWER, D.L., REDMAN, J.D. und BUTLER, J.M. (2003): NIST Mixed Stain Study 3: DNA Quantitation Accuracy and Its Influence on Short Tandem Repeat Multiplex Signal Intensity. *Anal. Chem.* **75**, 2463-2469

- KLINE, M.C., DUEWER, D.L., REDMAN, J.D. und BUTLER, J.M. (2005): Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J. Forensic Sci.* **50**, 571-578
- KOLB, B., KEMMNER, G., SCHLESER, F.H. und WIEDEKING, E. (1966): Elementspezifische Anzeige gaschromatographisch getrennter Metallverbindungen mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS). *Fres. J. Anal. Chem.* **221**, 166-175
- KOZELKA, J., LEGENDRE, F., REEDER, F. und CHOTTARD, J.C. (1999): Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes. *Coord. Chem. Rev.* **190-192**, 61-82
- KRAUSE-BUCHHOLZ, U., BECKER, J.S., ZORIY, M., PICKHARDT, C., PRZYBYLSKI, M., RÖDEL, G. und BECKER, J.S. (2006): Detection of phosphorylated subunits by combined LA-ICP-MS and MALDI-FTICR-MS analysis in yeast mitochondrial membrane complexes separated by blue native/SDS-PAGE. *Int. J. Mass Spectrom.* **248**, 56-60
- KRÜGER, R., KÜBLER, D., PALLISSÉ, R., BURKOVSKI, A. und LEHMANN, W.D. (2006): Protein and Proteome Phosphorylation Stoichiometry Analysis by Element Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 1987-1994
- LAOUI, A., KOZELKA, J. und CHOTTARD, J.C. (1988): Cis-Diamminediaquaplatinum(II) Selectivity for GpG: Influence of the Adjacent Base on the First Platination Step. *Inorg. Chem.* **27**, 2751-2753
- LEGENDRE, F., KOZELKA, J. und CHOTTARD, J.C. (1998): GG versus AG Platination: A Kinetic Study on Hairpin-Stabilized Duplex Oligonucleotides. *Inorg. Chem.* **37**, 3964-3967
- LEWIS, U.J., CLARK und M.O. (1963): Preparative Methods for Disk Electrophoresis with Special Reference to the Isolation of Pituitary Hormones. *Anal. Biochem.* **6**, 303-315
- LI, B., BERGMANN, J., LASSEN, S., LEONHARD, P. und PRANGE, A. (2005): Distribution of elements binding to molecules with different molecular weights in aqueous extract of Antarctic krill by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **814**, 83-91
- LOBINSKI, R. und ADAMS, F.C. (1997): Speciation analysis by gas chromatography with plasma source spectrometric detection. *Spectrochim. Acta B* **52**, 1865-1903
- LOBINSKI, R. (1998): Speciation – targets, analytical solutions and markets. *Spectrochim. Acta B* **53**, 177-185



- LOBINSKI, R., CHASSAIGNE, H. und SZPUNAR, J. (1999): Analysis for metallothioneins using coupled systems. *Talanta* **46**, 271-289
- LOBINSKI, R., SCHAUMLÖFFEL und D., SZPUNAR, J. (2006): Mass Spectrometry in Bioinorganic Analytical Chemistry. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 255-289
- LONGBOTTOM, J.E. (1972): Inexpensive Mercury-Specific Gas-Chromatographic Detector. *Anal. Chem.* **44**, 1111-1112
- MA, R., MCLEOD, C.W., TOMLINSON, K. und POOLE, R.K. (2004): Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry. *Electrophoresis* **25**, 2469-2477
- MAKAROV, A. und SZPUNAR, J. (1999) Species-selective determination of cobalamin analogues by reversed-phase HPLC with ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1323-1327
- MANAHAN, S.E. und JONES, D.R. (1973): Determination of organic complexes with liquid chromatography and atomic absorption spectroscopy. *Anal. Lett.* **6**, 745-753
- MANSY, S., CHU, G.Y.H., DUNCAN, R.E. und TOBIAS, R.S. (1978): Heavy Metal Nucleotide Interactions. 12. Competitive Reactions in Systems of Four Nucleotides with cis- or trans-Diammineplatinum(II). Raman Difference Spectrophotometric Determination of the Relative Nucleophilicity of Guanosine, Cytidine, Adenosine, and Uridine Monophosphates as Well as the Analogous Bases in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 607-616
- MEIJA, J., MONTES-BAYÓN, M., CARUSO, J.A. und SANZ-MEDEL, A. (2006): Integrated mass spectrometry in (semi-)metal speciation and its potential in phytochemistry. *Tr. Anal. Chem.* **25**, 44-51
- MICALLEF, S., COUILLARD, Y., CAMPBELL, P.G.C. und TESSIER, A. (1992): An Evaluation of the HPLC-Gel Chromatographic Method for Analyzing Metallothioneins in Aquatic Organisms. *Talanta* **39**, 1073-1079
- MICHALKE, B. (2002): The coupling of LC to ICP-MS in element speciation – Part II: Recent trends in application. *Tr. Anal. Chem.* **21**, 154-165
- MORITA, M., UEHIRO, T. und FUWA, K. (1980): Speciation and Elemental Analysis of Mixtures by High Performance Liquid Chromatography with Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **52**, 349-351

- MUELLER-SPITZ, S.R., VONDERHEIDE, A.P., SHANN, J.R., CARUSO, J.A. und KINKLE, B.K. (2006): Use of SEC-ICP-MS with a collision cell for determining the interaction of chromium with DNA extracted from metal-contaminated soils. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 142-151
- MURPHY, J.H. und TRAPANE, T.L. (1996): Concentration and Extinction Coefficient Determination for Oligonucleotides and Analogs Using a General Phosphate Analysis. *Anal. Biochem.* **240**, 273-282
- NEILSEN, J.L., ABILDTRUP, A., CHRISTENSEN, J., WATSON, P., COX, A. und MCLEOD, C.W. (1998): Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochim. Acta B* **53**, 339-345
- NICKLAS, J.A. und BUEL, E. (2003): Quantification of DNA in forensic samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 1160-1167
- O'CONNOR, G., DAWSON, C., WOOLFORD, A., WEBB, K.S. und CATTERICK, T. (2002): Quantitation of Oligonucleotides by Phosphodiesterase Digestion Followed by Isotope Dilution Mass Spectrometry: Proof of Concept. *Anal. Chem.* **74**, 3670-3676
- OLESIK, J.W., KINZER, J.A. und OLESIK, S.V. (1995): Capillary Electrophoresis Inductively Coupled Plasma Spectrometry for Rapid Elemental Speciation. *Anal. Chem.* **67**, 1-12
- ONG, S. E. und MANN, M. (2005): Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 252-262
- OWEN, L.M.W., RAUSCHER, A.M., FAIRWEATHER-TAIT, S.J. und CREWS, H.M. (1996): Use of HPLC with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for trace element speciation studies in biological materials. *Biochem. Soc. Transact.* **24**, 947-952
- PATTON, W.F. (2000): A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **21**, 1123-1144
- PELZING, M. und NEUSÜß, C. (2005): Separation techniques hyphenated to electrospray tandem mass spectrometry in proteomics: Capillary electrophoresis versus nanoliquid chromatography. *Electrophoresis* **26**, 2717-2728
- PIELES, U., ZURCHER, W., SCHAR, M. und MOSER, H.E. (1993): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: A powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3191-3194

- POLATAJKO, A., JAKUBOWSKI N. und SZPUNAR, J. (2006): State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 639-654
- POLSKY, F., EDGELL, M.H., SEIDMAN, J.G. und LEDER, P. (1978): High Capacity Gel Preparative Electrophoresis for Purification of Fragments of Genomic DNA. *Anal. Biochem.* **87**, 397-410
- PRANGE, A. und PRÖFROCK, D. (2005): Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 372-389
- RAML, R., GOESSLER, W. und FRANCESCONI, K.A. (2006): Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1128**, 164-170
- RAY, S.J., ANDRADE, F., GAMEZ, G., MCCLENATHAN, D., ROGERS, D., SCHILLING, G., WETZEL, W. und HIEFTJE, G.M. (2004): Plasma-source mass spectrometry for speciation analysis: state-of-the-art. *J. Chromatogr. A* **1050**, 3-34
- REEDER, F., GUO, Z., MURDOCH, P.S., CORAZZA, A., HAMBLEY, T.W., BERNERS-PRICE, S.J., CHOTTARD, J.C. und SADLER, P.J. (1997): Platination of a GG site on single-stranded and double-stranded forms of a 14-base oligonucleotide with diaqua cisplatin followed by NMR and HPLC Influence of the platinum ligands and base sequence on 5'-G versus 3'-G platination selectivity. *Eur. J. Biochem.* **249**, 370-382
- REEDIJK, J. (1996): Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem. Comm.*, 801-806
- RIGHETTI, P.G. (2004): Bioanalysis: Its past, present, and some future. *Electrophoresis* **25**, 2111-2127
- ROSENBERG, B., VAN CAMP, L. und KRIGAS, T. (1965): Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698-699
- ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., TROSKO, J.E. und MANSOUR, V.H. (1969): Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **222**, 385-386
- ROSSI, R. ( 1978): The Use of Preparative Electrophoresis as a Fractionation Procedure for Quantitative Mammalian DNA Analysis. *Anal. Biochem.* **85**, 291-294

- ROTTMANN, L. und HEUMANN, K.G. (1994): Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species. *Fres. J. Anal. Chem.* **350**, 221-227
- ROWAN, J.T. und HOUK, R.S. (1989): A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1133-1142
- SANZ-MEDEL, A., MONTES-BAYÓN, M. und FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, M.L. (2003): Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 236-247
- SAR, D.G., MONTES-BAYÓN, M., GONZALES, E.B. und SANZ-MEDEL, A. (2006): Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 861-868
- SCHAUMLÖFFEL, D. und PRANGE, A. (1999): A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Fres. J. Anal. Chem.* **364**, 452-456
- SCHAUMLÖFFEL, D., PRANGE, A., MARX, G., HEUMANN, K.G. und BRÄTTER, P. (2002): Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 155-163
- SCHAUMLÖFFEL, D., ENCINAR, J.R. und LOBINSKI, R., (2003): Development of a Sheathless Interface between Reversed-Phase Capillary HPLC and ICPMS via a Microflow Total Consumption Nebulizer for Selenopeptide Mapping. *Anal. Chem.* **75**, 6837-6842
- SCHAUMLÖFFEL, D. und LOBINSKI, R. (2005): Isotope dilution technique for quantitative analysis of endogenous trace element species in biological systems. *Int. J. Mass Spectrom.* **242**, 217-223
- SHEN, Y. und SMITH, R.D. (2002): Proteomics based on high-efficiency capillary separations. *Electrophoresis* **23**, 3106-3124
- SIMON, M.C., GRAY, D.I. und COOK, N. (1996): DNA extraction and PCR Methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Appl. Envir. Microbiol.* **62**, 822-824
- SIMPSON, D.C. und SMITH, R.D. (2005): Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis* **26**, 1291

- SPECHT, K., RICHTER, T., MÜLLER, U., WALCH, A., WERNER, M. und HÖFLER, H. (2001): Quantitative Gene Expression Analysis in Microdissected Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue. *Am. J. Pathol.* **158**, 419-429
- SUNDQUIST, W.I. und LIPPARD, S.J. (1990): The Coordination Chemistry of Platinum Anticancer Drugs and Related Compounds with DNA. *Coord. Chem. Rev.* **100**, 293-322
- SUTTON, K., SUTTON, R.M.C. und CARUSO, J.A. (1997): Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **789**, 85-126
- SZPUNAR, J. (2000): Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* **125**, 963-988
- SZPUNAR, J. und LOBINSKI, R. (2002): Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 404-411
- SZPUNAR, J. (2005): Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and Metabolomics. *Analyst* **130**, 442-465
- TAKATERA, K. und WATANABE, T. (1992): Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry to the Speciation of Cadmium-Binding Metallothionein-like Protein in a Cyanobacterium. *Anal. Sci.* **8**, 469-474
- TAN, S.H. und HORLICK, G. (1986): Background Spectral Features in Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Appl. Spectr.* **40**, 445-460
- TANNER, S.D., BARANOV, V.I. und BANDURA, D.R. (2002): Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochim. Acta* **57**, 1361-1452
- TAVERNIERS, I., VAN BOCKSTAELE, E. und DE LOOSE, M. (2004): Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1198-1207
- TEMPLETON, D.M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L.G., MUNTAU, H., VAN LEEUWEN, H.P. und LOBINSKI, R. (2000): Guidelines for Terms Related to Chemical Speciation and Fractionation of Elements. Definitions, Structural Aspects, and Methodological Approaches. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1453-1470
- THOMPSON, J.J. und HOUK, R.S. (1986): Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection for Multielement Flow Injection Analysis and Elemental Speciation by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **58**, 2541-2548

- TIMERBAEV, A.R., HARTINGER, C.G. und KEPPLER, B.K. (2006): Metallodrug research and analysis using capillary electrophoresis. *Tr. Anal. Chem.* **25**, 868-875
- TRAPMANN, S., CATALANI, P., HOORFAR, J., PROKISCH, J., VAN IWAARDEN, P. und SCHIMMEL, H. (2004): Development of a novel approach for the production of dried genomic DNA for use as standards for qualitative PCR testing of food-borne pathogens. *Accred. Qual. Assur.* **9**, 695-699
- UDEN, P.C. (1995): Element-specific chromatographic detection by atomic absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **703**, 393-416
- VAN BEEK, H. und BAARS, A.J. (1988): Isolation and Quantitation of Cadmium-, Zinc- and Copper-Metallothioneins by High-Performance Liquid Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry. *J. Chromatogr.* **442**, 345-352
- WARNKE, U., GYSLER, J., HOFTE, B., TJADEN, U.R., VAN DER GREEF, J., KLOFT, C., SCHUNACK, W. und JAEHDE, U. (2001): Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**, 97-103
- WIND, M., EDLER, M., JAKUBOWSKI, N., LINSCHIED, M., WESCH, H. und LEHMANN, W.D. (2001a): Analysis of Protein Phosphorylation by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry with <sup>31</sup>P Detection and to Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 29
- WIND, M., WESCH, H. und LEHMANN, W.D. (2001b): Protein Phosphorylation Degree: Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 3006-3010
- WIND, M., FELDMANN, I., JAKUBOWSKI, N. und LEHMANN, W.D. (2003): Spotting and quantification of phosphoproteins purified by gel electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry with phosphorus-31 detection. *Electrophoresis* **24**, 1276-1280
- WIND, M. und LEHMANN, W.D. (2004): Element and molecular mass spectrometry - an emerging analytical dream team in the life sciences. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 20-25
- WILLIAMS, R.J.P. (1990): Bio-Inorganic Chemistry: Its Conceptual Evolution. *Coord. Chem. Rev.* **100**, 573-610

- YAMADA, K., KATO, N., TAKAGI, A., KOI, M. und HEMMI, H. (2005): One-milliliter wet-digestion for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): determination of platinum-DNA adducts in cells treated with platinum(II) complexes. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1702-1707
- YANG, I., HAN, M.S., YIM, Y.H., HWANG, E. und PARK, S.R. (2004): A strategy for establishing accurate quantitation standards of oligonucleotides: quantitation of phosphorus of DNA phosphodiester bonds using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy. *Anal. Biochem.* **335**, 150-161
- YOZA, N. und OHASHI, S. (1973): Gel chromatography with atomic absorption spectroscopic detection. *Anal. Lett.* **6**, 595-601
- ZIEGLER, C.J., SILVERMAN, A.P. und LIPPARD, S.J. (2000): High-throughput synthesis and screening of platinum drug candidates. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 774-783
- ZÖLLNER, P., ZENKER, A., GALANSKI, M., KEPPLER, B.K. und LINDNER, W. (2001): Reaction monitoring of platinum(II) complex-5'-guanosine monophosphate adduct formation by ion exchange liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 742-753

---

## Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
------------	------------

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]



---

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- BETTMER, J. und BRÜCHERT, W. (2002): Proteinanalytik einmal anders – ICP-MS als Untersuchungsmethode. *Nach. Chem.* **7**, 846
- BRÜCHERT, W. und BETTMER, J. (2005): On-line Coupling of Gel Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma-Sector Field-Mass Spectrometry for the Determination of dsDNA Fragments. *Anal. Chem.* **77**, 5072
- HELFRICH, A., BRÜCHERT, W. und BETTMER, J. (2006): Size Characterisation of Au Nanoparticles by ICP-MS Coupling Techniques. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 431
- BRÜCHERT, W. und BETTMER, J. (2006): DNA Quantification Approach by GE-ICP-SFMS and Complementary Total Phosphorus Determination by ICP-SFMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 1271
- BRÜCHERT, W., HELFRICH, A., ZINN, N., KLIMACH, T., BRECKHEIMER, M., CHEN, H., LAI, S., HOFFMANN, T. und BETTMER J. (2007): Gel Electrophoresis (GE) Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) Using Species-Specific Isotope Dilution for Iodine Speciation in Aerosols. *Anal. Chem.* DOI: 10.1021/ac061767y