

von 1 µg/l. Die Absorption verschiedener organischer Stoffe im ultravioletten Spektralbereich hat zum spektralen Absorptionskoeffizienten (254 nm) als Parameter geführt, der dann in Kopplung mit dem DOC als „spezifischer Absorptionskoeffizient“ eine neue Kenngröße ergibt.

Bei den *Gruppenparametern* sind sowohl in der nationalen wie auch in der supranationalen Gesetzgebung die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe mit sechs Referenzstoffen und einer Summe von 0,2 µg/l hervorgehoben. An diesem Beispiel zeigt sich auch als Aufgabe der Analytik, für die gesetzlich angeordneten Kontrollen Verfahren zu entwickeln, die mit möglichst geringem Aufwand eine Wasserbelastung weit unter diesem Grenzwert anzeigen. Ähnliches gilt für die Pesticide, wo es um Bestimmungen von Wirkgrößen einzelner Gruppen im Spurenbereich geht und ein erheblicher Fortschritt mit dem derzeitigen Stand der Cholinesterasehemmung für die Organophosphate zu verzeichnen ist. Eine weitere Notwendigkeit ist ein Parameter über die komplexierenden Eigenschaften von organischen Wasserinhaltsstoffen gegenüber Schwermetallen. Von der Komplexbildung leitet sich eine Reihe von Auswirkungen auf die Gewässernutzung ab. Als natürliche Liganden sind Huminstoffe bekannt, unter den synthetischen Liganden ist die Nitrilotriessigsäure (NTA) als vorgeschlagener Phosphatersatzstoff der Waschmittel von besonderem Interesse. Auch die *Phenole* (Phenolindex), die *oberflächenaktiven Stoffe* und die *Mineralöle* gehören u. a. zu den Gruppenbestimmungen.

Unter den *Einzelbestandteilen*, die im Vordergrund der Bewertungsdiskussion stehen und auch gesetzgeberisch Bedeutung haben, sind einmal die Trihalogenmethane (Haloforme) zu nennen, von denen für die vier wesentlichsten ein summarischer Höchstwert im Mikrogrammbereich schon amtlich empfohlen wird. Gleiches gilt für andere leichtflüchtige Substanzen (z. B. Tri- und Perchlorethylen), bei denen ebenfalls ein Höchstwert im Mikrogrammbereich zur Diskussion steht.

Die aktuelle Bedeutung organischer Spurenstoffe im Wasser, die auch in Wassergütevorschriften immer mehr zum Ausdruck kommt, erfordert eine zuverlässige Bestimmung dieser Substanzen.

Hier gilt es, frühzeitig und in Abstimmung mit geplanten Anforderungen des Gesetzgebers eine entsprechende Analytik zu erarbeiten, Möglichkeiten der Summen-, Gruppen- und Einzelbestimmungen mit methodischen Verbesserungen zu klären, eine apparative Automation zu entwickeln und die Zuverlässigkeit der Verfahren einschließlich Nachweis- und Bestimmungsgrenzen festzulegen.

Bei allen Verfahren ist ferner der Zeitdruck zu berücksichtigen, da ja vom raschen Vorliegen des Untersuchungsergebnisses die notwendige Abwehrmaßnahme und die Verhinderung gesundheitlicher Gefährdung abhängen kann. Darüber hinaus muß sich aber der Verfahrensaufwand für die laufenden Kontrollen zum Schutz des Verbrauchers in einem vertretbaren Rahmen halten.

Biochemie und Analytik der Glykoproteine Biochemistry and Analysis of Glycoproteins

Fresenius Z Anal Chem (1982) 311:327–328 – © Springer-Verlag 1982

Analysis by High-Resolution ¹H-NMR Spectroscopy of Carbohydrates Derived from Glycoconjugates

J. F. G. Vliegthart

Department of Bio-Organic Chemistry,
State University Utrecht, Croesestraat 79,
3522 AD Utrecht, The Netherlands

Analyse der von Glykokonjugaten abgeleiteten Kohlenhydrate mit Hilfe hochauflösender ¹H-NMR-Spektroskopie

The interest for the biological role and function of the carbohydrate chains of glycoproteins in the living organism is still growing [1]. For several vital processes the involvement via interaction and recognition of such molecular entities has been demonstrated. Quite a number of genetic diseases of man are due to defects in carbohydrate metabolism. Such defects can come to expression in a disturbed conversion of the carbohydrate chains of glycoconjugates.

For an understanding of the molecular events in the aforementioned processes it is obligatory to know at least the primary structures of the interacting parts of the biomolecules involved.

Regarding the determination of the structures of carbohydrate chains, it should be noted that in general this analysis is more complicated than for other biopolymers. The reasons for this are: the variability of constituting monosaccharides, the large num-

ber of possible glycosidic linkages (including their configuration) and the possibility of the occurrence of branched structures. Another problem in the characterization of glycoproteins is already encountered during their purification. Owing to the natural or artificial (micro) heterogeneity of the carbohydrate chains it is difficult to get an adequate fractionation leading to a product, which is homogeneous in the carbohydrate part.

In general, the structures of the carbohydrate moieties of glycoproteins cannot be derived from analysis of the intact macromolecule. By consequence, degradation of the polypeptide backbone to glycopeptides having only a limited number of amino acids, is necessary. Alternatively, the carbohydrate chains can be split off. Depending on the chemical nature, this can be achieved chemically or enzymatically. Subsequently, the obtained degradation products must be fractionated. Often the separation of closely related partial structures is difficult.

In principle, several ways are open for the determination of the primary structure of the carbohydrate chains. We introduced the application of high resolution ¹H-NMR spectroscopy for this purpose. This method has proved to be an efficient and powerful approach to get detailed structural information [2–5]. Our experimental set-up comprises the recording of ¹H-NMR spectra of underivatized oligosaccharides, glycopeptides, etc. in D₂O solutions at ambient temperature on 360 or 500 MHz Bruker NMR machines operating in the Fourier transform mode. For the translation of the ¹H-NMR spectra into primary structures, the concept of structural reporter groups was developed. The chemical shifts and coupling constants of protons resonating at clearly distinguishable positions in the spectra contain essential information for the structural assignments. In addition, the

linewidths of such signals are helpful for the interpretation and provide in several instances insight into segmental mobilities in the carbohydrate chains as well as into spatial arrangement. The intensities of the signals are very important since they allow conclusions on the purity of the samples and render possible the determination of the molar ratio of components in a mixture.

This type of analysis, often in conjunction with methylation analysis, has been successfully applied to a wide variety of carbohydrate chains of the N- as well as of the O-glycosidic type.

Oligosaccharides, oligosaccharide-alditols and glycopeptides were obtained from a wide variety of biological sources (tissues and body fluids) and they were derived from soluble or membrane-bound glycoproteins via enzymatical or chemical degradations. From several types of patients including those suffering from inborn errors of metabolism relevant material was obtained. Determination of primary carbohydrate structures is valuable for diagnostic purposes.

The NMR method is one of the few methods to analyse adequately complex mixtures of closely related compounds. In other words (micro)heterogeneity of carbohydrate chains can be

disclosed and also the quantitative composition estimated. Another important application of high resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy is the monitoring of enzymatic conversions, e.g. by glycosidases or glycosyltransferases.

In general, samples as small as 25 nmoles can be analysed.

References

1. Montreuil J (1980) *Adv Carbohydr Chem Biochem* 37:157–223
2. Vliegthart JFG, Halbeek H van, Dorland L (1981) *Pure Appl Chem* 53:45–77
3. van Halbeek H, Dorland L, Vliegthart JFG, Jouanneau J, Bourrillon R (1981) *Biochem Biophys Res Commun* 99:886–892
4. van Halbeek H, Dorland L, Vliegthart JFG, Montreuil J, Fournet B, Schmid K (1981) *J Biol Chem* 256:5588–5590
5. Dorland L, van Halbeek H, Vliegthart JFG, Lis H, Sharon N (1981) *J Biol Chem* 256:7708–7711