

Mehr Spielraum für die native chemische Peptidkupplung

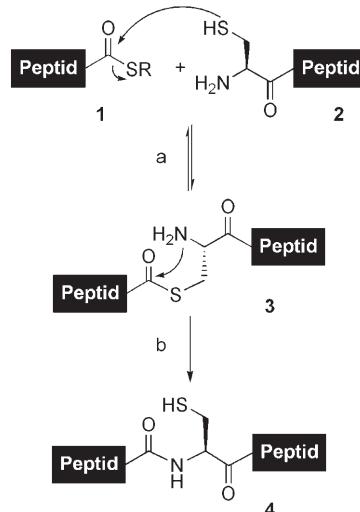
Christian Haase und Oliver Seitz*

Auxiliare · Entschwefelung · Native chemische Ligation · Peptide · Thioester

Eine Totalsynthese nativer, funktionsfähiger Proteine galt noch in den frühen 1990ern als fast unerreichbares Ziel. Dank Kents Entwicklung der „native chemischen Ligation“ ist die chemische Proteinsynthese mittlerweile aber in den Bereich des Machbaren gerückt.^[1] Die Grundlage für diese erfolgreiche Methode bildet die von Wieland beschriebene, chemoselektive Reaktion eines Peptidthioesters mit einem Cysteinylpeptid.^[2] Diese verläuft in wässrigen Puffersystemen und produziert eine „natürliche“ Peptidbindung. Dabei können die Peptidsegmente in ungeschützter Form miteinander verknüpft werden, wobei es beispielsweise auch möglich ist, glycosyierte oder phosphorylierte Peptide zu synthetisieren. Durch die Kombination mit molekularbiologischen Methoden gelingt die Synthese ortsspezifisch modifizierter Proteine durch „Expressed Protein Ligation“, die Molmassen bis zu 52 kDa (β-Untereinheit der F₁-ATPase) liefert.^[3]

Der prinzipielle Verlauf der nativen chemischen Ligation ist in Schema 1 wiedergegeben. Zunächst beteiligen sich die Thiolseitenketten von Cysteinresten an reversiblen Austauschreaktionen, in denen das Thiol RSH des Peptidthioesters auch durch das Cysteinylpeptid **2** ersetzt wird. Das neu gebildete Thioesterintermediat **3** reagiert über einen fünfgliedrigen Übergangszustand in einem S→N-Acyltransfer zum Verknüpfungsprodukt **4**. In dieser Reaktionssequenz bestimmt der Thioltausch die Geschwindigkeit. Zur Reaktionsbeschleunigung werden Thioladditive wie Benzylmercaptan, Thiophenol oder 2-(4-Mercaptophenyl)essigsäure (MPAA)^[4] zugesetzt. Diese führen in einem vorgelagerten Gleichgewicht zur Bildung reaktiverer Thioester. In einem Beispiel gelang die Totalsynthese eines kovalent verknüpften HIV-1-Protease-Dimers, das die beeindruckende Zahl von 203 Aminosäuren aufweist.^[5]

Die Anwendbarkeit der nativen chemischen Ligation ist in zweierlei Weise eingeschränkt. So ist zum einen die Synthese von basenlabilen Peptidthioestern **1** nicht immer so einfach, wie für Peptidsäuren und Peptidamide gewohnt. Zum anderen ist Cystein eine verhältnismäßig seltene Ami-



Schema 1. Prinzip der native chemischen Ligation. Zunächst ersetzt das Cysteinylpeptid in einem reversiblen Thioltausch die Thiolkomponente des Thioesters. Danach erfolgt im S→N-Acyltransferschritt die Bildung einer nativen Peptidbindung.

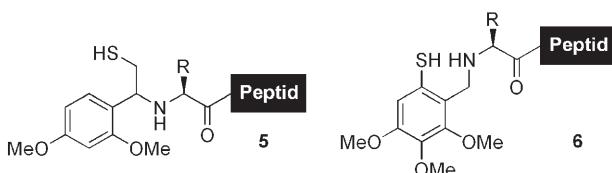
nosäure (1.4% Gehalt), sodass bei einem gegebenen Zielprotein häufig ein artifizieller Cysteinrest eingeführt werden muss, um eine geeignete Verknüpfungsstelle zu schaffen. Das vorliegende Highlight befasst sich mit aktuellen Fortschritten bei der Überwindung dieser beiden Hindernisse.

Der begrenzte Zugang zu Peptidthioestern ist eines der Haupthindernisse der native chemischen Ligation. Um der Basenlabilität der Thioesterstruktur Rechnung zu tragen, wurden Peptidthioester meist durch *tert*-Butoxycarbonyl-(Boc)-Festphasensynthese hergestellt.^[6a] Die hierbei erforderliche Verwendung starker Säuren für die Ablösung des Peptides vom polymeren Träger ist jedoch nicht mit säureempfindlichen Seitenkettenmodifikationen wie Glycosylierungen oder Phosphorylierungen vereinbar. Daher werden intensiv Methoden erforscht, die eine Anwendung der milderen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasensynthese ermöglichen. So wurden zum einen alternative Bedingungen für die Fmoc-Abspaltung gesucht, unter denen die Thioesterfunktion erhalten bleibt,^[6b,c] und zum anderen Verfahren entwickelt, in denen der Thioester erst in einem späten Schritt der Synthese aufgebaut wird.^[6d-l] Kürzlich wurde eine Methode mit Selbstreinigungseffekt vorgestellt, durch die

[*] C. Haase, Prof. Dr. O. Seitz
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Peptidthioester ohne präparative Reinigungsschritte in hoher Reinheit erhalten werden.^[7]

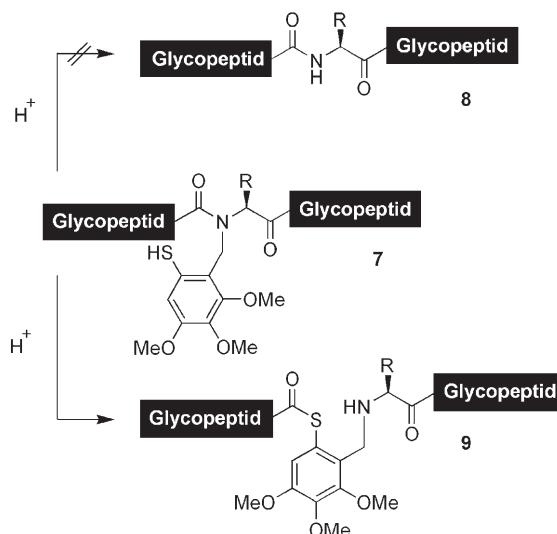
Die wesentlichste Einschränkung der nativen chemischen Ligation ist die Tatsache, dass ein Cysteinrest als nucleophiler Reaktionspartner an der Reaktion teilnehmen muss. Um diese Einschränkung zu beseitigen, wurden Auxiliargruppen entwickelt, die die Cysteinstruktur imitieren, indem sie eine abspaltbare Thioleinheit anbieten. Üblicherweise ist die Hilfsgruppe an der terminalen α -Aminogruppe des C-terminalen Fragments angebracht. Die derzeit leistungsfähigsten Auxiliare enthalten eine Thiolgruppe in einer *N*-Benzylmodifikation (Schema 2). Die elektronenreichen Substituenten



Schema 2. Auxiliare für die cysteinfreie chemische Ligation. Die Mercaptogruppe übernimmt zunächst das Peptidfragment, das im Acyl-migrationsschritt an das sekundäre Aminstickstoffatom weitergereicht wird

ermöglichen die Freisetzung des gebildeten Amids durch Acidolyse.^[8a,b] Die auxiliarvermittelte Knüpfung einer Glycin-Glycin-Peptidbindung verläuft meist unproblematisch. Sobald jedoch der sterische Anspruch an einem der beiden Reaktionspartner steigt, nehmen die erzielbaren Verknüpfungsgeschwindigkeiten ab. Es ist daher ratsam, die Verknüpfungsstelle unter Beteiligung mindestens eines Glycinrestes zu wählen.

So gelang es unter Verwendung des 1-(2,4-Dimethoxyphenyl)-2-mercaptoproethyl-Auxiliars **5** die 106 Aminosäuren lange Sequenz von Cytochrom b562 aus zwei Fragmenten aufzubauen, wobei die Verknüpfung zwischen einem Peptidylhistidinrest und einem Glycylpeptid erfolgte.^[8c] Erst kürzlich berichteten Danishefsky et al. über die Verwendung des Trimethoxybenzylauxiliars **6** beim Aufbau komplexer Glycopeptide. Hierbei wurde die auxiliarvermittelte Verknüpfung zwischen einem Glycinthioester und Glutaminylpeptid nicht in einem wässrigen Puffersystem, sondern in Dimethylformamid durchgeführt.^[8d] Beim Versuch einer acyldolytischen Entfernung der Auxiliargruppe in Glycopeptid **7** wurde beobachtet, dass die Protonierung des sekundären Amidstickstoffatoms eine Rückwanderung des Peptidacylrestes auf die Auxiliar-SH-Gruppe induziert (Schema 3). Aus diesem Grund konnten lediglich das Intermediat **9** und dessen Hydrolyseprodukte erhalten werden. Die Methylierung der SH-Funktion des Auxiliars verhinderte diese intramolekulare Acylwanderung, sodass die anschließende Säurebehandlung das gewünschte Ergebnis lieferte. Die Tatsache, dass die relativ anspruchsvolle Glycin-Glutamin-Verknüpfung möglich ist, macht das Trimethoxybenzylauxiliar noch interessanter. Um dem Problem von Mehrfachmethylierungen zu begegnen, müssen reaktive Gruppen eventuell geschützt werden.

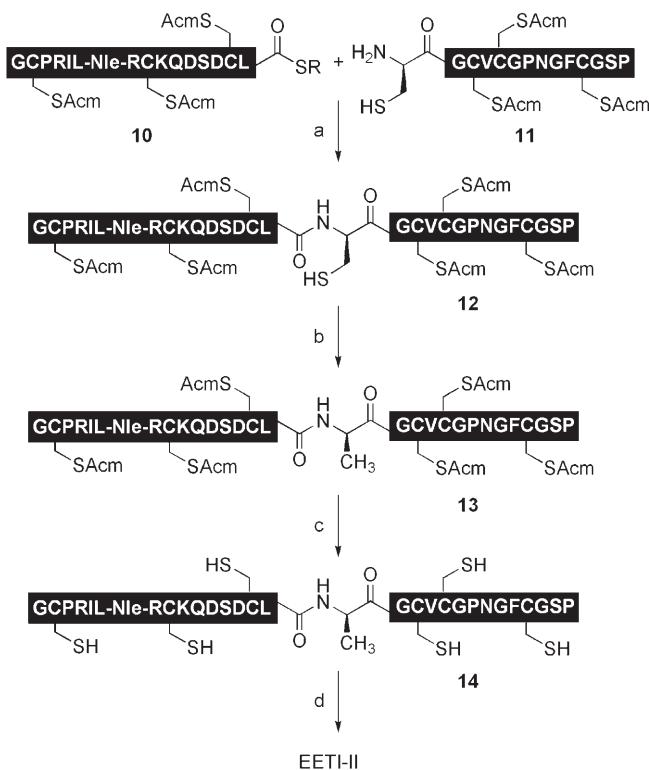


Schema 3. Bei der sauren Behandlung des Verknüpfungsprodukts **7** kann ein N→S-Acyltransfer (→**9**) die Abspaltung der Ligationshilfsgruppe behindern. Erst nach Methylierung der Thiolfunktion in **7** ist eine quantitative Entfernung des Auxiliars möglich.

Eine Alternative zur Verwendung von Auxiliaren bietet die Verwendung von β -Mercaptoaminosäuren und deren nachfolgende Entschwefelung. Im einfachsten Fall wird hierbei auf das für die Verknüpfung optimale Cystein zurückgegriffen, das anschließend in Alanin überführt wird.^[9a] Alanin kommt in Proteinen häufig vor, weshalb eine geeignete XX-Ala-Verknüpfungsstelle (XX \neq Pro)^[10] in nahezu jedem Protein auffindbar sein sollte. Um unbeteiligte Cysteinreste vor Entschwefelung zu schützen, können sie mit der Acetamidomethyl(Acm)-Schutzgruppe versehen werden.^[9b] Schema 4 veranschaulicht die Vorgehensweise anhand der Synthese des Trypsininhibitorproteins EETI-II. Dabei wurde zunächst die native chemische Ligation des Leucinthioesters **10** mit dem Cysteinylpeptid **11** vollzogen. Im Anschluss wurde das Schwefelatom durch Umsetzung mit einem großen Überschuss an Raney-Nickel entfernt. Danach wurden die inneren Cysteinseitenketten demaskiert und die Faltung des nativen EETI-II in einem Redoxpuffer initiiert.

Kürzlich erweiterten Crich et al. und Botti et al. das Repertoire dieser Strategie.^[11a,b] Anstelle eines Cysteinrestes wurde ein β -Mercaptophenylalaninbaustein verwendet. Dieser liefert nach metallvermittelter Entschwefelung Phenylalanin, das in Proteinen in 4.1% Häufigkeit auftritt. Modellreaktionen demonstrierten, dass auch Met-Phe- und Ile-Phe-Verknüpfungen möglich sind. Prinzipiell ist die Synthese des β -Mercaptophenylalaninbausteins auch auf Histidin, Tryptophan und Tyrosin übertragbar.^[11a]

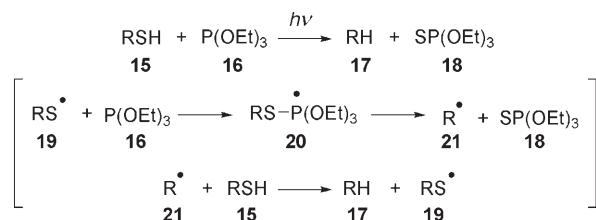
Die native chemische Ligation an Cysteinyl- und β -Mercaptophenylalaninpeptiden verläuft mit ausreichend hohen Reaktionsgeschwindigkeiten, auch wenn der C-Terminus des Peptidthioesters aus sterisch anspruchsvollen Aminosäuren wie Valin oder Isoleucin besteht. Prinzipiell eignet sich die Methode für vielfältige Dipeptidsegmente, sie bringt allerdings mögliche Nebenreaktionen bei der Entfernung der Thiolgruppe mit sich. Typischerweise werden zur Entschwefelung hohe Überschüsse an Metallen oder Hydrierkatalysatoren benötigt.



Schema 4. Verknüpfungs-Entschwefelungs-Strategie. Zunächst reagieren Cysteinylpeptid und Peptidthioester im Sinne der nativen chemischen Ligation (a). Das Cysteinylprodukt **12** wird im Anschluss durch Umsetzung mit einem hohen Überschuss an Raney-Nickel in das Alanylprodukt **13** überführt (b). Danach folgt durch Umsetzung mit I_2 die Entfernung der Acm-Schutzgruppen von den unbeteiligten Cysteinresten, die Bildung dreier Disulfidbrücken in Gegenwart eines Glutathion-Redoxpuffersystems und damit die Faltung des nativen EETI-II (c und d).

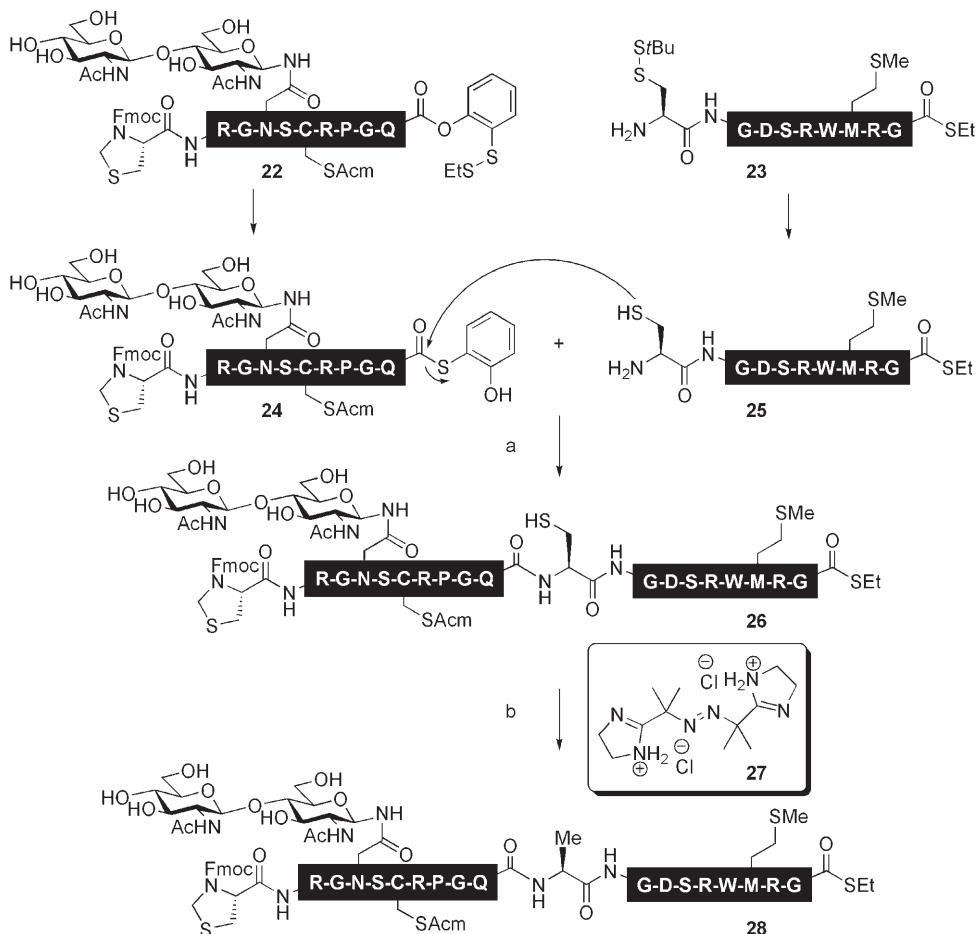
toren benötigt. Diese reagieren in unerwünschter Weise jedoch auch mit Methionin unter Bildung eines α -Aminobuttersäurerestes. Zudem ist die Thiazolidin-Schutzgruppe, die bei konsekutiven Segmentkupplungen zur intermediären Maskierung N-terminaler Cysteinreste verwendet wird, bei Entschwefelung mit einem Metall instabil. Ein Problem bei der Synthese größerer Peptide sind die geringen Wiederfindungsrationen des Peptidmaterials, dessen quantitative Extraktion aufgrund von Adsorption an der großen Metallooberfläche schwierig sicherzustellen ist. Bis vor kurzem war der erforderliche Einsatz großer Mengen an Entschwefelungsreagens ein entscheidender Nachteil der Strategie. Eine neue Methode nach Danishefsky et al. kommt ohne Metallreagens aus und rückt damit die Verknüpfungs-Entschwefelungs-Strategie in ein neues Licht.^[12] Das Verfahren basiert auf einer Reaktion zur Entschwefelung von Mercaptanen mit Trialkylphosphiten, die Hoffmann et al. bereits 1956 vorgestellt hatten.^[13a]

Walling und Mitarbeiter ersetzten die Phosphite durch Phosphine als Entschwefelungsreagens und postulierten den in Schema 5 gezeigten Mechanismus.^[13b,c] Dabei reagiert das unter Lichteinfluss erzeugte Thiylradikal **19** mit dem Phosphit **16** unter Bildung der Phosphoranylspezies **20**, deren Zerfall das Alkyradikal **21** liefert. Die homolytische Abstraktion



Schema 5. Vorgeschlagener Mechanismus der radikalischen Entschwefelung.^[13b]

eines Wasserstoffatoms von verbleibenden Mercaptanen generiert das entschwefelte Produkt und setzt gleichzeitig durch Bildung einer neuen Thiylspezies **19** die Radikalkette fort. Valencia und González nutzten Triethylboran in Acetonitril als Radikalstarter, um durch die Reaktion mit dem stark nucleophilen Triethylphosphit Cystein in Alanin zu überführen.^[14] Die von Danishefsky et al. verwendeten Reagentien bereiten den Boden für eine Anwendbarkeit in der Proteinchemie. Als Reduktionsmittel fungiert das in der Peptidchemie nahezu allgegenwärtige Triscarboxyethylphosphin (TCEP). Für den Start der Radikalkette setzten Danishefsky et al. VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]-Di-hydrochlorid, **27**) ein. Dieses Reagens und ein Analogon, AVCA (4,4'-Azobis(4-cyanvaleriansäure), wurden kürzlich als Initiatoren der radikalischen Verknüpfung von Thiol-Glycopeptiden mit Olefin-Konjugaten vorgestellt.^[15] TCEP und VA-044 sind beide wasserlöslich. Im Beispiel in Schema 6, das die hohe Selektivität dieser Entschwefelungsmethode demonstriert, wurden zunächst die beiden Peptidfragmente **22** und **23** fusioniert. Dabei erfolgte zunächst die reduktive Spaltung der Disulfide beider Ligationskomponenten, wodurch der phenolische Ester **22** zum Thioesterintermediat **24** reagierte. Die Verknüpfung des Glutaminthioesters und des Cysteinylpeptides verlief rasch und unproblematisch, sodass das Ligationsprodukt **26** nach nur zwei Stunden Reaktionszeit in einer Ausbeute von 67% isoliert werden konnte. Eine Reaktion des Cysteinrestes mit dem C-terminalen Ethylthioester trat hierbei lediglich im Verknüpfungsprodukt **26** und nur in geringem Umfang unter Bildung eines Thiolactons auf. Das Produkt **26** der Cysteinylligation wurde anschließend in einer wässrigen Lösung mit dem Radikalstarter VA-044 und TCEP für die Dauer von nur zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Als weitere Reaktionskomponenten wurden *t*BuSH und EtSH (beide in großem Überschuss) eingesetzt, um als Hydriddonoren die Reaktion zu beschleunigen. Die zahlreichen schwefelhaltigen Gruppen des Cysteinylpeptids **26** blieben bei der Reaktion unverändert. So konnte **26** trotz des Vorhandenseins eines Thiazolidins, eines Acm-geschützten inneren Cysteinrestes, eines Methioninrestes und eines C-terminalen Thioesters selektiv ausschließlich am ungeschützten Cysteinrest entschwefelt werden. Die zahlreichen schwefelhaltigen Struktureinheiten wurden ebenso toleriert wie das Asparagin-gebundene Disaccharid, dessen sekundäre Hydroxygruppen unter den Bedingungen einer Raney-Nickel-vermittelten Entschwefelung von einer Epimerisierung bedroht gewesen wären. Das nunmehr alainhaltige Peptid **28** konnte nach der Schwefelentfernung in einer Ausbeute von 87% isoliert werden. Im Vergleich mit



Schema 6. Kinetisch kontrollierte Ligation und selektive metallfreie Entschwefelung. a) 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 0.2 M Na₂PO₄, 0.19 mM TCEP-HCl-Puffer (pH 6.3), 67%; b) EtSH, tBuSH, TCEP, 27, 37°C, 87%.

herkömmlichen Verfahren liefert die Entschwefelungsstrategie von Danishefsky et al. eine hohe Ausbeute und Peptidmaterial-Rückgewinnungsrate, verläuft praktisch ohne Nebenreaktionen und ist zudem metallfrei. Erst hierdurch wird die Kombination von nativer chemischer Ligation und Entschwefelung zu einer robusten, konkurrenzfähigen Methode.

Die native chemische Ligation ist in den letzten zehn Jahren zu einem der leistungsfähigsten Hilfsmittel der Proteinchemie geworden. Die steigende Zahl an Publikationen mit biologischem Hintergrund, deren Ergebnisse auf der Verknüpfung von Peptidfragmenten mithilfe dieser Methode beruhen, verdeutlicht das Potenzial dieses Verfahrens. Die Entwicklung von Auxiliaren und Verknüpfungsalternativen wie der Ligations-Entschwefelungs-Strategie erweitert das Repertoire dieser Methode ständig. Verbesserte Verfahren wie die von Danishefsky et al. vorgestellte Entschwefelungsmethode erleichtern die Synthese bis zu einem Grad, der auch dem weniger versierten Forscher einen Zugang zu dem maßgeschneiderten Protein seiner Wahl eröffnet.

Online veröffentlicht am 31. Januar 2008

[1] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
 [2] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149.
 [3] V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 429–438.
 [4] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646.
 [5] V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1697–1700; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1667–1670.
 [6] a) H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111–117; b) A. B. Clippongdale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 225–234; c) X. Q. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672; d) S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237–6240; e) A. Sewing, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3395–3396; f) D. Swinnen, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2439–2442; g) J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8761–8769;
 h) J. Tulla-Puche, G. Barany, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4101–4107;
 i) T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8805–8807; j) N. Ollivier, J. B. Behr, O. El-Mahdi, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2647–2650; k) H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28; l) Y. Ohta, S. Itoh, A. Shigenaga, S. Shintaku, N. Fujii, A. Otaka, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 467–470; m) F. Nagaike, Y. Onuma, C. Kanazawa, H. Hojo, A. Ueki, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4465–4468; n) P. Botti, M. Villain, S. Manganiello, H. Gaertner, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4861–4864; o) V. Y. Dudkin, M. Orlova, X. D. Geng, M. Mandal, W. C. Olson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9560–9562; p) J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo, A. R. Mitchell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4145–4151; q) Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684–11689; r) R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
 [7] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4661–4665; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4577–4580.
 [8] a) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646; b) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831–1833; c) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554–6559; d) B. Wu, J. H. Chen, J. D. Warren, G.

Chen, Z. H. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4222–4231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116–4125.

[9] a) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533; b) B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687–690.

[10] Die Reaktivität von Peptidylprolinthioestern ist gering: T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068–10073.

[11] a) D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064–10065; b) P. Botti, S. Tchertchian, WO 2006/133962, **2006**.

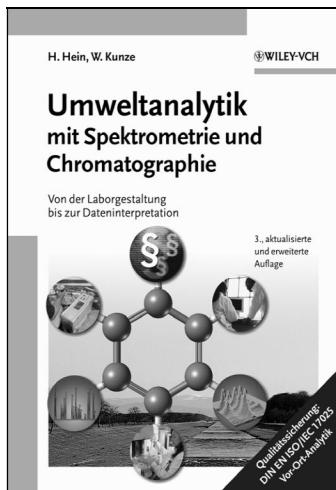
[12] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.

[13] a) F. W. Hoffmann, R. J. Ess, T. C. Simmons, R. S. Hanzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6414–6414; b) C. Walling, R. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5326–5326; c) C. Walling, O. H. Bashedow, E. S. Savas, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2181–2184.

[14] A. González, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2761–2764.

[15] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319–5323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226–5230.

Der bewährte Wegweiser in 3. Auflage



2004. X, 302 Seiten,
ca. 120 Abbildungen,
ca. 38 Tabellen. Gebunden.
ISBN 978-3-527-30780-7
€ 135,-/SFr 213,-

HUBERT HEIN,
vormals Perkin-Elmer GmbH
und WOLFGANG KUNZE, TA Instruments

**Umweltanalytik mit
Spektrometrie und
Chromatographie**
Von der Laborgestaltung
bis zur Dateninterpretation
3., vollst. überarb. u. erw. Auflage

Ihr Wegweiser für erfolgreiche
Umweltanalytik, in der vollständig
überarbeiteten und erweiterten
3. Auflage! Diese behandelt ins-
besondere auch Aspekte der
Wirtschaftlichkeit sowie in einem
eigenen Kapitel die Methoden der
Vor-Ort-Analytik. Ein genau auf die
Bedürfnisse der Laborleiter
zugeschnittenes Werk.

"Jeder Laborleiter kann sich mit
diesem einzigartigen Handbuch
kompakt, aktuell und gezielt über den
Stand des Labormanagements sowie
der anerkannten spektrometrischen
und chromatographischen Methoden
informieren."

**sicher ist sicher - Arbeitsschutz
aktuell**

"Das Buch gibt einen umfassenden
Überblick über Umweltanalytik und
Umweltgesetzgebung und ist
Einstiegern und Studenten auf dem
Gebiet der Umweltanalytik ohne
jegliche Einschränkung zu empfehlen."
H. Engelhardt, *Chromatographia*

3720709_kn

Register now for the free
WILEY-VCH Newsletter!
www.wiley-vch.de/home/pas

WILEY-VCH • Postfach 10 11 61 • D-69451 Weinheim
Fax: +49 (0) 62 01 - 60 61 84
e-Mail: service@wiley-vch.de • <http://www.wiley-vch.de>

 **WILEY-VCH**