

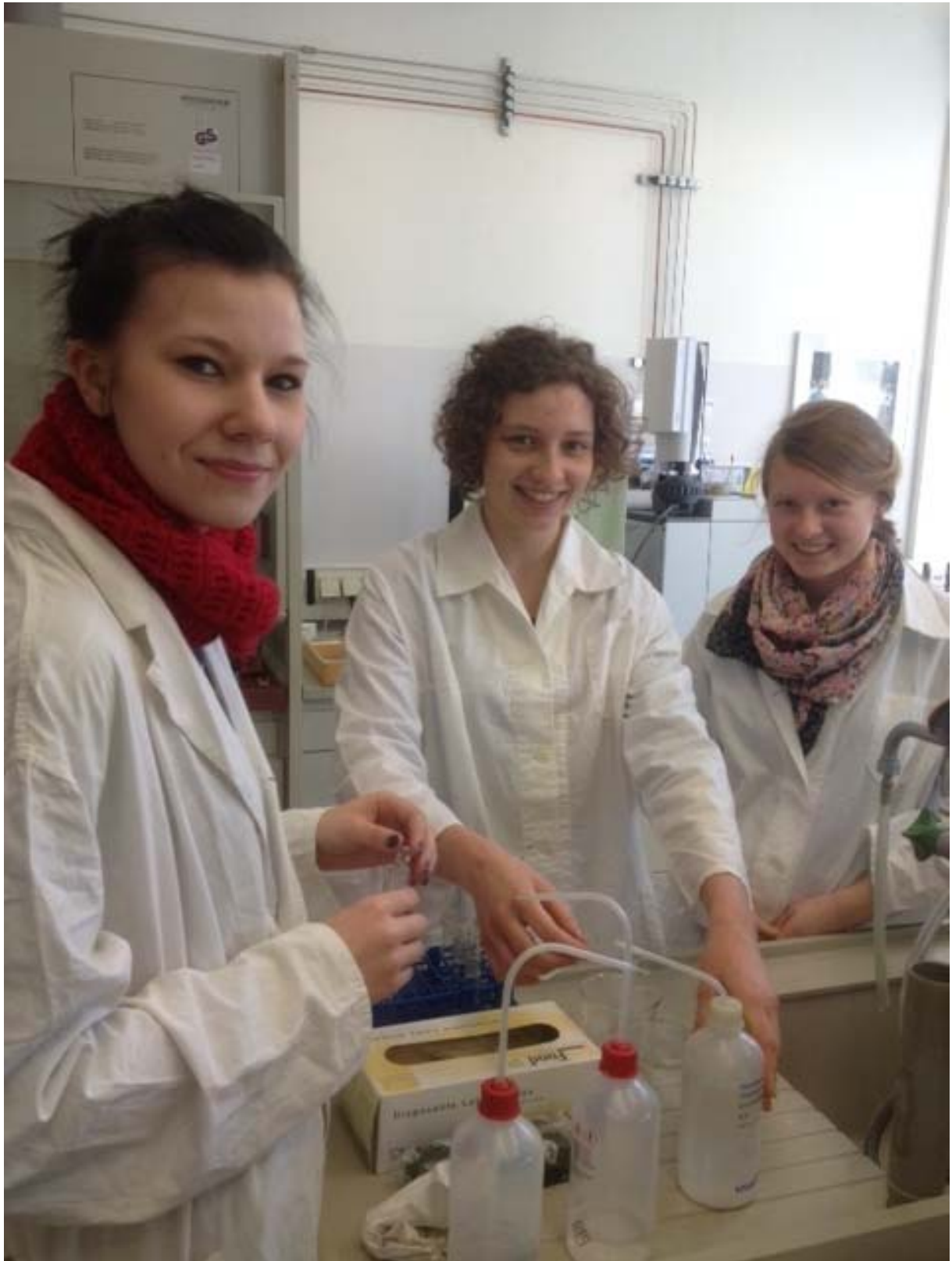
## 13. Schülerpraktikum 2015

Am 3. März kamen 15 Schüler – keine leichte Aufgabe, alle Schüler gleichzeitig in 5 Analytik-Versuchen zu beschäftigen!

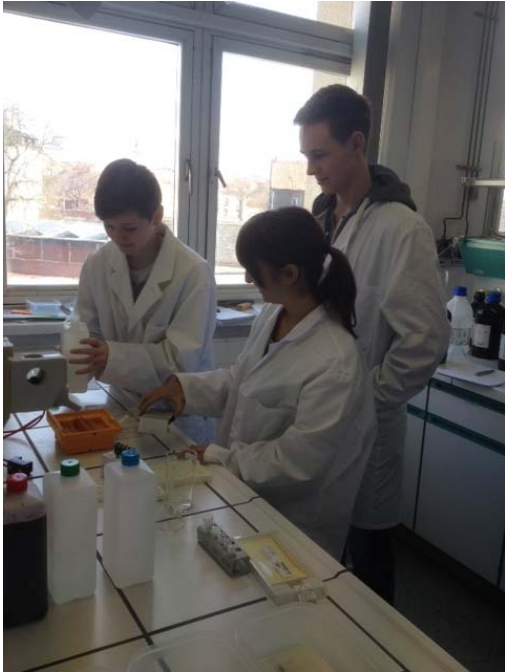
Sie waren aber sehr interessiert und ihre Mitarbeit war außerordentlich gut!

Dank auch an die Organisatoren  
Frau Monika Opitz und Frau Ines Vogel!





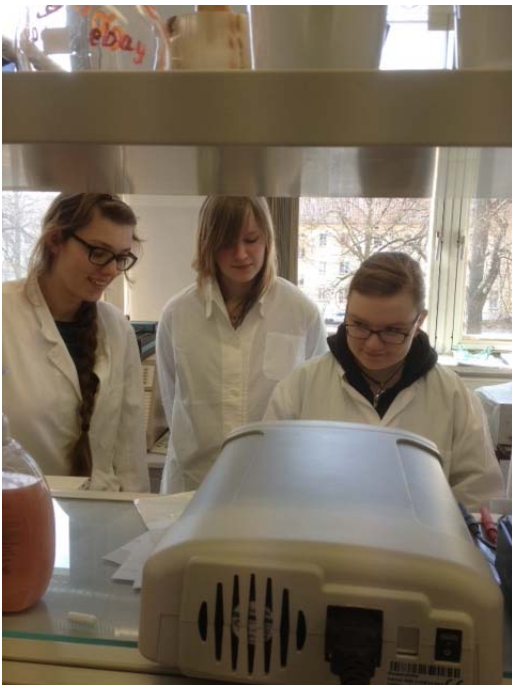
Auch Reinigungsarbeiten gehören zum Laboralltag –  
und sind Voraussetzung für eine gute und erfolgreiche  
Analytik/BioAnalytik



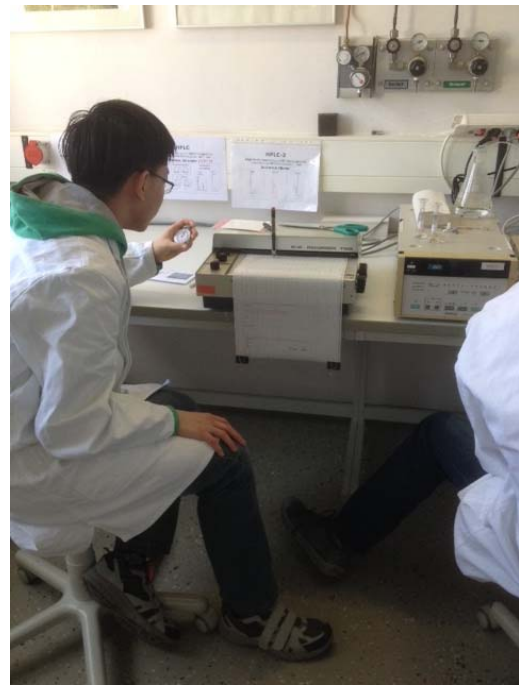
Vorbereitung der  
Serumeiweiß-Elektrophorese



Jungs sind auch  
gute Beobachter



Funktioniert die  
Dünnschichtchromatographie?



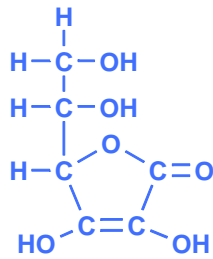
Retentionszeiten müssen  
exakt gemessen werden!

## Schülerpraktikum 2015

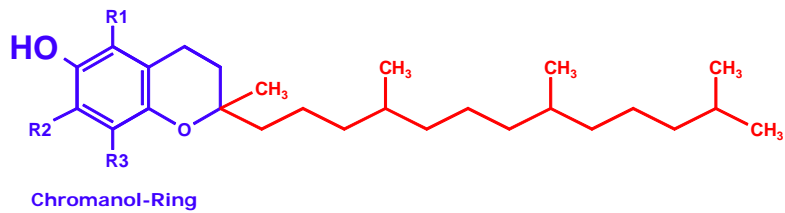
### Versuch-1:

#### Struktur und Löslichkeitsverhalten von biologischen und organischen Substanzen.

Struktur und Löslichkeit von Substanzen stehen im engen Zusammenhang – polare (**hydrophile**) Stoffe sind gut wasserlöslich; **hydrophobe** bzw. **lipophile** Stoffe sind gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln wie z.B. Hexan.



**Bild 1-01** Struktur von Vitamin C (Ascorbinsäure)



**Bild 1-02** Struktur von Vitamin E (Tocopherole)

Substanz	Wasser	Ethanol	Hexan
	H-O-H	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Vitamin C			
Vitamin E			

Worin ist 1) Vitamin C und 2) Vitamin E gut löslich und weshalb?

**Weitere Substanzen können im Praktikum getestet werden!**

### Versuch-2:

#### Dünnschichtchromatographie (DC) von Blattfarbstoffen (Chlorophyll), Lebensmittel- und Azofarbstoffen.

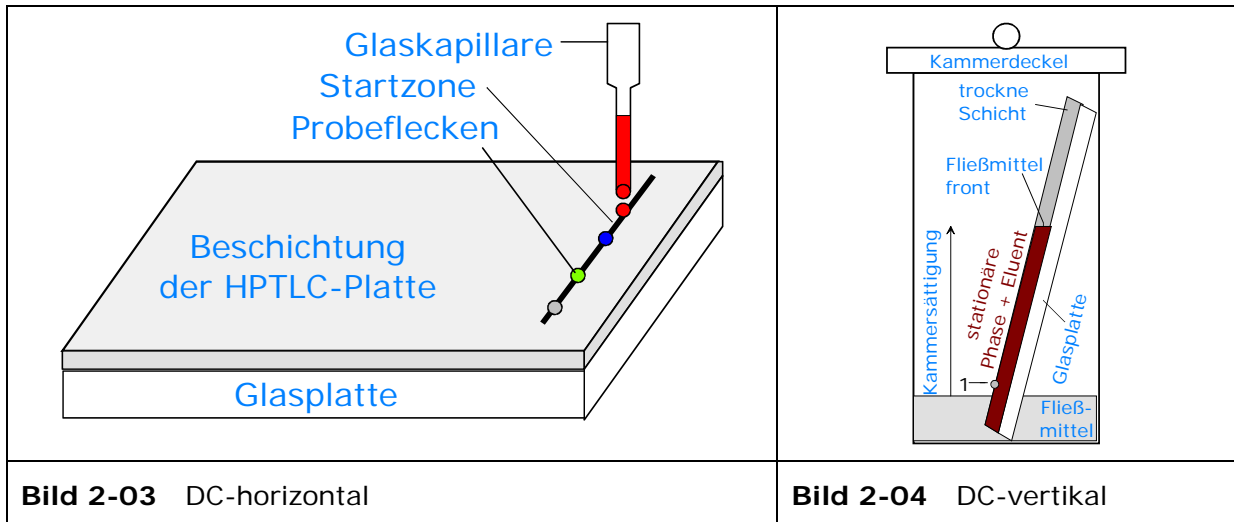
##### Dünnschichtchromatographie (DC)

DC wird auf Platten, die mit Silicagel (stationäre Phase) beschichtet sind, mit Hilfe eines Eluenten (mobile Phase) durchgeführt und es resultieren einzelne Substanzflecken, die bestimmten Analyten (z.B. Farbstoffen) zugeordnet werden (**Bild-2-01** und **Bild-2-02**).

<b>Bild 2-01</b> DC von Lebensmittelfarbstoffen	<b>Bild 2-02</b> DC von Azofarbstoffen

Durch verschiedene Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären und mobilen Phase kommt es zur Auftrennung. Die mobile Phase wird aufgrund von Kapillarkräften innerhalb der Silicagelschicht bewegt.

Die DC-Platten können horizontal und vertikal entwickelt werden (**Bild 2-03** und **Bild 2-04**). Die Probenaufgabe erfolgt mittels Kapillare oder mit einem speziellen Auftragegerät (Linomat, siehe Praktikum).



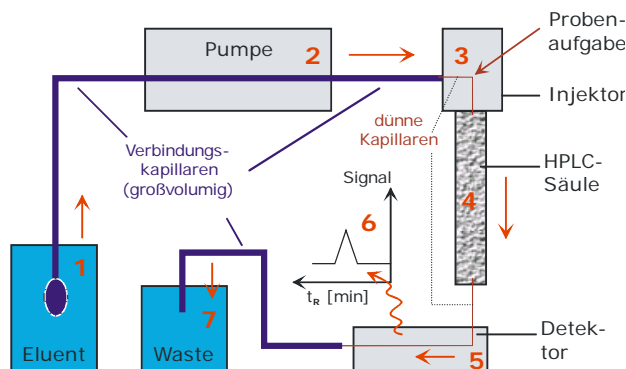
Die Anleitungen zu Trennungen von Blattfarbstoffen (Chlorophyll u.a., Azofarbstoffen) erfolgen gesondert im Praktikum!

### Versuch-3:

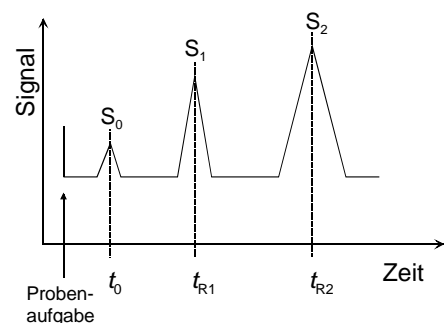
## Analytik von legalen Drogen (Coffein, Alkohol) mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC bzw. LC).

### Flüssigchromatographie (LC)?

In der LC (*liquid chromatography*) wird das (modifizierte) Silicagel in eine Säule (4, meist aus Stahl) fest hinein gepackt – die mobile Phase (1, Eluent) wird mittels Pumpe (2) hindurch gefördert (siehe **Bild 3-01**).



**Bild 3-01** Aufbau einer HPLC-Apparatur



**Bild 3-02** Chromatogramm

Die Probenaufnahme (Analyte) auf die Säule (4) erfolgt mit einem Injektor (3); zur Registrierung der Analyte dient ein Detektor (5). Die Analyte werden in Form von Peaks in einem Chromatogramm (Signal gegen die Zeit) aufgezeichnet (siehe **Bild 3-02**).

Dabei wird jede Zeit – außer der „Totzeit“ – einem einzelnen Analyten zugeordnet. Die folgenden Bilder zeigen die Zuordnung der Hauptkomponenten (Analyte) von alkoholischen Getränken. So erscheint Glucose (Glc) nach 18 Minuten im Chromatogramm. Fructose (Fru) und der Alkohol (EtOH) werden nach 22 bzw. 28 Minuten eluiert (**Bilder 3-03 bis 3-06**).

<p><b>Bild 3-03</b> Riesling – trocken</p>	<p><b>Bild 3-04</b> Rotwein – süß</p>	<p><b>Bild 3-05</b> Alcopop – sehr süß</p>	<p><b>Bild 3-06</b> Rotwein – ohne Ethanol !</p>

Die Höhe der Peaks ist ein Maß für die Menge der Zucker/des Ethanols im Getränk. So enthalten Alcopops sehr viel Glucose und Fructose; trockene Weine dagegen sehr wenig Zucker. Die Alkoholgehalte in Weinen schwanken zwischen ca. 10 und 15 % - ein schwedischer alkoholfreier Wein hat nahezu kein EtOH.

**Coffein oder auch Ecstasy können auch mit entsprechenden bzw. vergleichbaren LC-Methoden bestimmt werden (siehe auch Praktikum).**

**Versuch-4:** wird nicht praktisch durchgeführt !

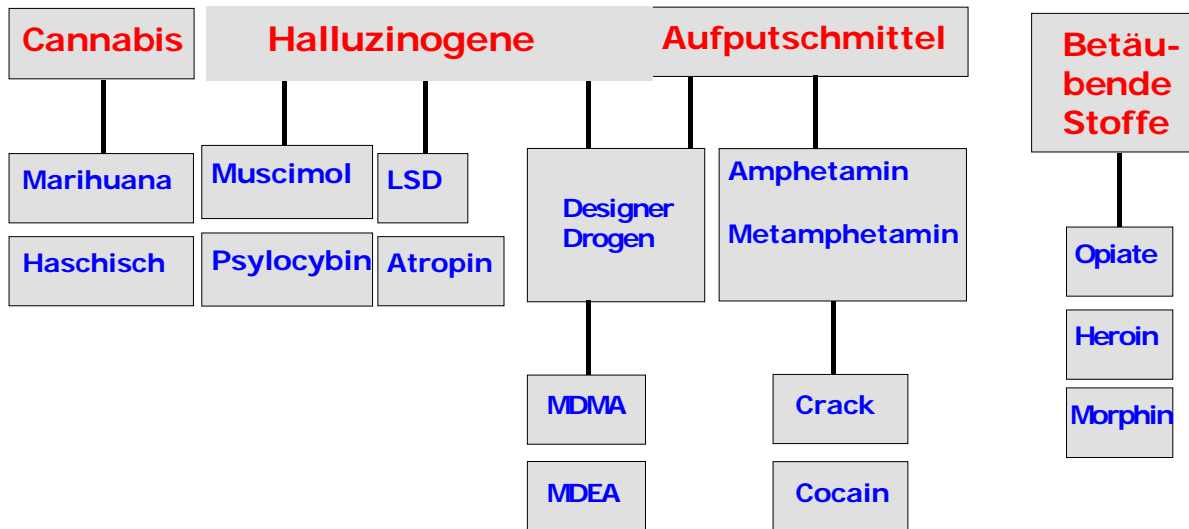
**Strategien** zur Analytik von illegalen Drogen (Cocain)

## Drogen

Drogen im engeren Sinne sind alle Substanzen, die durch ihre Wirkung auf das Zentralnervensystem einen Erregungs-, Rausch- bzw. ähnlichen Zustand herbeiführen können.

Dieser Zustand äußert sich z.B. durch gehobene Stimmung, körperliches Wohlbefühl oder Halluzinationen.

Der Begriff Droge steht für Sucht- oder Rauschmittel; in der Pharmazie sind „Drogen“ Wirkstoffe bzw. physiologisch wirksame Substanzen. Man unterscheidet zwischen „legalen“ Drogen (Genussmittel: *Alkohol*, Nicotin und Arzneimitteln wie *Sedativa*, *Hypnotika* etc.) und „illegalen“ Drogen (**Bild 4-01**).



**Bild 4-01** Illegale Drogen – „Schwarzmarkt“

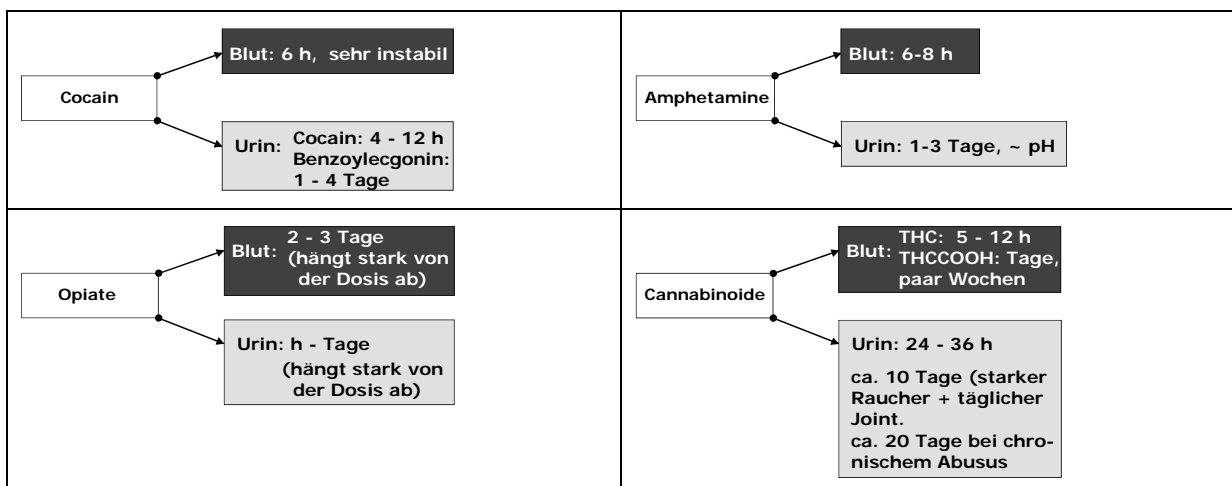
### Nachweis von Drogen

Im **Bild 4-02** ist die Nachweisbarkeit ausgewählter Drogen im Blut und im Urin in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

Cocain ist im Blut ca. 6 Stunden als stabile Verbindung analysierbar und im Urin etwa 4 bis 12 Stunden.

Besonders wichtig für einen längeren (indirekten) Nachweis des Cocains ist der Metabolit **Benzoyllecgonin**, der im Urin noch nach wenigen Tagen erfasst werden kann.

Auch die anderen Beispiele zeigen, dass im Urin die Drogen länger bestimmt werden können als im Blut.

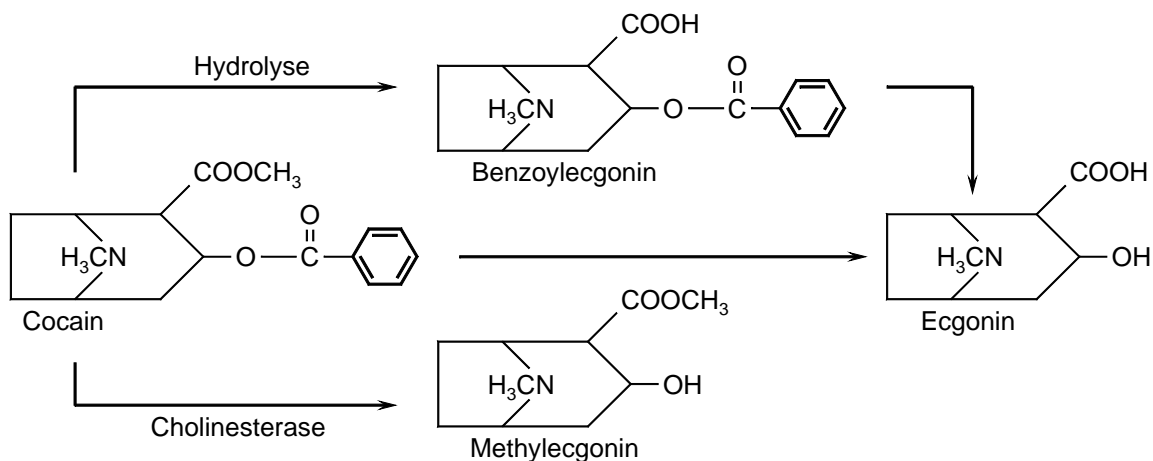


**Bild 4-02** Nachweisbarkeit ausgewählter Drogen im Blut und im Urin in Abhängigkeit der Zeit

## Metabolisierung von Cocain

Wie in **Bild 4-02** gezeigt, kann Cocain nur bis zu 6 Stunden im Blut und bis zu 12 Stunden im Urin nachgewiesen werden; die Metaboliten länger. Die Metabolisierung von Cocain ist in **Bild 4-03** dargestellt.

Cocain wird im Plasma und in der Leber durch Cholinesterasen zu dem wasserlöslichen Ecgoninmethylester und durch eine nichtenzymatische Hydrolyse zu **Benzoylecgonin** metabolisiert. Die Metaboliten können dann noch wenige Tage nach dem Cocainkonsum im Urin erfasst werden.



**Bild 4-03** Metabolisierung von Cocain

## Gaschromatographie (GC)

Der Unterschied der Gaschromatographie zur LC/DC liegt vor allem darin, dass hier als mobile Phase keine Flüssigkeit sondern ein **Gas** verwendet wird. Dieses dient lediglich dem Transport der Analyte durch eine Trennsäule – i.d.R. ist das eine dünne Kapillare aus Quarzglas, deren Innenwand mit stationärer Phase beschichtet ist. Diese Schicht allein bewirkt die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den Analyten, wodurch eine Trennung in einzelne Peaks erfolgt (Chromatogramm, siehe **Bild 4-04**).

Wichtig ist, dass die Analyte für die GC-Analysen verdampfbar (leicht flüchtig) sein müssen und sie dürfen sich beim Verdampfen nicht zersetzen. Für die meisten Stoffe, die wir riechen, trifft das zu. Wenn wir allerdings Zucker oder Eiweiß stark erhitzen oder sogar verdampfen wollen, zersetzen sich diese Stoffe und sind somit nicht mittels GC bestimmbar.

Cocain und seine Metabolite können mittels GC analysiert werden. Dafür ist aber eine sehr spezielle Probenvorbereitung erforderlich – mit anschließender Spezialanalytik (GC-MS).

## Nachweis von Cocain in Haaren

Besonderes Interesse besitzt der Nachweis von Cocain und seiner Metabolite in Haaren. Diese Analytik wird in hochspezialisierten Instituten der Rechtsmedizin durchgeführt!

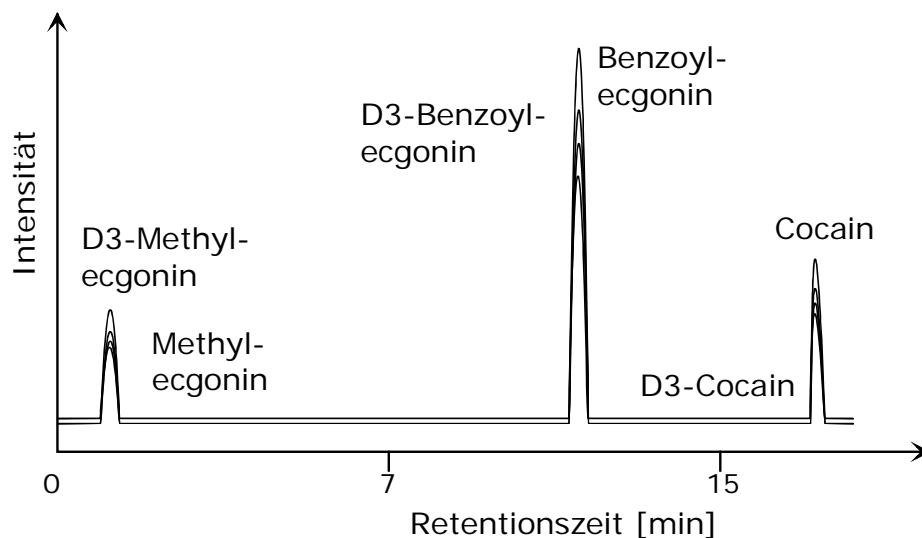
Der Vorteil der „Haaranalyse“ ist, dass nicht wie im Falle von Blut- oder Urinuntersuchungen nur „Momentaufnahmen“ des Drogenkonsums gemacht werden können, sondern dass der Cocainnachweis auch über mehrere Monate hinweg möglich wird – sozusagen auch „rückwirkend“!



Menschliche Haare wachsen im Monat ca. 1 cm und lagern Drogen und Schadstoffe ein. Bei einer Haarlänge von 12 cm kann also der Konsum/Nichtkonsum von Cocain über ein ganzes Jahr hinweg – rückwirkend und praktisch Monat für Monat – analytisch festgestellt werden. Haare sind demzufolge ein sogenanntes „verschlüsseltes Gedächtnis“ des Menschen und spezialisierte Analytiker können darin „stöbern“.

Für eine Analyse benötigt man ca. 30 mg Haare. Zur „Probenahme“ werden Haarbüschel mit einer Schnur zusammengebunden und dicht an der Kopfhaut abgeschnitten. Danach erfolgt das Zerkleinern in millimetergroße Stücke; zur Extraktion der Droge werden sie in einen neutralen Phosphatpuffer überführt. Dieser gewährleistet, dass die Estergruppen des Cocains erhalten bleiben.

Es werden deuterierte innere Standards für die nachzuweisende Droge und für die zu erwartenden Metaboliten hinzugefügt (**Bild 4-04**).



**Bild 4-04** GC-Analyse von Cocain und seiner Metabolite

### Versuch-5:

## Unterscheidung von gesunden und pathologischen Blutseren mittels Elektrophorese.

### Elektrophorese

- **Elektro-:** Anlegen einer **elektrischen Spannung**,
- **phor:** grie, bedeutet „**tragen**“

Elektrophorese bedeutet: Wanderung von geladenen Molekülen, Partikeln und Zellen im elektrischen Feld, wobei sich die Probespecies in wässriger Lösung befinden.

Die elektrophoretische Trennung erfolgt innerhalb stabilisierender Medien (Gele, Folien) oder in freien Lösungen („Kapillarelektrophorese“) aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Massen der Probespecies.

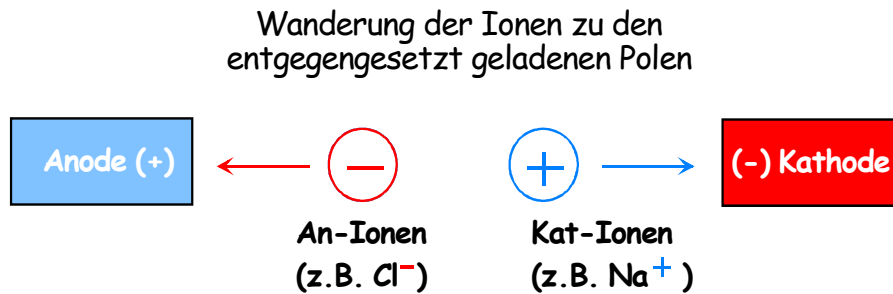
## Was ist Elektro-phorese: Trennprinzipien

(Wanderung von geladenen Analyten im elektrischen Feld)

**Anode (+):** positiv geladener Pol (*An-genehm ist positiv!*)

**Kathode (-):** negativ geladener Pol (*Kat-astrophe ist negativ!*)

**Bild 5-01** Darstellung-1 „Elektrophorese“

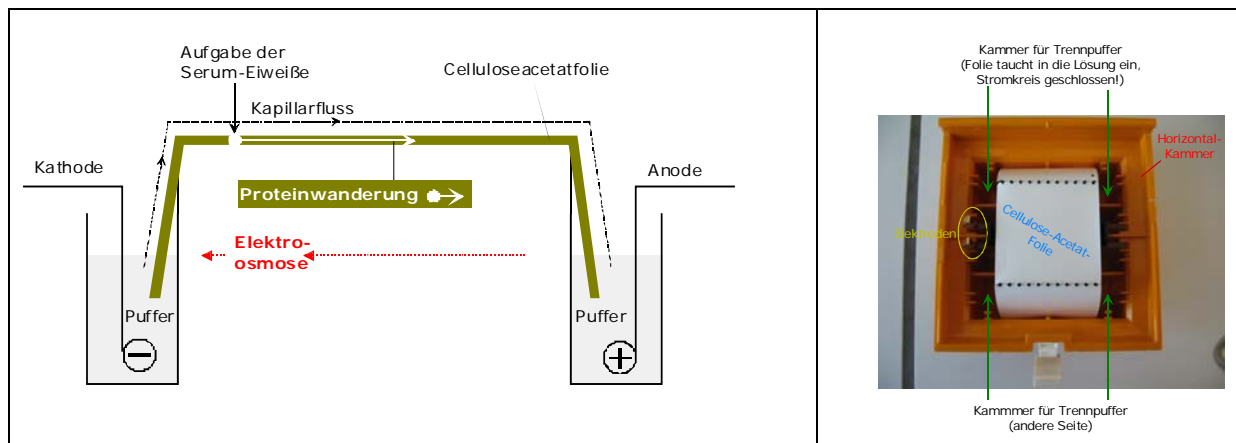


**Bild 5-02** Darstellung-2 „Elektrophorese“

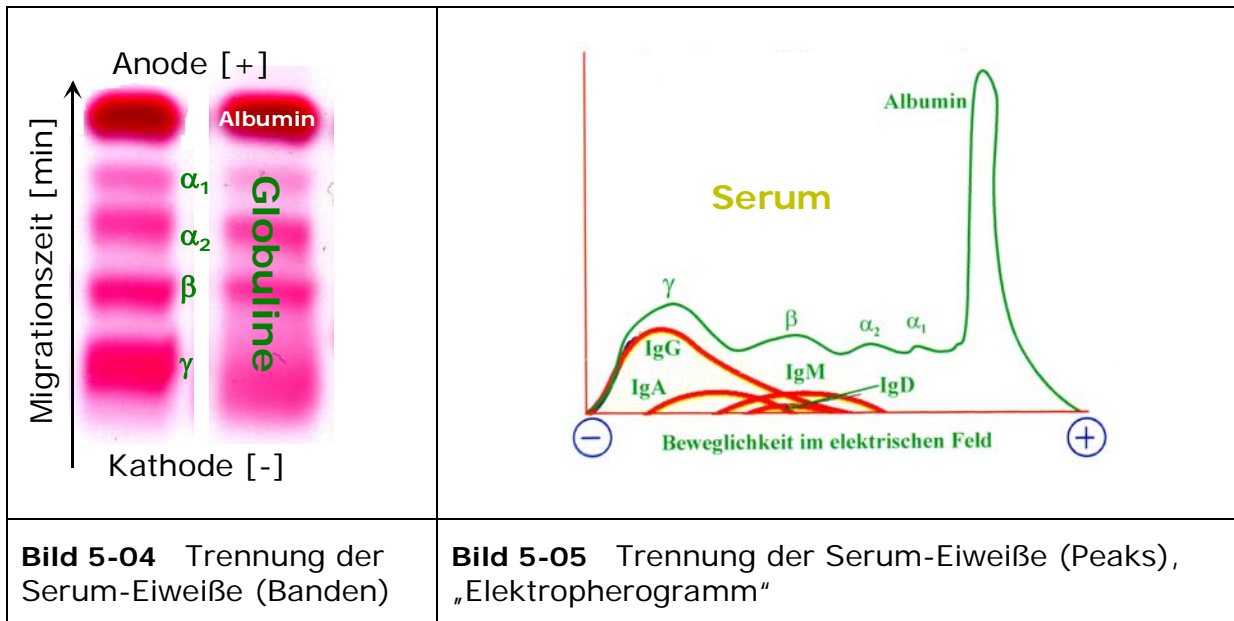
## Elektrophorese-Apparatur

Die folgenden Abbildungen zeigen den Aufbau der Elektrophorese-Kammern für die Analytik von Blutseren. Das sind gelblich gefärbte Eiweiß-Lösungen, die durch Abzentrifugieren der Blutkörperchen und des Fibrinogens (Gerinnungsfaktor) resultieren.

Die Auftrennung der Eiweiße erfolgt in einer Celluloseacetatfolie, die mit Pufferlösungen getränkt ist und deren Folienenden in Gefäße mit Pufferlösung eintauchen (**Bild 5-03**). Nach Aufgabe der Serum-Probe wird Spannung angelegt und die Eiweiße beginnen zur Anode zu wandern. Die Serumproteine tragen negative Ladungen und wandern (migrieren) demzufolge zum Pluspol (Anode). Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Serumproteine auf der Celluloseacetatfolie mit dem roten Farbstoff (Ponceau) angefärbt (**Bild 5-04**). Es werden Albumin sowie  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin sichtbar gemacht (visualisiert).



**Bild 5-03** Darstellungen der Elektrophorese-Kammern

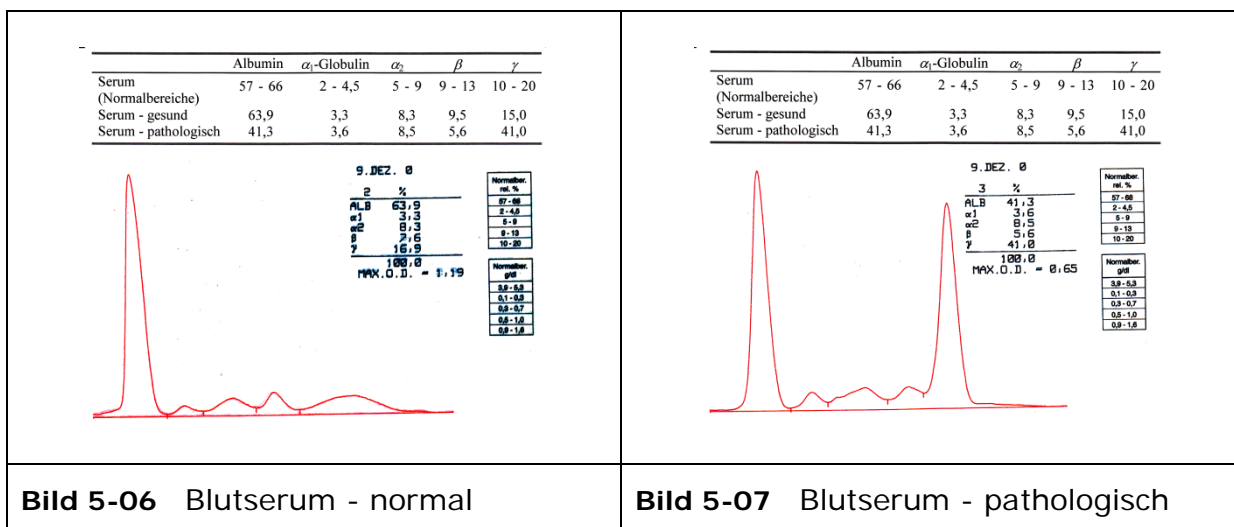


Nach „Abscannen“ der Farbbanden mit einem Densitometer resultiert ein „Elektropherogramm“ (**Bild 5-05**). Für die intensivste Farbbande (Albumin, **vgl. Bild 5-04**) erscheint demzufolge auch der größte Peak im Elektropherogramm.

Im **Bild 5-04** war bereits erkennbar, dass im linken Teil die  $\gamma$ -Globulin-Bande stark gefärbt ist, was auf einen pathologischen Befund hindeutet (s.u.).

Vor allem unter diesem  **$\gamma$ -Globulin-Peak** „verstecken“ sich Antikörper (Immunglobuline wie das IgG). Dringen nun bei Erkrankungen (Infektionen etc.) „Krankheitserreger“ (Antigene) in den menschlichen Körper ein, so erfolgt eine Immunantwort. Diese ist mit einer erhöhten Produktion von Antikörpern (z.B. IgG) verbunden, um die Antigene unwirksam zu machen. Die Erhöhung der Antikörper (IgG) verändert auch die Peakhöhe im Elektropherogramm. In diesem Fall vergrößert sich der  **$\gamma$ -Globulin-Peak** drastisch, wie aus dem Vergleich von **Bild 5-06** (Blutserum eines gesunden Probanden) und **Bild 5-07** (pathologisches Blutserum) hervorgeht.

**Weitere Erläuterungen erfolgen im Praktikum!**



**Bitte per Mail melden, wenn Sie Fragen etc. haben!** [Papa-gey@gmx.de](mailto:Papa-gey@gmx.de)



# 13. Schüler-Praktikum

## BioAnalytik

Dienstag	03. März 2015	9.30 – 16.00 Uhr
Mittwoch	04. März 2015	9.30 – 16.00 Uhr
Samstag	13. Juni 2015	9.30 – 16.00 Uhr

**Pro-Programm:** <http://www.papa-gey.de/news/news.pdf>

1. Struktur und Löslichkeitsverhalten von biologischen und organischen Substanzen.
2. Dünnschichtchromatographie (DC) von Blattfarbstoffen (Chlorophyll), Lebensmittel- und Azofarbstoffen.
3. Analytik von legalen Drogen (Coffein, Alkohol) mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).
4. Strategien zur Analytik von illegalen Drogen (Cocain, Ecstasy).
5. Unterscheidung von gesunden und pathologischen Blutseren mittels Elektrophorese.