Klinische Chemie und Laboratoriumdiagnostik

Vorlesung: Chromatographie und Massenspektrometrie

Dr. rer. nat. Frank Kannenberg

Centrum für Laboratoriumsmedizin
– Zentrallaboratorium –
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1
D-48149 Münster
Tel.: 0251 83-47227
Fax: 0251 83-47225
kannenberg@uni-muenster.de
www.klichi.uni-muenster.de

Sommersemester 2014

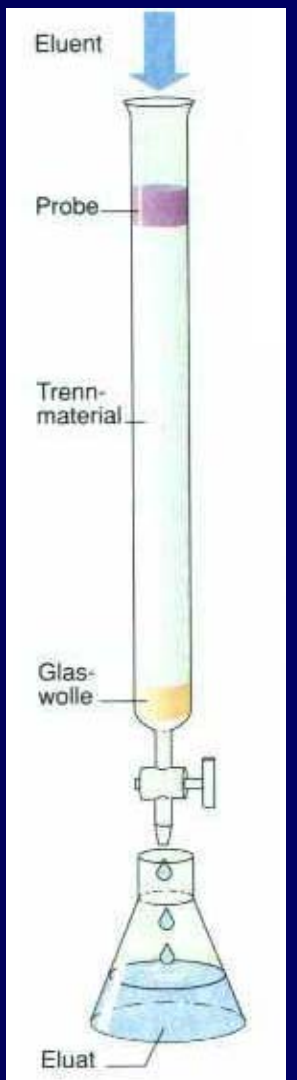
Gliederung

1. **Chromatographie, Geschichte, Prinzip**
2. DC (Dünnschicht-Chromatographie)
3. HPLC (Flüssig-Chromatographie)
4. GC (Gas-Chromatographie)
5. Massenspektrometrie und MS-Kopplungen

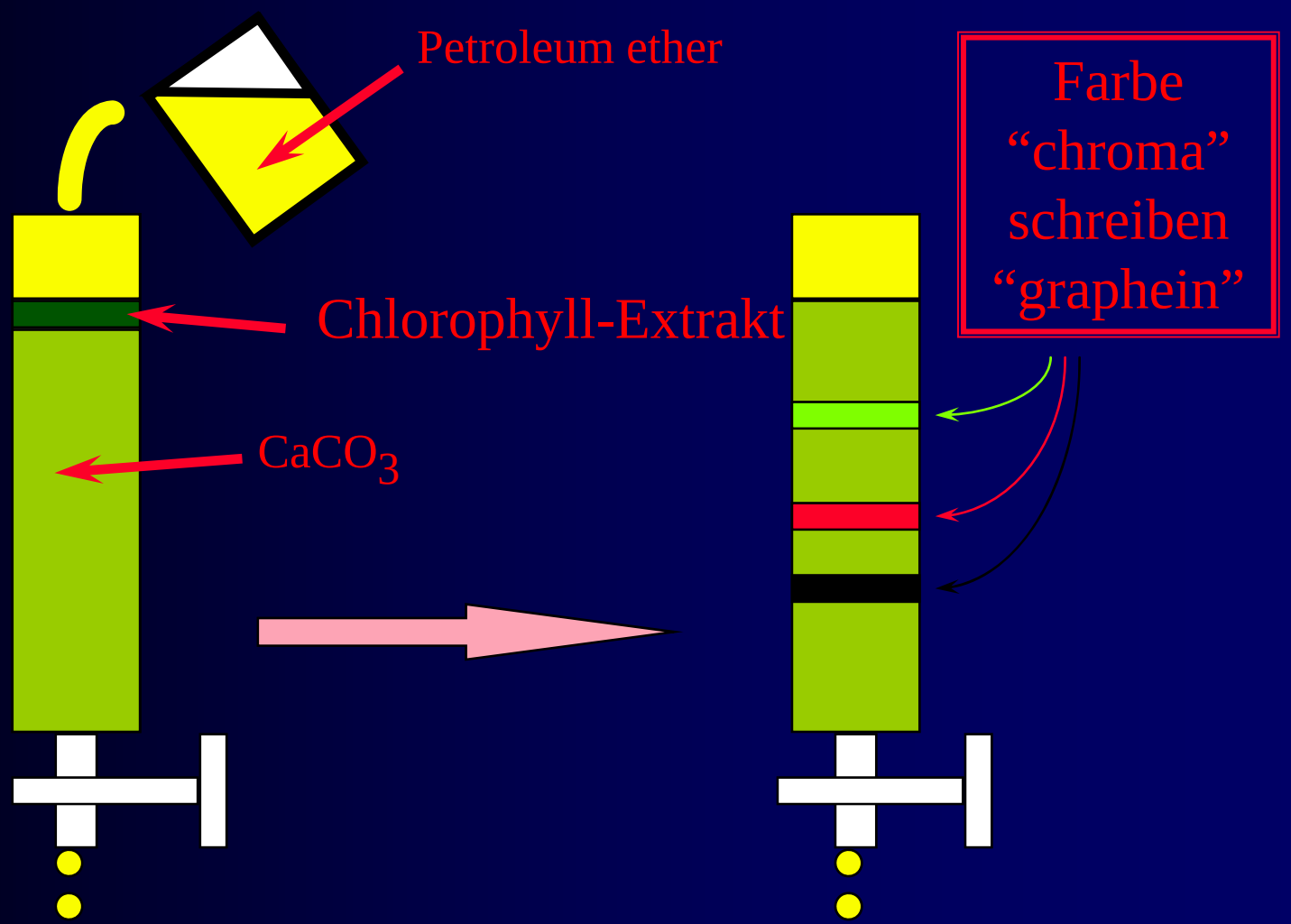
M.Tswett 1903

M. Tswett (Cvet; Цвет) schlug die Methode vor und prägte den Begriff Chromatographie. Seine Arbeiten wurden viele Jahre nicht beachtet.

- Chromatogra~~ph~~fie: „mit Farbe schreiben“
- Tswett 1903: Auftrennung von Chlorphyll



Säulenchromatographie



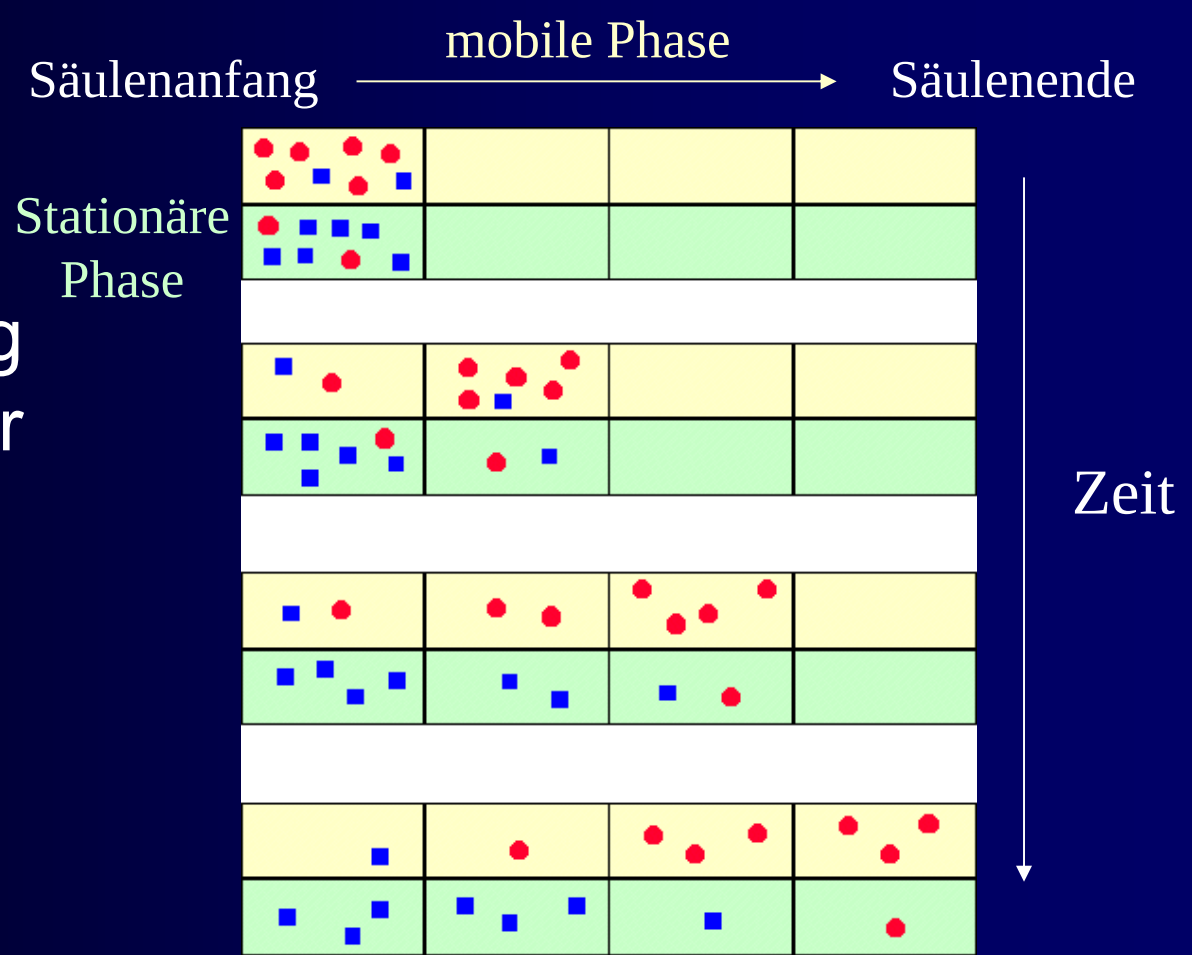
Was ist Chromatographie?

Trennung ähnlicher Moleküle aus komplexen Gemischen

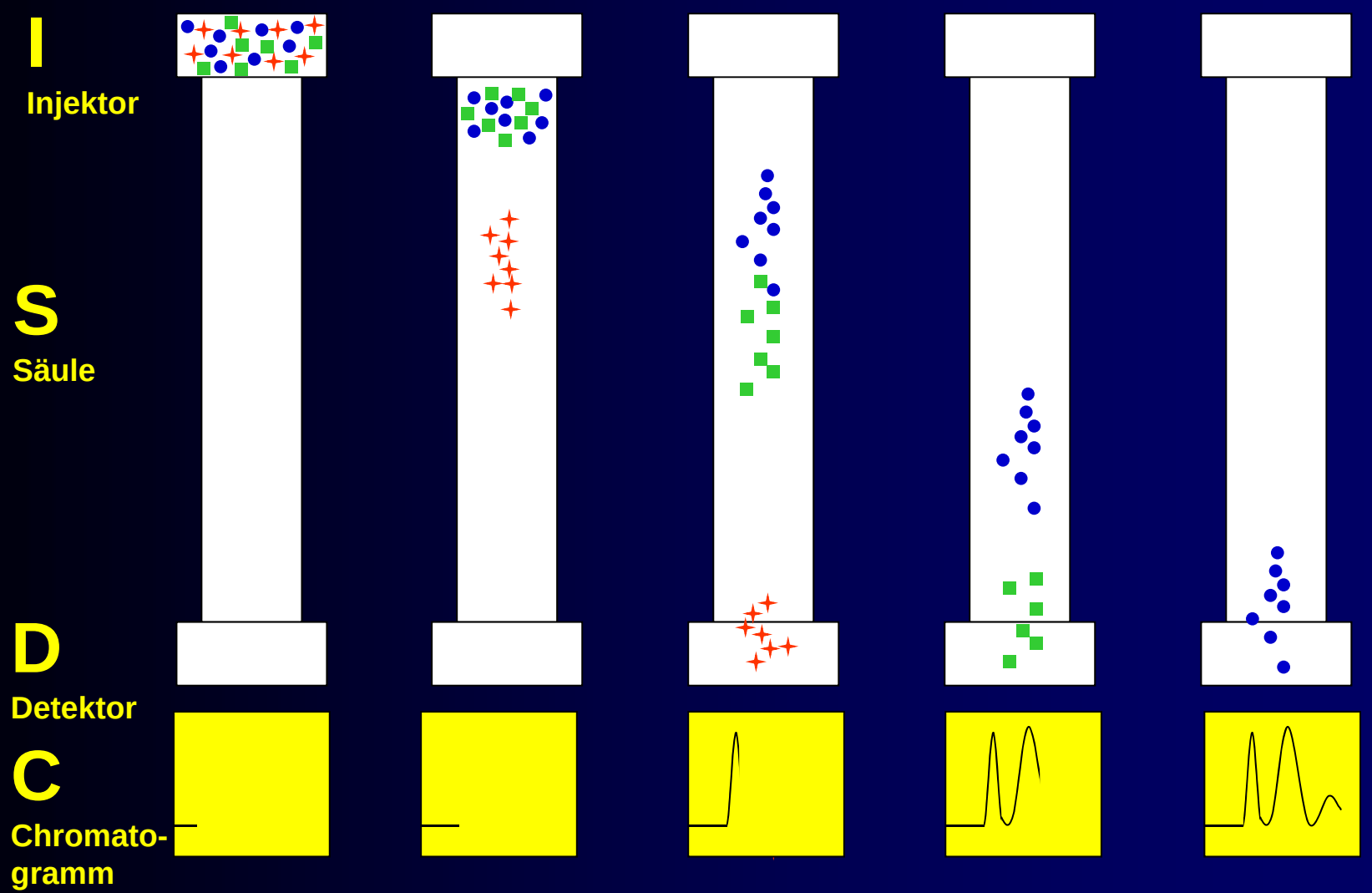
- Die Analyte werden in einer mobilen Phase gelöst und darin durch eine stationäre Phase transportiert.
- Die Phasen werden so gewählt, dass sich die Analyte unterschiedlich in ihnen verteilen.
- Durch die dadurch entstehenden Mobilitätsunterschiede trennen sich die Probe-Komponenten in Banden auf.

Trennprinzip

- Stoffgemisch
- Komponenten wechseln ständig zwischen mobiler und stationärer Phase
- Gleichgewicht (Verteilung, Adsorption)
- Trennung

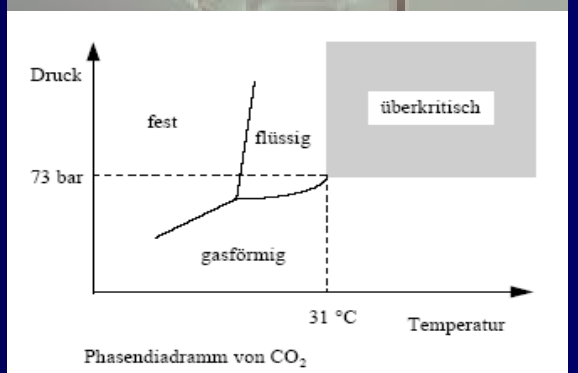


Trennprinzip



Klassifikation der Chromatographie

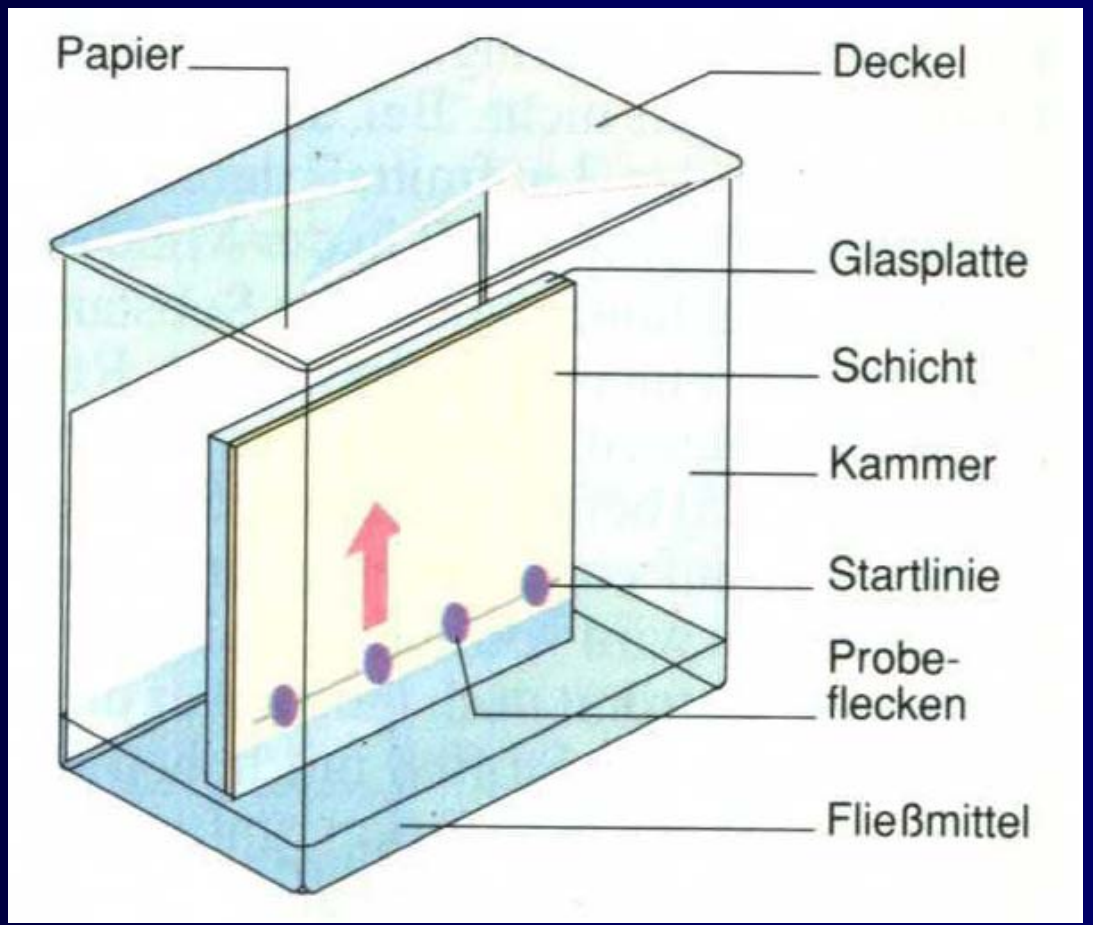
- Planare Chromatographie:
  - Papierchromatographie
  - Dünnschichtchromatographie (DC)
- Säulenchromatographie:
  - gepackte Säulen
  - Flüssigchromatographie (LC, HPLC, IEC, GPC)
  - Gaschromatographie (GC, GLC, GSC)
  - Chromatographie mit überkrit. Fluiden (SFC), z.B CO_2



Phasendiadramm von CO_2

Dünschichtchromatographie (DC)

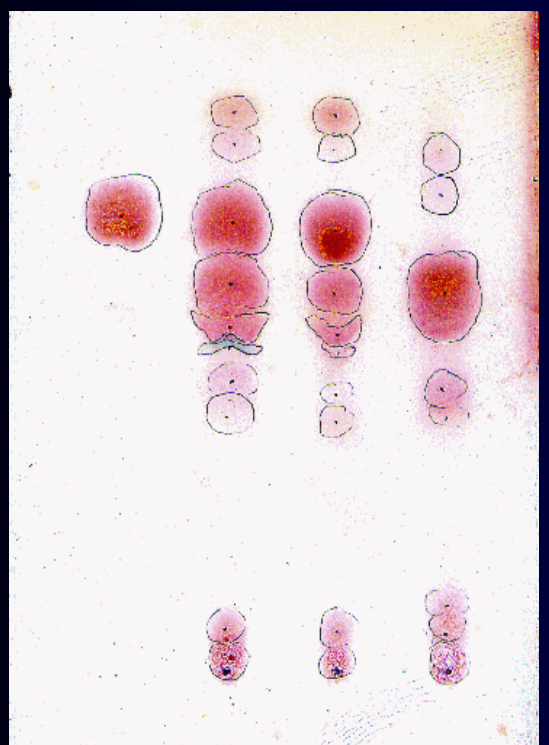
- stationäre Phase:
  - z.B. Kieselgel (polar) auf Glasplatte oder Alufolie
- mobile Phase:
  - Laufmittel, z.B. Ethanol
- DC-Chromatogramm:
  - Auftragen (man./autom.)
  - Entwickeln („DC-Lauf“)
  - Trocknen, Detektieren (ggf. Anfärben)
- Polaritäten beachten!
  - polare (hydrophile) Analyten „laufen“ auf Kieselgel nicht

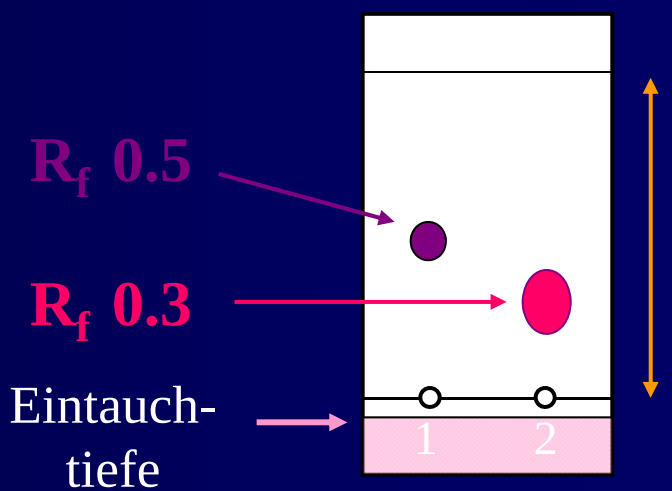


Retentionsfaktor (R_f –Wert)

- Substanzspezifisch (bei gleichen chromat. Bedingungen)

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke Substanz}}{\text{Laufstrecke Lösungsmittel}}$$





Normal-/Umkehrphasen-Chomatographie

- „Normalphase“:
  - Kieselgel (SiO_2)
  - polar (hydrophil)
  - für hydrophobe Analyten
  - Laufmittel unpolar (z.B. Heptan)
- RP-Phase („reversed phase“):
  - Kieselgel (SiO_2) mit unpolaren Gruppen
  - unpolar (hydrophob)
  - Trennung hydrophiler Analyten möglich
  - Laufmittel polarer (z.B. Acetonitril/Wasser)

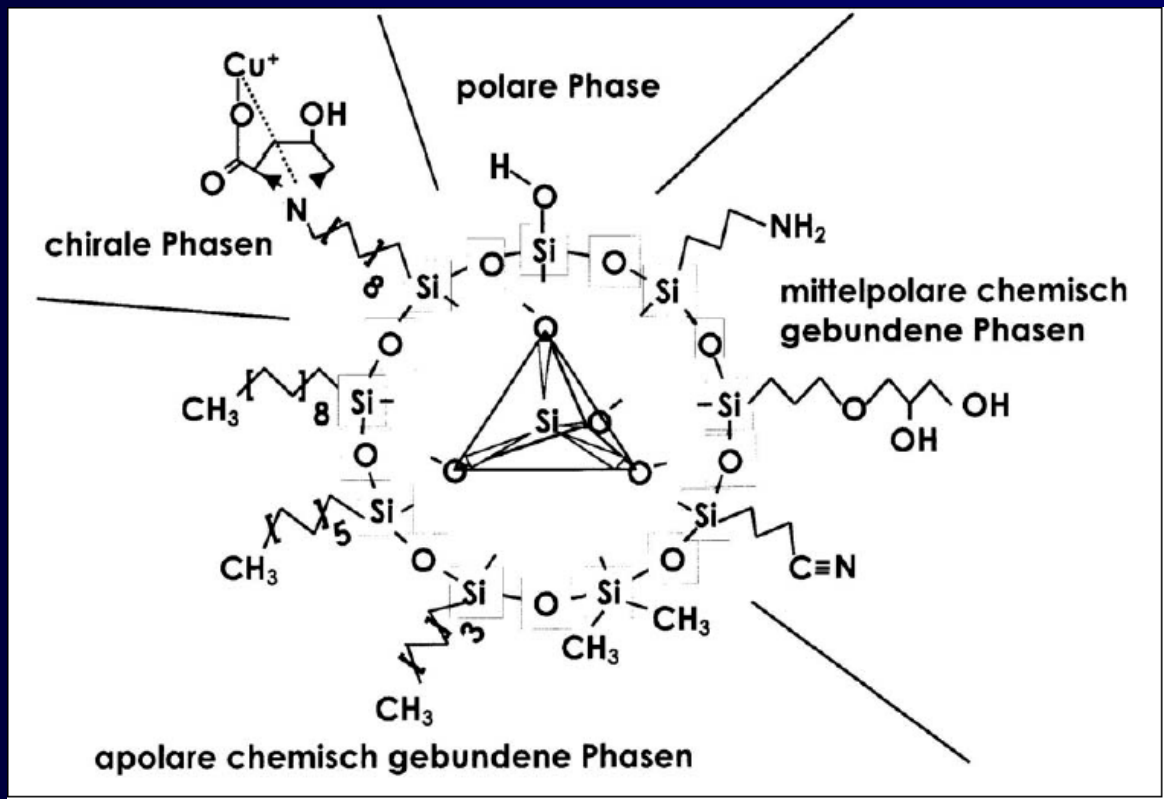
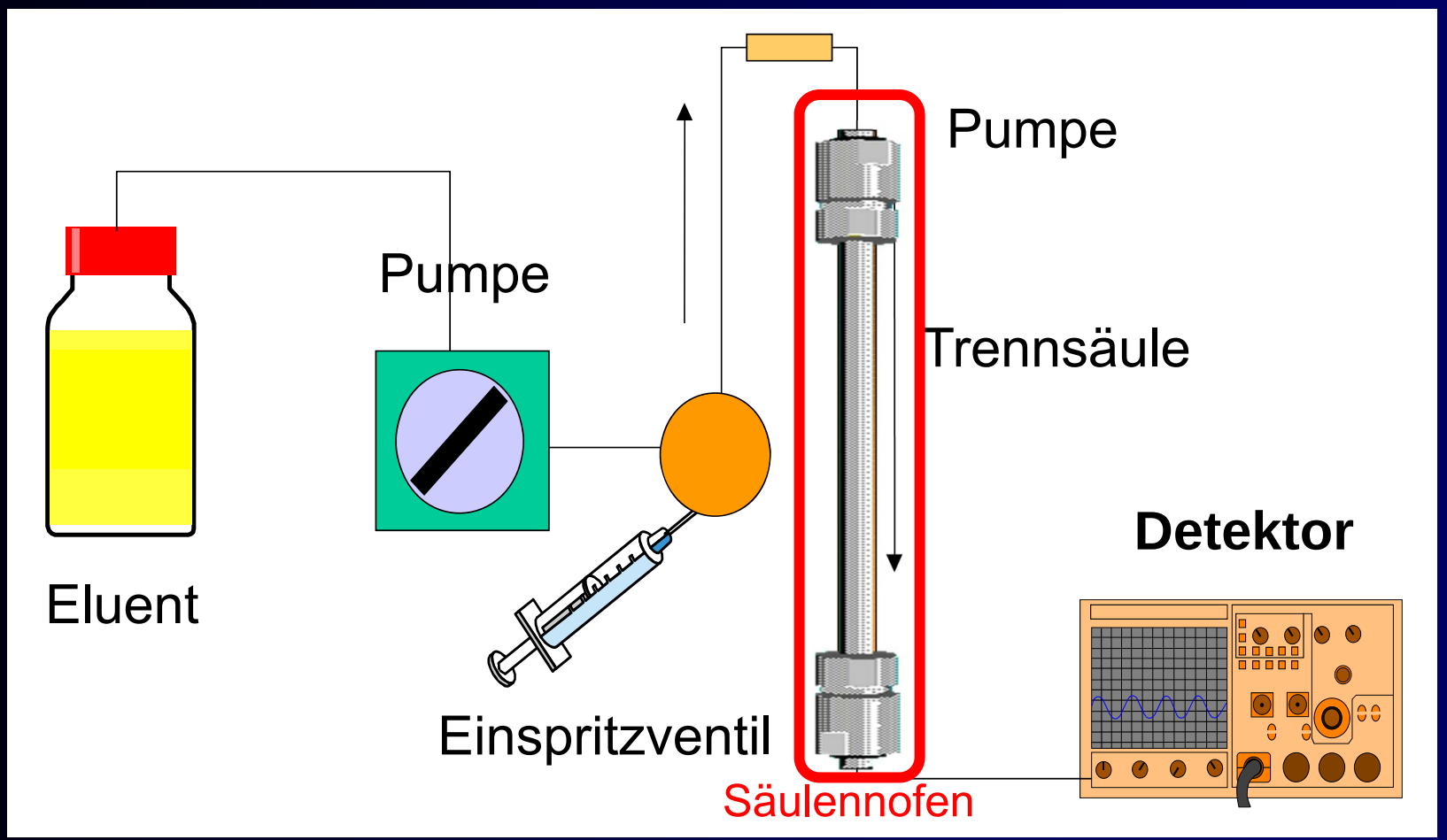


Abb. 6: Schematische Übersicht über oberflächenmodifizierte Kieselgele [nach Morlock 97]

HPLC (HighPerformanceLiquidChromatography)



HPLC-Säule

- Spezifikationen

Art.-Nr. xxxx **HPLC-Säule 250x3 mm**
Multospher 120 RP-18 HP-5
Ch. 70801
Säulen-Nr. 0103-01 **Flow** --------→
Muster-Chromatographie
Tel., Fax, mail

Säulendimension (Länge x ID)

Korngröße in µm

Modifizierung des Kieselgels

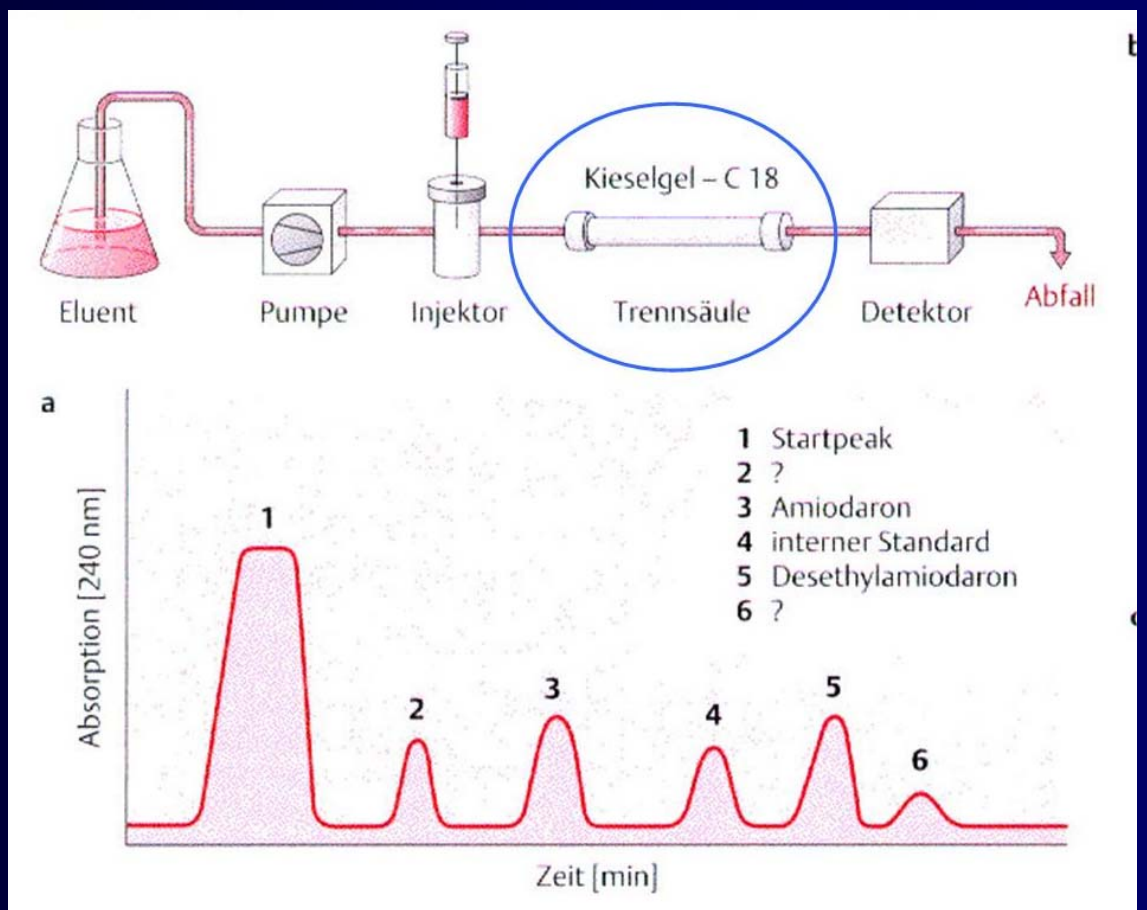
Porengröße (Angström)

Herstellername des Kieselgels

Flussrichtung

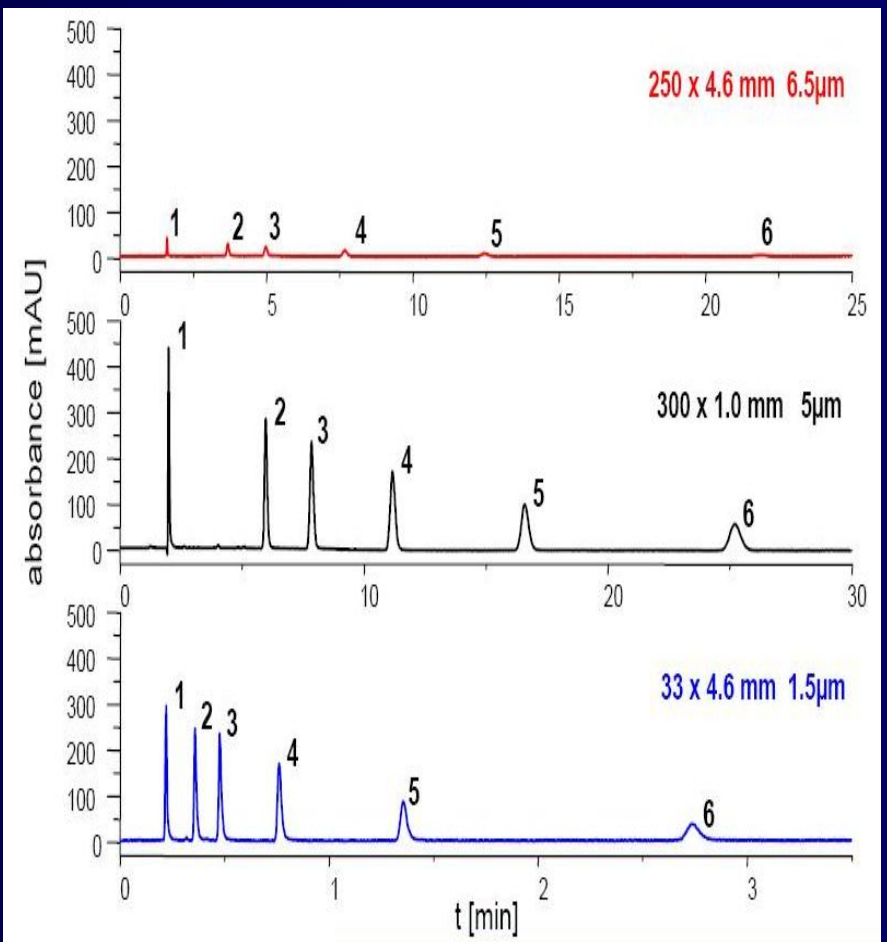
RP-HPLC: Medikamentenanalyse

- Detektion + Quantifizierung
  - Photometrie („UV-/vis Detektor“)
  - auch andere Detektoren
- Peak
  - Retentionszeit substanzspezifisch
  - Höhe, Fläche proportional zur Konzentration
  - Kalibration
  - Quantifizierung



Schnelle HPLC (FAST- HPLC)

- kurze Säulen
  - ca. 3 cm (statt 30 cm)
- sehr kleine Partikel
  - ca. 1,5 µm (statt 5 µm)
- Vorteile:
  - erheblich kürzere Analysendauer
  - weniger Lösungsmittel
- Nachteile:
  - schneller Detektor notw.
  - nicht alle Trennungen mögl.
  - höhere Drucke



HPLC: „Sensorische Verkostung“

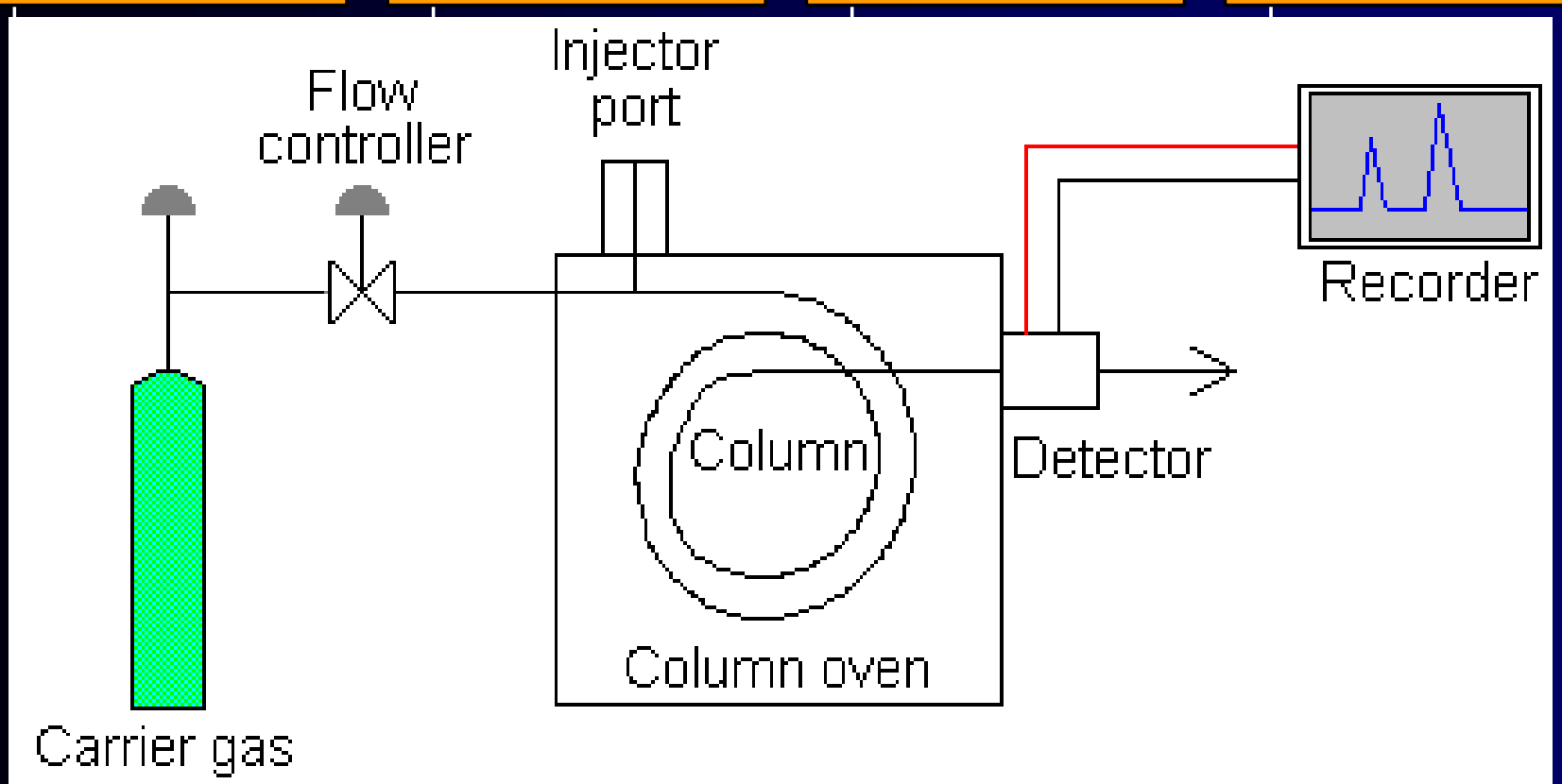
- menschl. Geschmack als Detektor
- Eluat wird „verkostet“
- Aroma-Analytik
- „LC-Taste®“ (Abb. Fa. Symrise)

Gaschromatographie: Vgl. HPLC

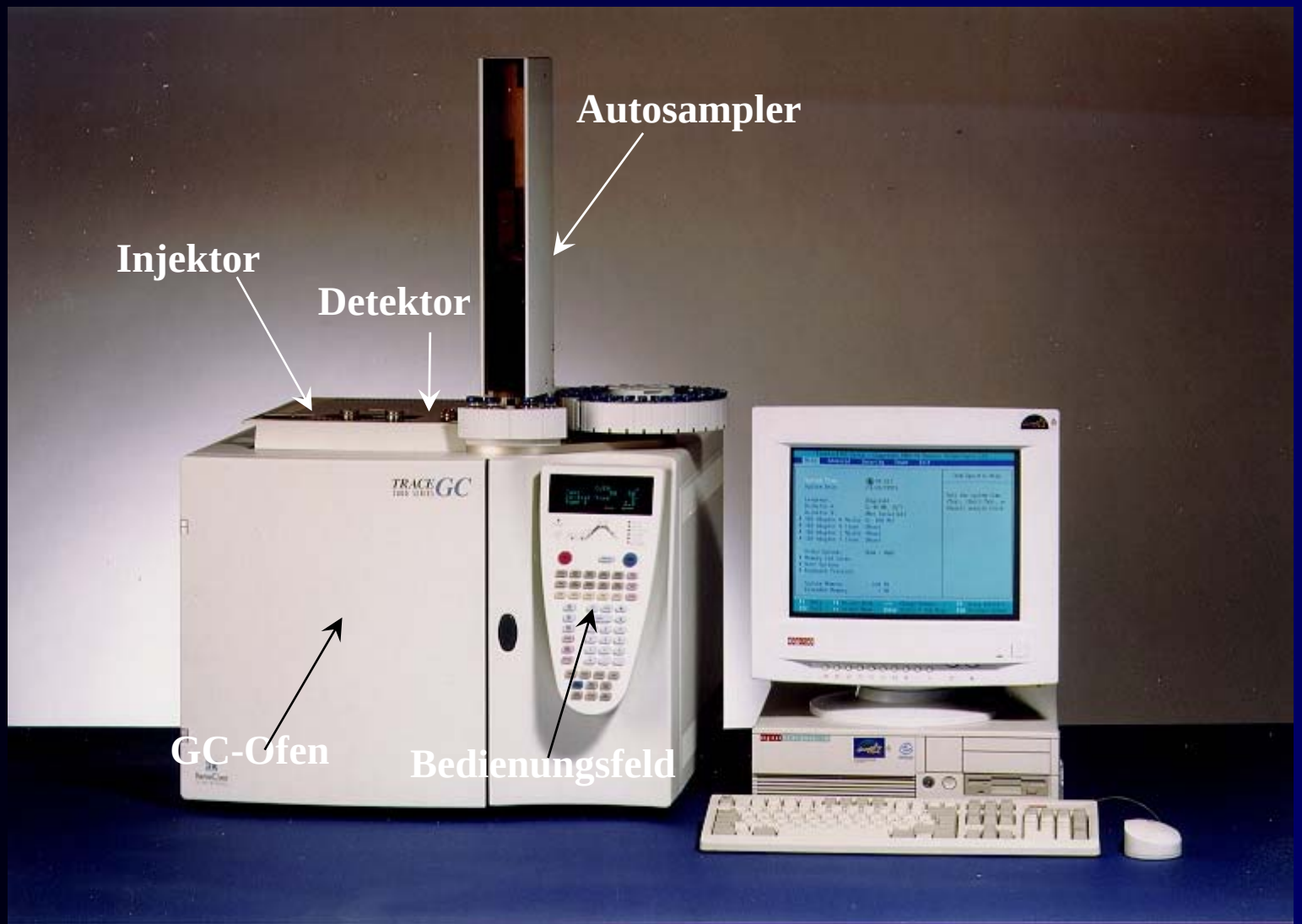
- HPLC: Mobile Phase flüssig (Laufmittel)
  - z.B. Methanol/Wasser, Acetonitril/Wasser
- GC: Mobile Phase gasförmig (Trägergas)
  - Stickstoff, Wasserstoff, Helium
  - Vorteile GC:
    - Trennleistung (v.a. kleine, unpolare Moleküle)
    - Empfindlichkeit
  - Nachteile GC:
    - Verbindungen müssen flüchtig oder leicht verdampfbar sein (ggf. Derivatisierung)
    - Apparativer Aufwand (Gasleitungen)

GC: Schematischer Aufbau

Reservoir für mobile Phase → **Probenaufgabe** → **Chromatogr. Trennsäule** → **Detektor Schreiber, EDV**

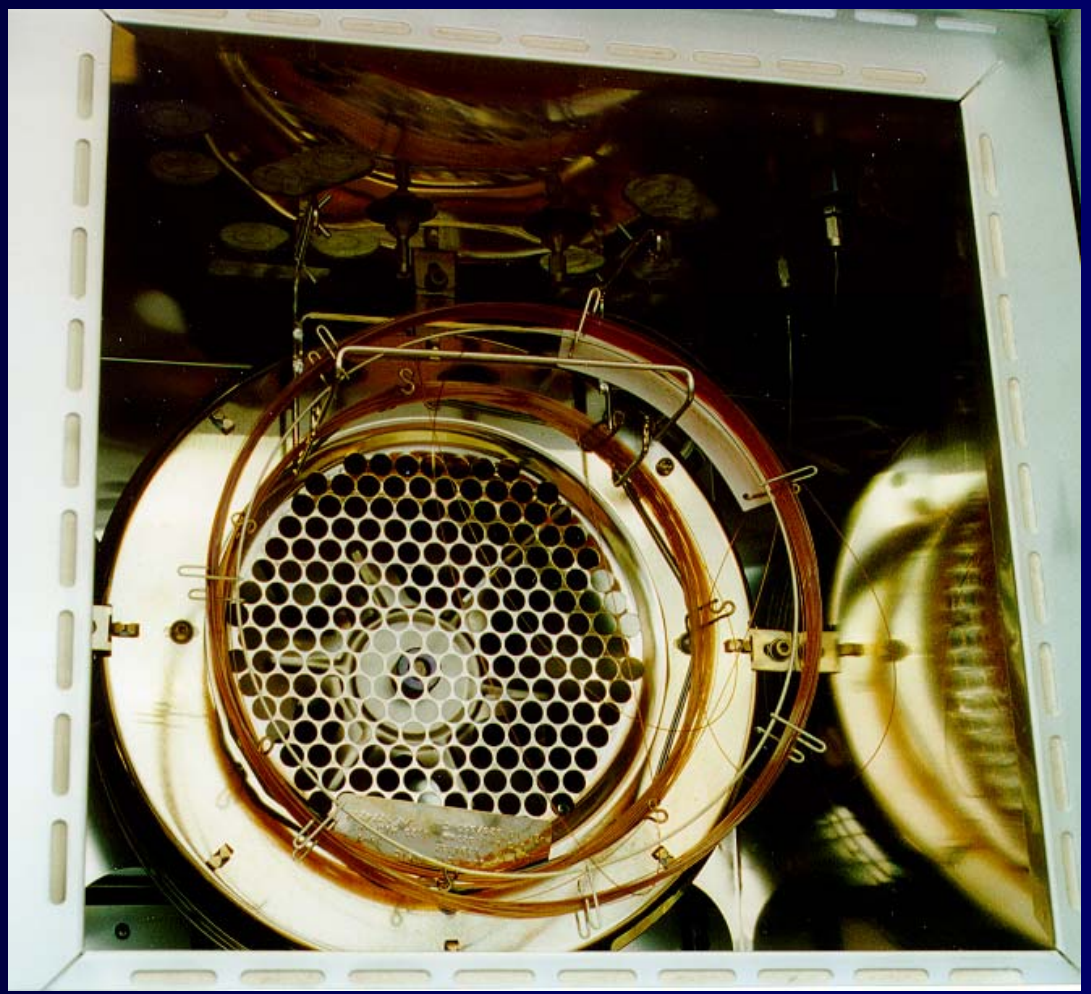


Gaschromatograph



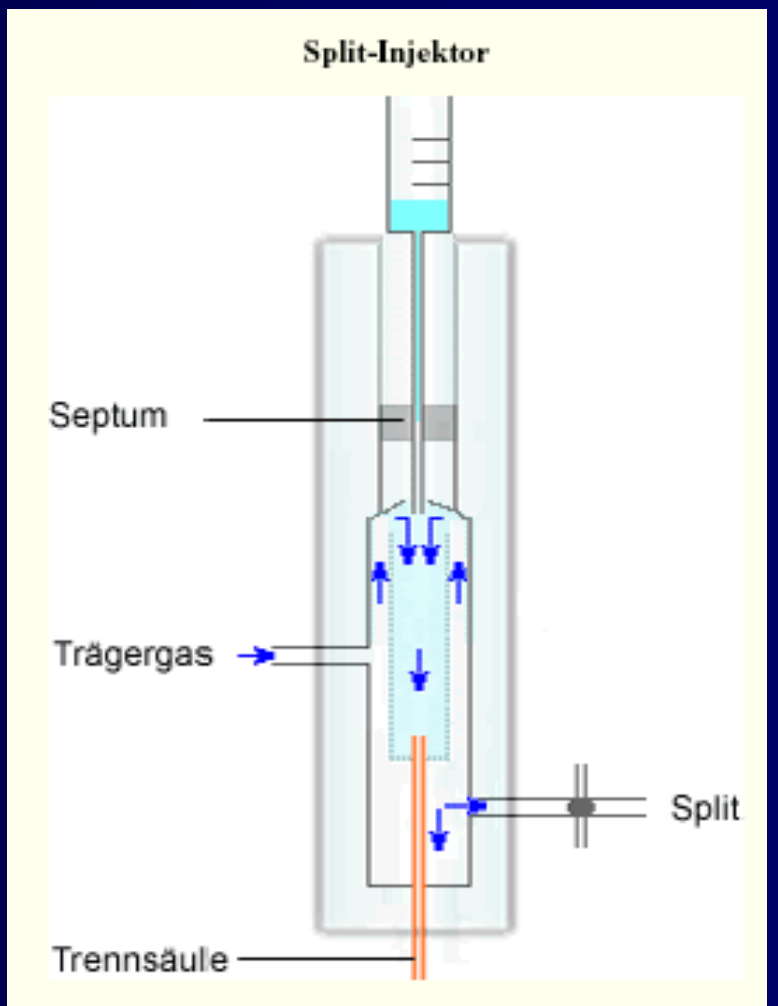
Quarzglas-Kapillaren im GC-Ofen

- GC-Säule aus Glas
- Polyimidbeschichtung (Flexibilität)
- 10-100 m Länge
- 0,1-0,5 mm Innendurchmesser
- 0,1-1,2 µm Beschichtung stationäre Phase
- dreidimesional vernetzt
- verschiedene Polaritäten



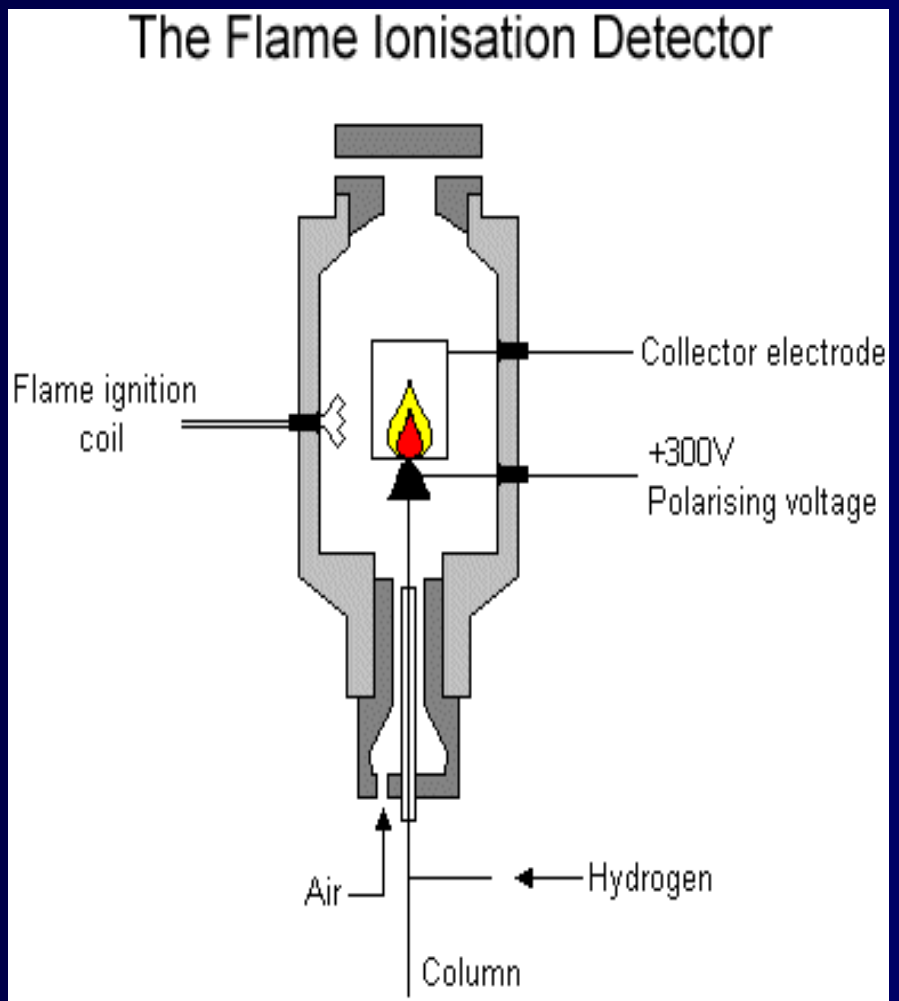
Split-/Splitless-Injektor

- Injektion mit Spritze durch Septum (etwa 1 µl)
- Heißes Rohr (Liner) Verbindung zur Trennsäule
- Probe verdampft
- Splitventil auf oder zu
- Trägergas nimmt Probe mit auf die Säule



Flammenionisationsdetektor (FID)

- GC-Detektor universell für org.Verbindungen
- Pyrolyse in der Luft/ Wasserstoff-Flamme
- → Ionen + Elektronen
- Spannung zwischen Brennerende und Sammelelektrode:
- → Strom
- → analoges Signal
- → digitales Signal (PC)

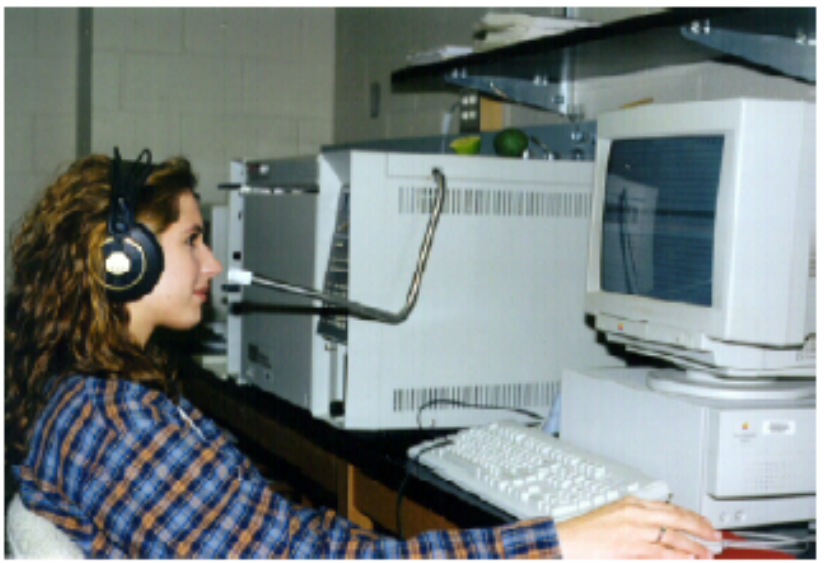


GC: Olfaktometrische Detektion („Sniffer“)

Olfaktometrische Detektion

⇒ Nutzung der menschlichen Nase als Detektor

Nachteile: für die meisten Substanzen sehr unempfindlich, nicht quantitativ, schlecht reproduzierbar
Vorteil: selektiv für geruchsintensive Verbindungen



⇒ Einsatzgebiete: Parfüm- und Nahrungsmittelindustrie

Quelle: http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/pdf/script/script2.pdf

GC-Anwendung: Toxikologie
Blutalkohol, Methanol-Vergiftung

27. Januar 2011 - 18:25h | Aktualisiert: 28. Januar 2011 - 04:27h

Haiti: 15 Personen an Methanolvergiftung gestorben

PANSCHER-PROZESS 26.01.2010

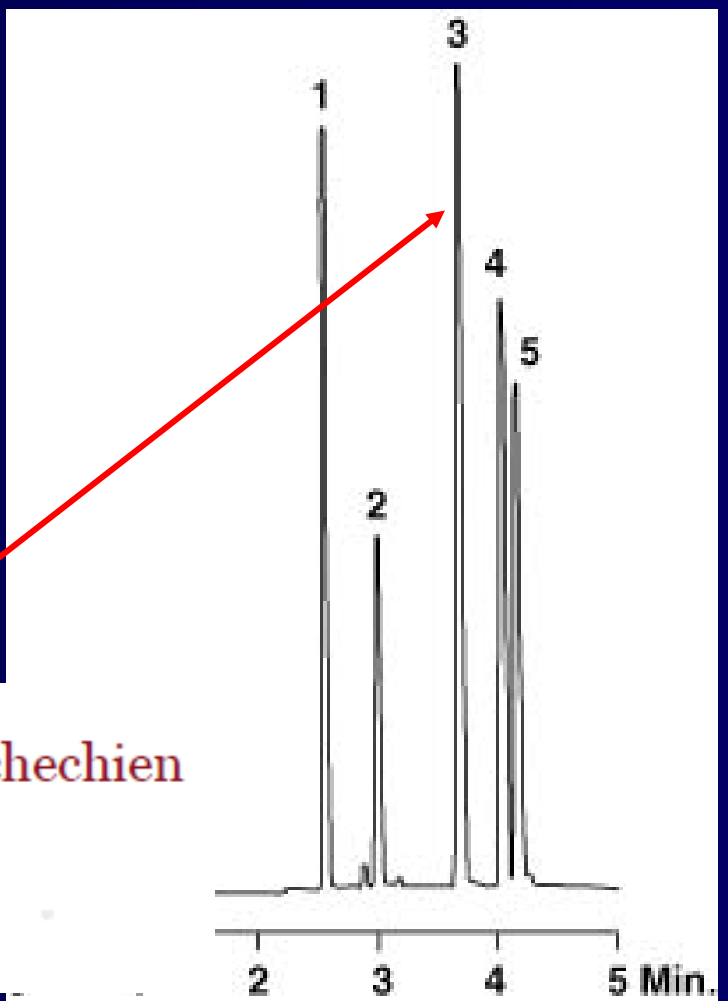
Tödlicher Schnaps im Urlaubshotel

... auch den Schnaps für ihre private Party gekauft. Nach der Feier starb ein 21-Jähriger an einer **Methanolvergiftung**. Seine 17 und 19 Jahre alten Klassenkameraden wurden nach Deutschland gebracht und starben nach tagelangem Koma in der Lübecker mehr...

18.09.12 **Gesundheitsgefährung**

Bundesamt warnt vor Pansch-Alkohol aus Tschechien

In Tschechien sind bereits 20 Menschen an gepanschtem Alkohol gestorben, jetzt warnt das Bundesamt für Verbraucherschutz vor Spirituosen ohne Herkunftsnachweis: Sie können giftiges Methanol enthalten.



Methanol-Vergiftung, Behandlung

Ethanol =ADH=> Acetdehyd =langsam=> Essigsäure (==>Citratzyclus CO_2, H_2O)

Methanol =ADH=> Formaldehyd =schnell=> Ameisensäure (metabolische Acidose)

Isopropanol =ADH=> Aceton

Therapie:

- Ethanol oder anderer ADH-Inhibitor (z.B. 4-Methylpyrazol; kompetitve Hemmung von ADH)
- Hämodialyse (Gifte eliminieren)
- Folsäure (Abbau Ameisensäure)
- Na-Hydrogencarbonat (Azidose)

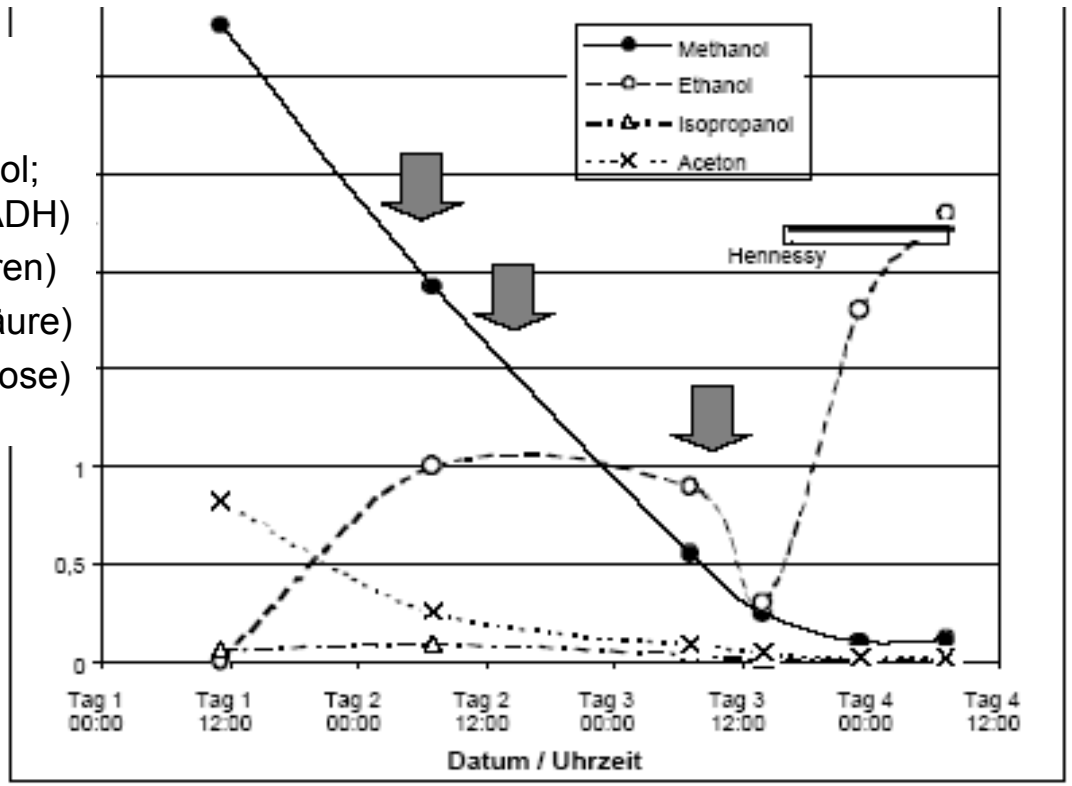
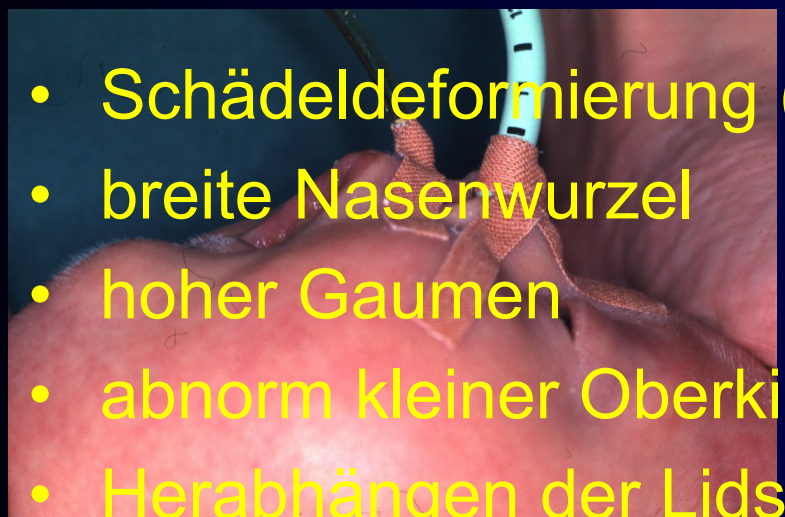


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentrationen von Methanol, Ethanol, Isopropanol und Aceton

Hämodialyse Ethanolzufuhr durch orale Gabe von Cognac (Hennessy)

Smith-Lemli-Opitz Syndrom (SLO-S)
Häufige Missbildungen

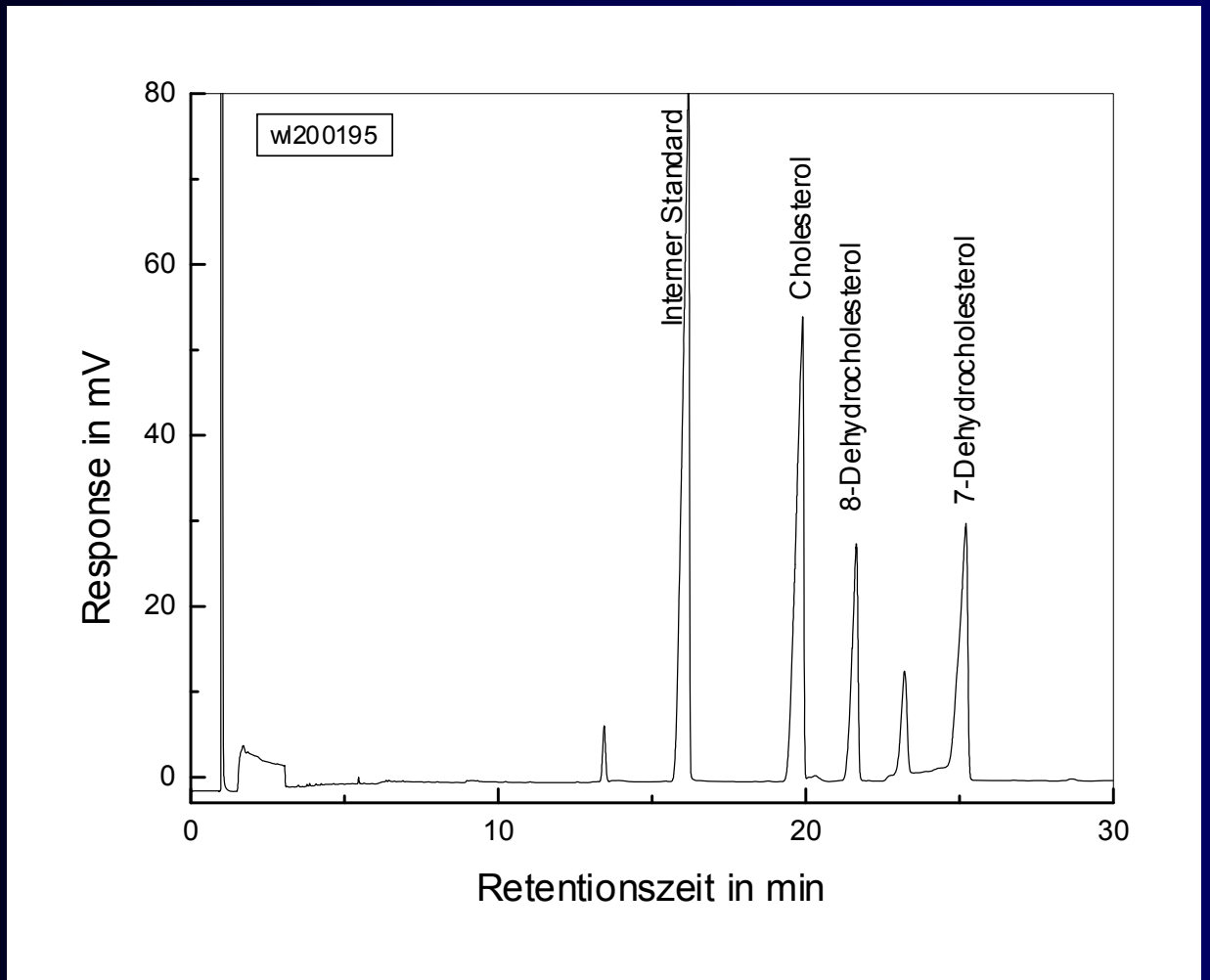


- Schädeldeformierung (Mikrozephalie)
- breite Nasenwurzel
- hoher Gaumen
- abnorm kleiner Oberkiefer (Mikrognathie)
- Herabhängen der Lidspalten (Ptosis)
- Verwachsungen an Fingern + Zehen (Syndaktylie)
- Minderwuchs
- geistige Retardierung
- Muskelschwäche
- Entwicklungsanomalie der Genitalien

GC-Anwendung: Stoffwechseldiagnostik Smith-Lemli-Opitz Syndrom

- SLO-Syndrom
  - vererbbarer Defekt in der Cholesterolbiosynthese
  - schwere Missbildungen
  - Cholesterin stark erniedrigt
  - 7-Dehydrocholesterin (7-DHC) und 8-DHC stark erhöht (Marker)
- Analytik
  - Routine Cholesterin-Analytik ungeeignet
  - GC zur Quant. von Cholesterin, 7-DHC, 8-DHC
  - 24 Fälle seit 1995 hier entdeckt, davon 2 pränatal

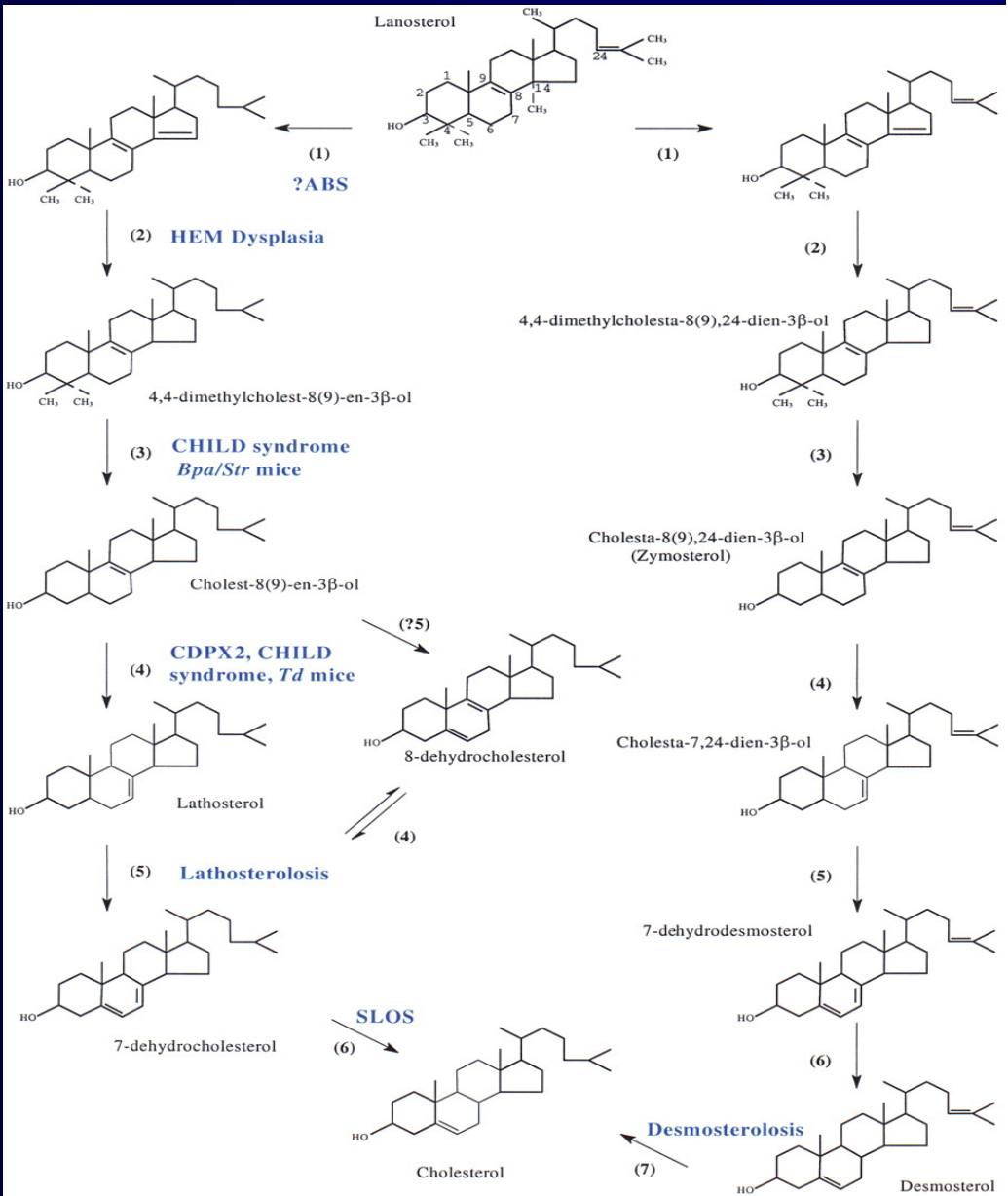
SLO: GC-Chromatogramm



GC-Chromatogramm der Plasma-Neutralsterolfraktion eines SLO-Patienten.

Cholesterinvorläufer & Defekte

- Endogenes Cholesterol Biosynthese (Leber)
- Precurser
  - Lanosterol, Cholestenol, Lathosterol, 7-DHC, 8-DHC
  - Desmosterol
- Enzymdefekte
  - hereditär
  - schwere Erkrankungen
- → Marker für die Cholesterolsynthese



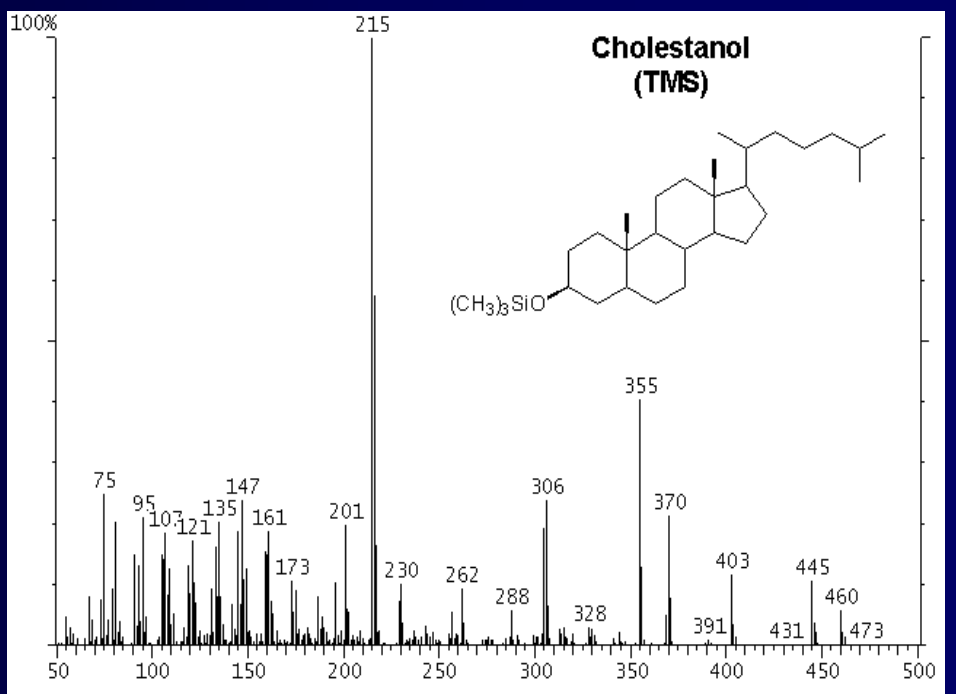
Gliederung

1. Chromatographie, Geschichte, Prinzip
2. DC (Dünnschichtchromatographie)
3. HPLC (Flüssigchromatographie)
4. GC (Gaschromatographie)
5. Massenspektrometrie und MS-Kopplungen
   a) GC/MS (Gaschromatographie/Massenspektrometrie)
   b) LC/MS (HPLC/Massenspektrometrie)
   c) MS/MS (Tandem-Massenspekrometrie)
   d) MALDI-MS („Weiche Ionisierung“, Proteomics)

GC/MS-Kopplung

- GC
  - Chromatographische Gemisch-Trennung
- MS
  - Detektor
  - Ionisation durch Elektronenstoß (EI)
  - Massenspezifische Trennung
  - Massenspektrum substanzspezifisch

Quelle der Animation: Trace GC. Thermo-Finnigan, 2002

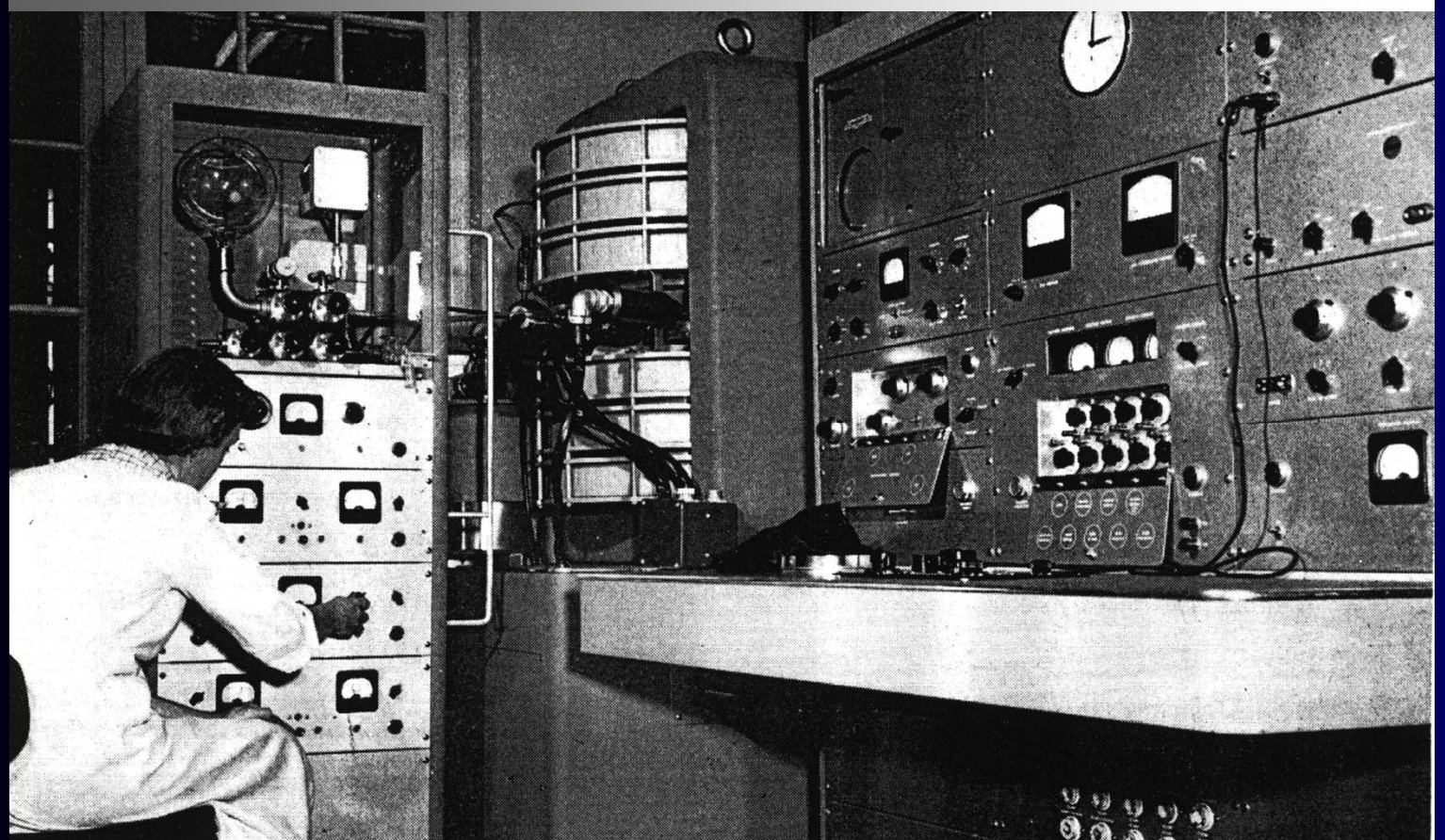


Warum GC (oder HPLC) + MS?

- alle GC-Methoden (FID) auch GC/MS tauglich
  - vielfältige Anwendungsbereiche
  - Medizin, Lebensmittel, Umwelt, Industrie, Gericht
- höhere Empfindlichkeit
  - mind. Faktor 100 im Vergleich zu GC (FID)
    - NWG Dioxin: 1967 GC-FID 500 pg; 1992 GC/HRMS 0,005 pg
    - z.B. Drogennachweis in Haaren („Drogenkarriere“ über Jahre)
- qualitativ besseres Messergebnis
  - mehr Informationen (Massenspektrum)
  - höhere Sicherheit bei der Substanzidentifizierung (z.B. Doping-Kontrolle)
  - Analyse unbekannter Verbindungen (Spektren-Bibliotheken)

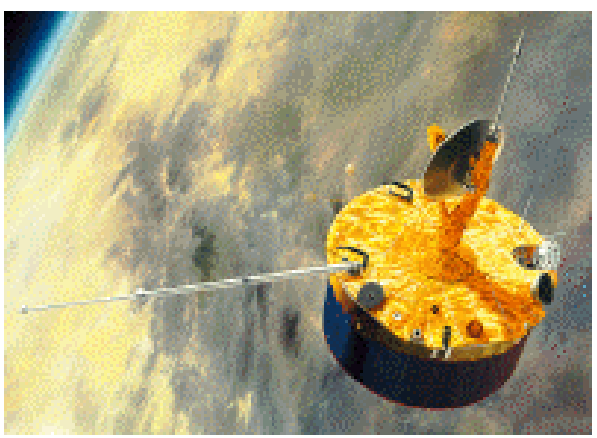
GC/MS 50er Jahre

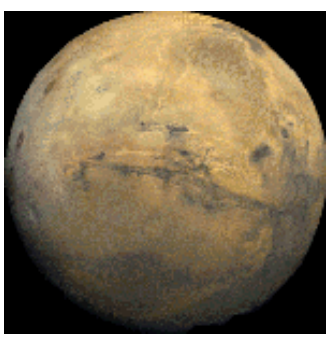
Die 5Oer Jahre - Kommerzialisierung



CEC Model 21-103 Sector Field Mass Spectrometer (1950)

MINIATURISIERTE MASSENSPEKTROMETER AN BORD VON SATELLITEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ÄUSSEREN ERDATMOSPHÄRE (SEIT 1961))





GC/MS heute

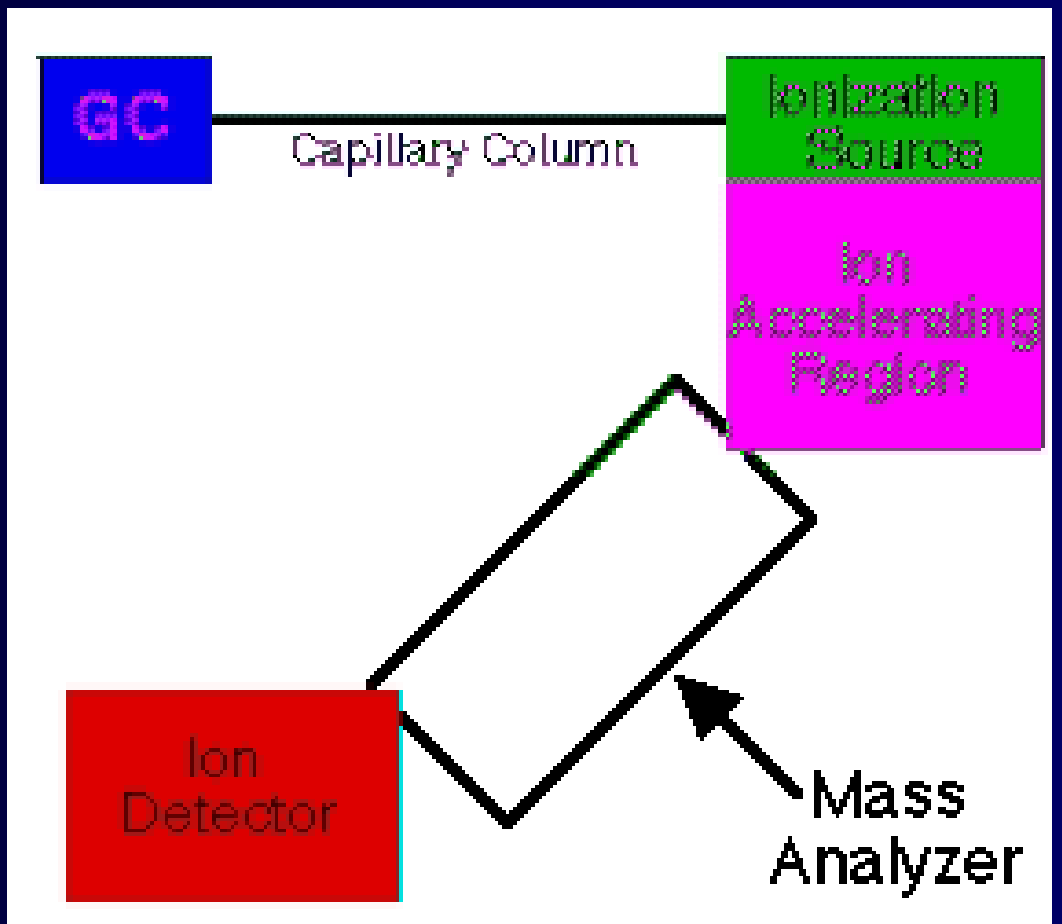
GCMS-System „QP2010Ultra“; Abb.: Fa. Shimadzu, 2010

Grundprizip der MS

- geladene Teilchen (Ionen) können unter Vakuum in einem Magnetfeld von ihrer Flugbahn abgelenkt werden
- Abhängig von
  - Masse (m)
  - Ladung (z)
  - Geschwindigkeit
  - Magnetfeldstärke
- → **massenabhängige Selektion von Ionen m/z**

GC/MS: schematischer Geräteaufbau

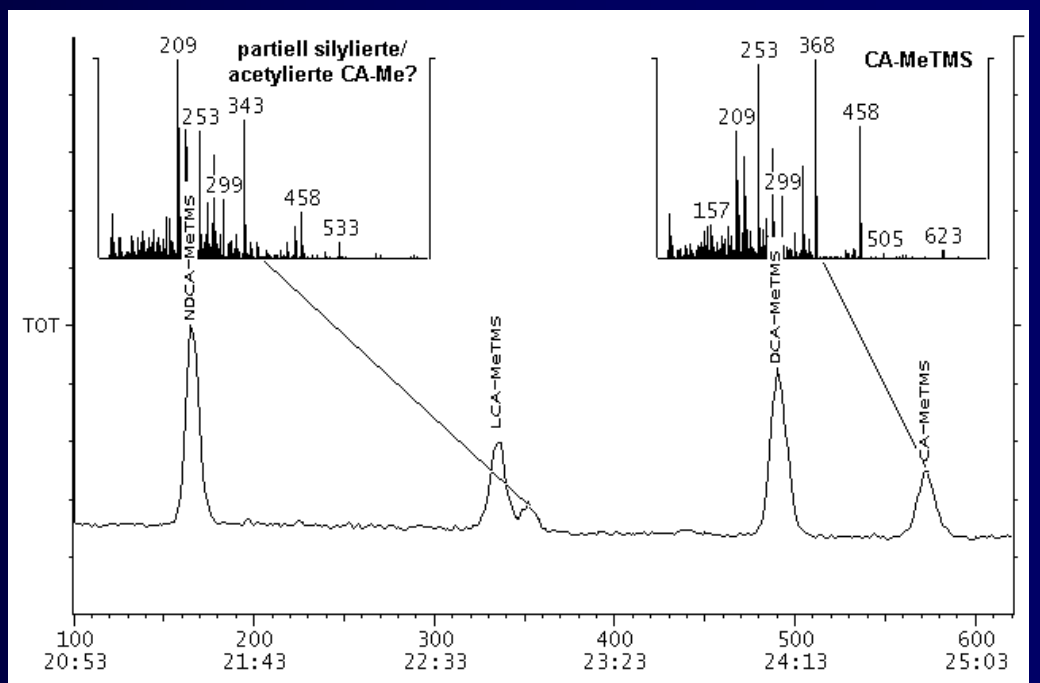
- Verbindung zum GC:
  Interface, Transfer Line
- Ionenerzeugung:
  Quelle, Ionisierungskammer
- massenspezifische Trennung der Ionen:
  MS-Analysator, Magnetfeld
- Detektion der Ionen:
  Detektor, Multiplier
- Datenaufnahme und Auswertung:
  PC, EDV



Quelle der Animation: T.G. Chasteen 1996 (www.shsu.edu)

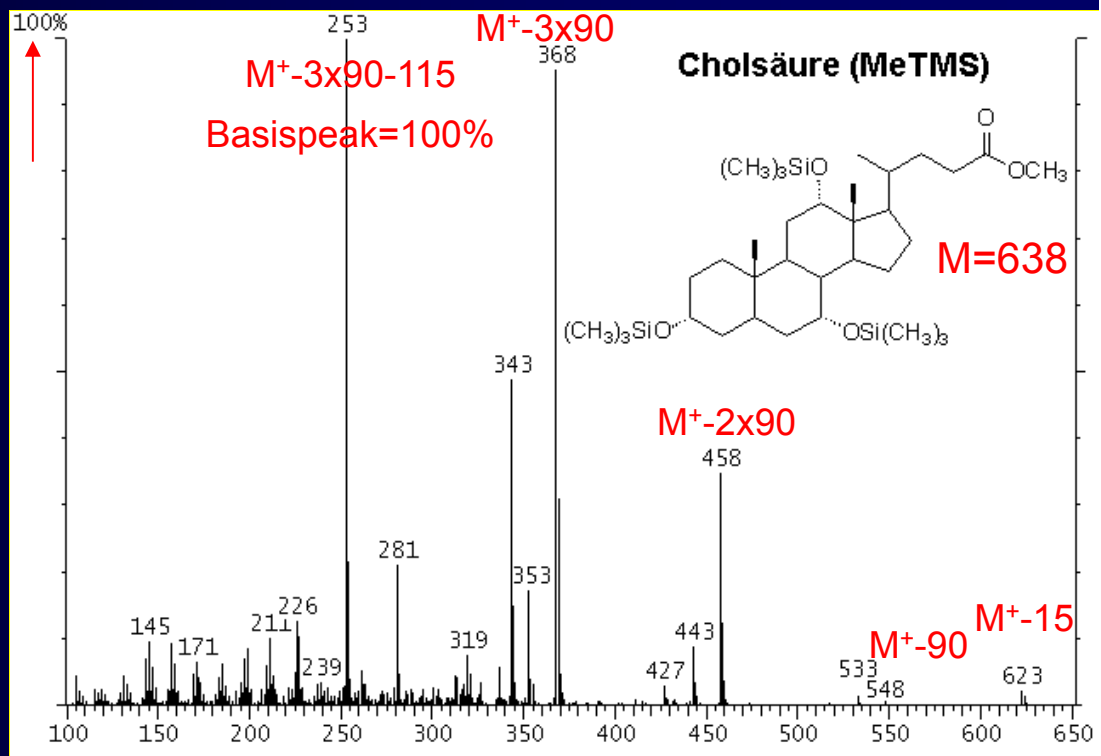
Auswertung: „Chromatogramm“

- Totalionenstrom
  - Entspricht GC-Chromatogramm
- „Summe aller Massenspektren“



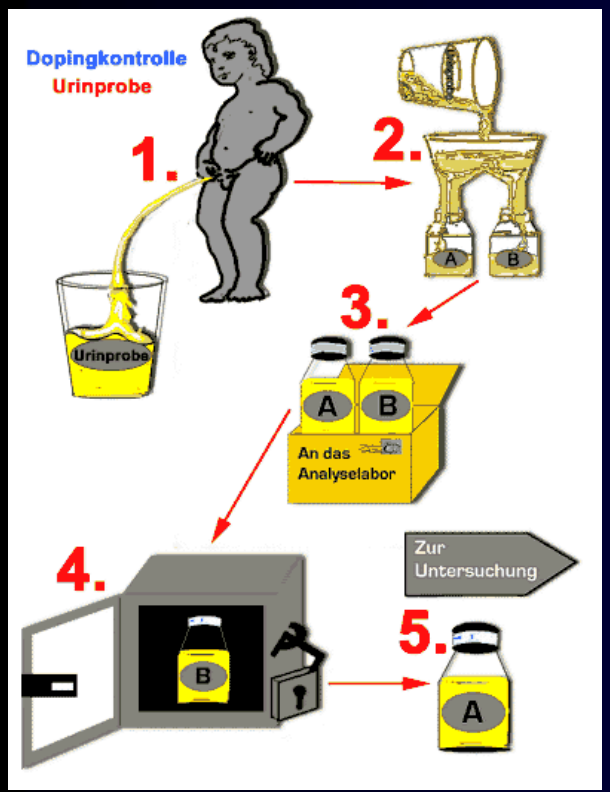
Auswertung: Massenspektren

- Massenspektrum
- M^+ → Fragmentierung (EI-Ionisierung 70 eV)
- substanzspezifisch; „Fingerabdruck“
- bekannte Substanzen: eindeutige Identifizierung
- unbek. Substanzen:
  - Strukturmerkmale
  - Referenzspektren
  - Spektrenbibliotheken
    - PMW > 6000 Pharmatka, Drogen, Gifte
    - NIST > 190000 Substanzen



GC/MS: Dopingkontrolle

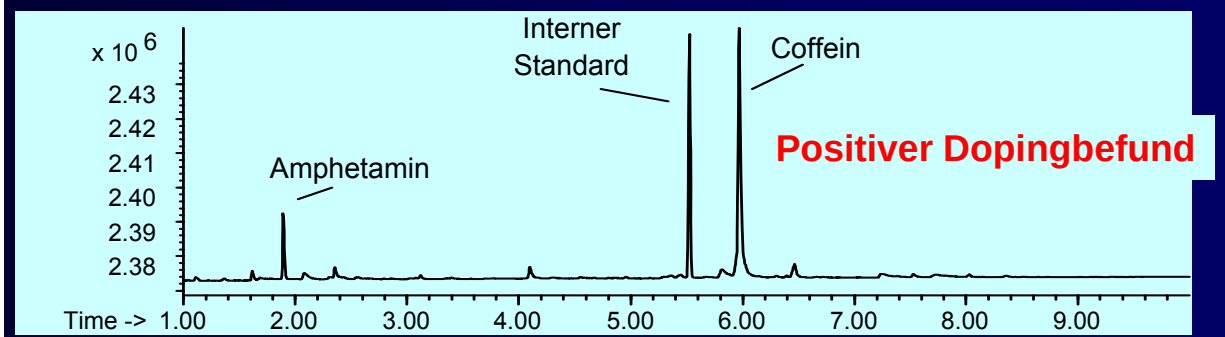
Urin **Isolierung** **GC/MS-Analyse**



Labor

Analyse

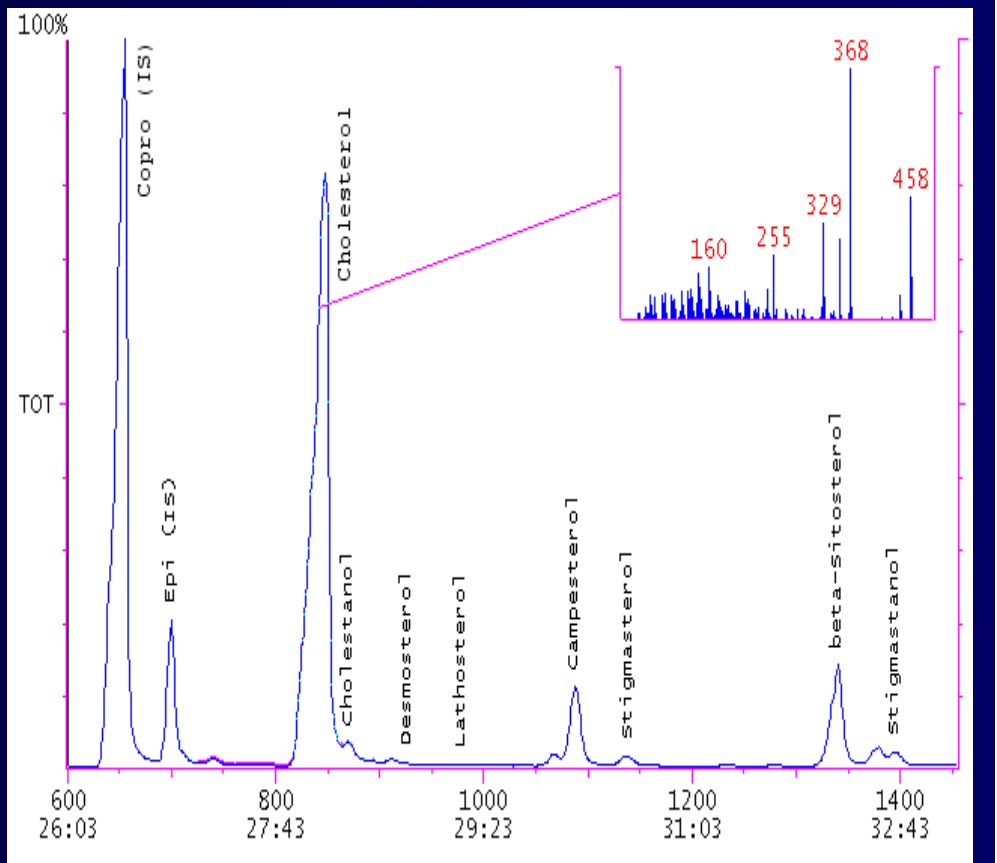
GC/MS-Gerät



Quelle: „Doping im Sport“; W. Schänzer; Institut für Biochemie, DSHS Köln, 2000

Sitosterolämie (Phytosterolämie)

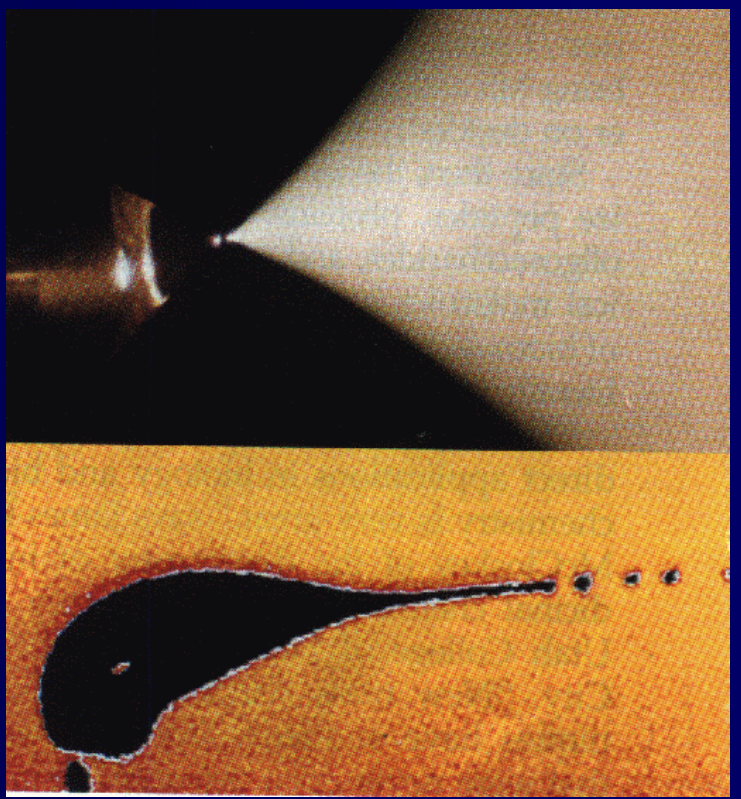
- Klinik:
  - Xanthome, Xanthelasmen
  - Gelenkschmerzen, Arthritis
  - frühe Arteriosklerose + KHK
- Serum:
  - Cholesterin norm bis leicht ↑
  - Phytosterine↑↑ (pflanzl.Kost) bes. Sitosterin, Capesterin
  - CAVE! Cholesterinsenkende Margarine u.ä. Produkte (falsch positives Ergebnis)
- Nachweis:
  - GC, GC/MS
  - Gen-Sequenzierung
- genetischer Defekt:
  - autosomal rezessiv
  - Mutation ABC G5, ABC G8



Quelle : www.meded.ucsd.edu

LC/MS

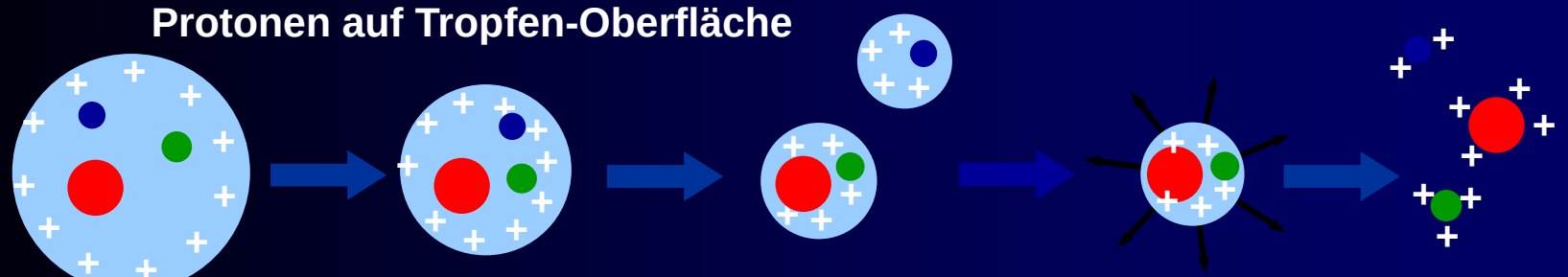
- HPLC (LC)
  - Chromatographische Trennung
- MS
  - Problem: Lösungsmittel
  - Ionisation: Elektrospray (ESI)
  - Massenspezifische Trennung
  - „Sanfte Ionisierung“
    - Analyse großer Moleküle und Proteine



Quelle: “MASSENSPEKTROMETRIE gestern - heute – morgen”; Dr. Stefan Schürch, Universität Bern, 2004

LCMS:Elektrospray-Ionisierung (ESI)

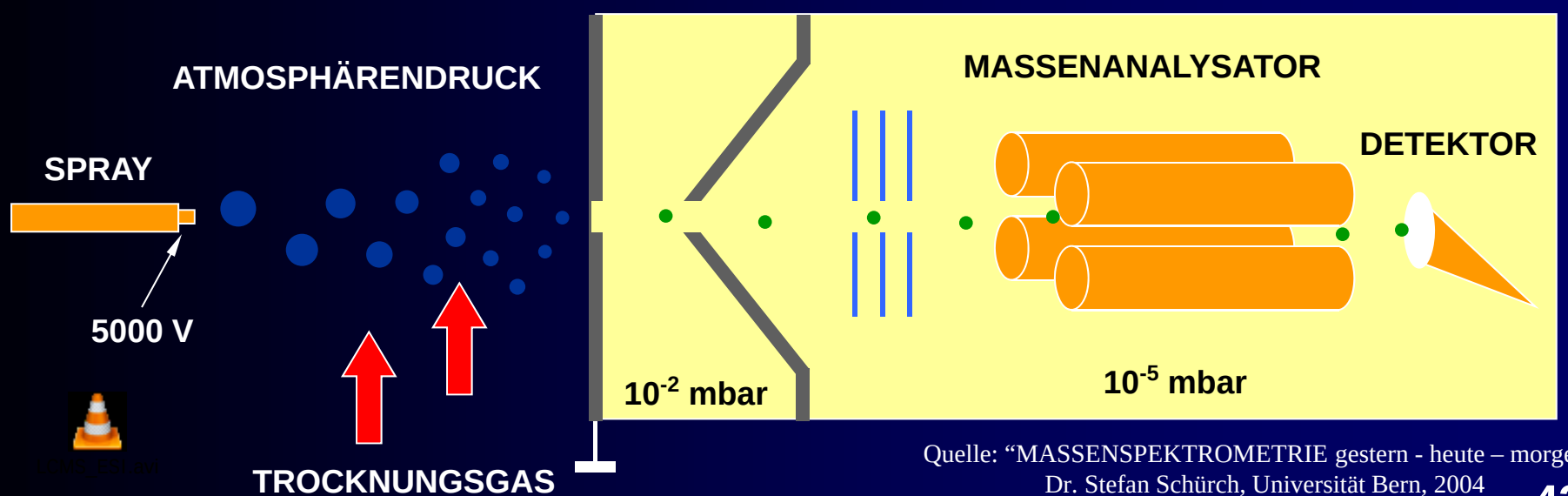
Protonen auf Tropfen-Oberfläche



Verdampfen des Lösungsmittels

Rayleigh-Grenze ⇨ Coulomb-Explosion

Desorption mehrfach geladener Ionen durch selbst erzeugtes elektrisches Feld



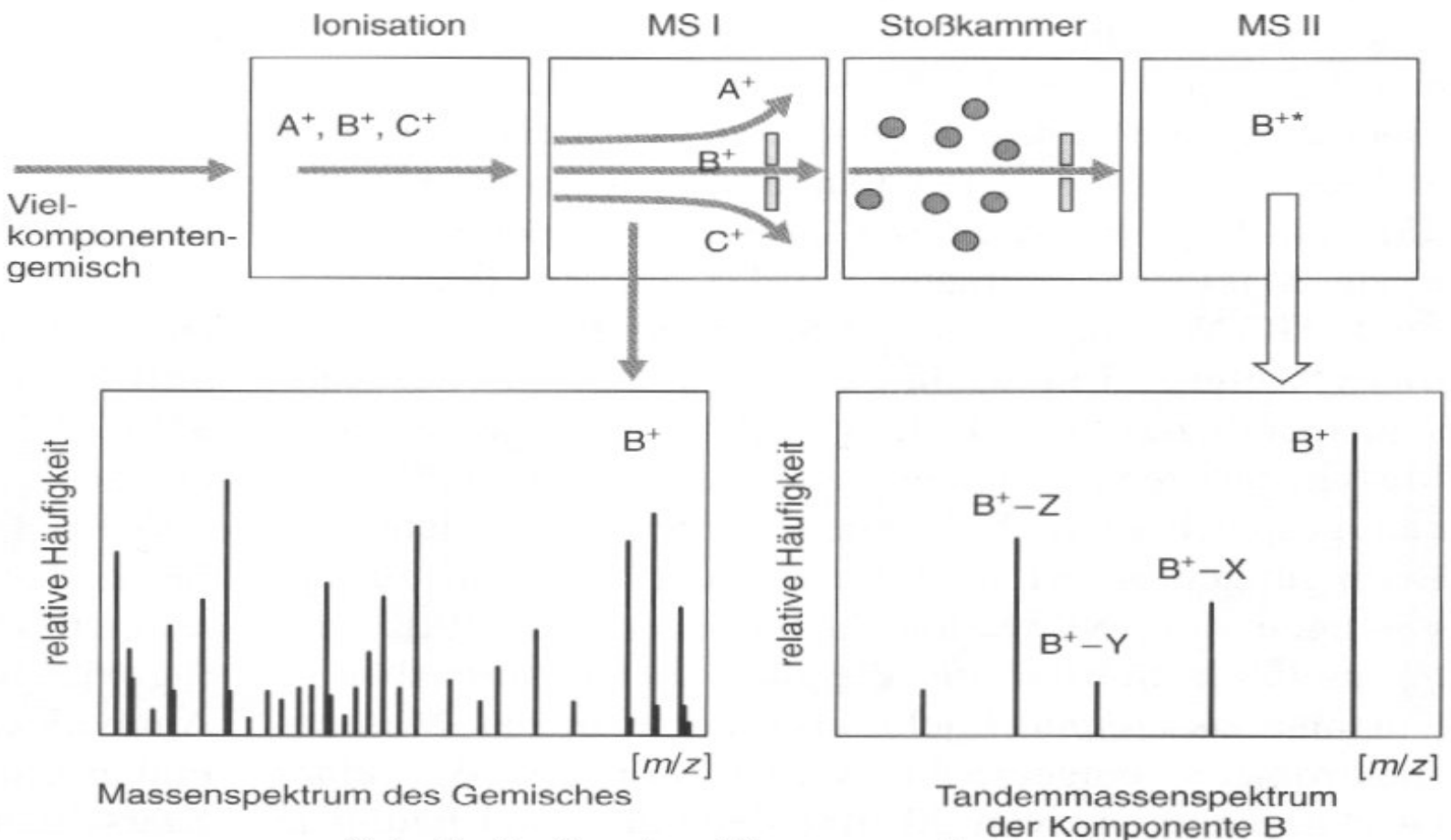
LCMS_ESI.avi

Quelle: “MASSENSPEKTROMETRIE gestern - heute – morgen”; Dr. Stefan Schürch, Universität Bern, 2004

Tandem-Massenspektrometrie

- Kopplung von Massenspektrometern (MS)
- „mehrdimensionale Massenspektrometrie“
- Tandem-Massenspektrometrie = MS/MS
- MS1: massenspezifisches „Clean up“
  - Substanzgemisch
  - Matrix (Blut, Serum, Urin)
- MS2: Detektion der Analyten

MS/MS: Prinzip



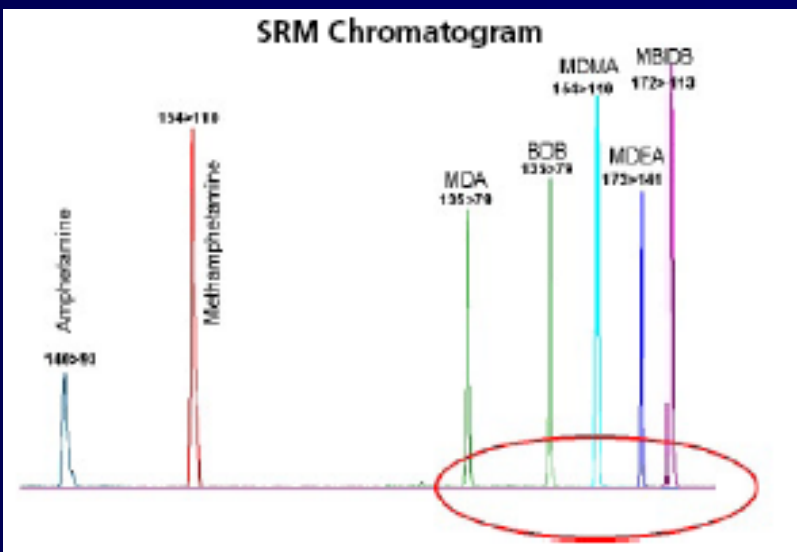
Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie
(aus Inst. Analytische Chemie, K. Cammann, Spektrum 2001

GCMS/MS: Drogen in Haaren

- Nachweis von Drogen in Haaren
  - GC/MS (SIM)
  - Signal: Analyt (Konzentration)
  - S/N durch „clean up“ besser
- höhere Empfindlichkeit
- qualitativ besseres Messergebnis
  - Informationsgehalt 1000x höher im Vergleich zu GC/MS
  - höhere Sicherheit bei der Substanzidentifizierung (z.B. Doping-Kontrolle)
  - Analyse unbekannter Verbindungen (Spektren-Bibliotheken)

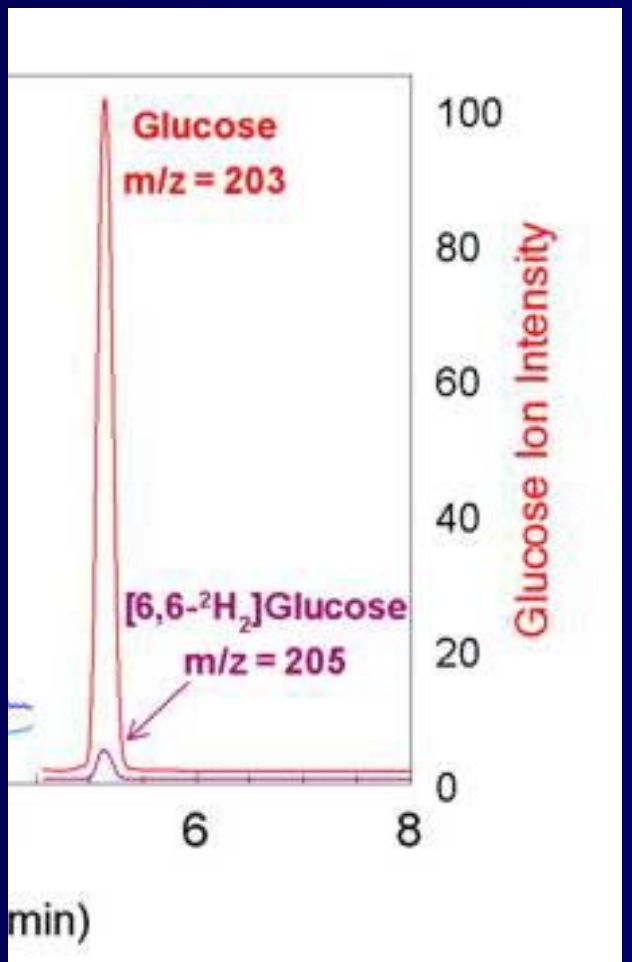
Detection Limits

Detection Limit (ng/mg)	SIM Competitor	MS/MS Varian 1200
Amphetamine	0.04	0.03
Methamphetamine	0.05	0.03
MDA	0.03	0.01
MDMA	0.13	0.03
MDEA	0.19	0.04
BDB	0.07	0.02
MBDB	0.18	0.03



Isotopen-Verdünnungs-Analyse (ID/MS)

- Zugabe eines isotopenmarkierten Standards (gleiches Verhalten wie Analyt)
- Extrem hohe Richtigkeit/Präzision
- Referenzmethode für Kreatinin, Cholesterin, Testosteron, Glucose, Harnsäure, Harnstoff, Medikamente.....



LCMS/MS: Immunsuppressiva

- Kontrolle nach Organtransplantationen
  - Enges therapeutisches Fenster
  - Zu niedrig: Organ-Abstoßung
  - Zu hoch: Nebenwirkungen (z.B. Nierenversagen)
- hohe Empfindlichkeit
- qualitativ bessere Messergebnisse im Vergleich zu Immunoassays
  - Bestimmung der „Muttersubstanz“
  - Metaboliten: keine Kreuzreaktivität

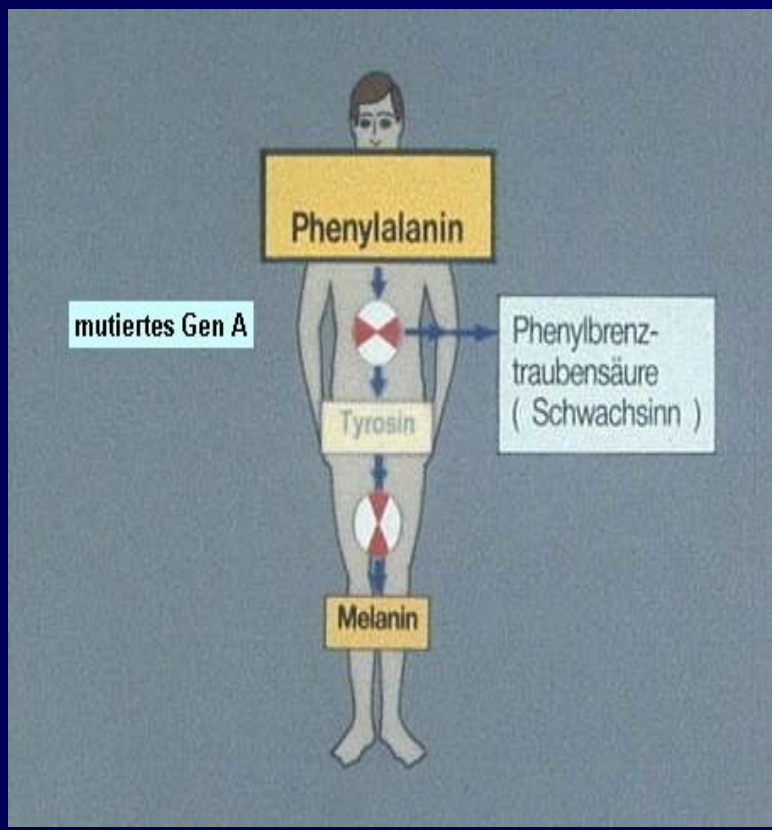
(Abb. LCMS/MS, Fa. Shimadzu)

Drug	Range (µg/l)	Lower limit of quantification(µg/l)
CsA	25-900	3,9
Everolimus	2-40	0,395
Tacrolimus	2-40	1,003
Sirolimus	2-50	0,997

Analyt	Summenformel	Exakte Masse (g/mol)	MRM
Cyclosporin A	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	1201,8	1219,9 → 1202,8
Cyclosporin A-d_4	$C_{62}H_{107}D_4N_{11}O_{12}$	1205,8	1223,9 → 1206,8
Everolimus	$C_{53}H_{83}NO_{14}$	957,6	975,6 → 908,5
Everolimus-d_4	$C_{53}H_{79}D_4NO_{14}$	961,6	979,6 → 912,5
Sirolimus	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	913,6	931,6 → 864,5
Sirolimus-d_3	$C_{51}H_{76}NO_{13}D_3$	916,6	934,6 → 864,5
Tacrolimus	$C_{44}H_{69}NO_{12}$	803,5	821,5 → 768,6
Tacrolimus-$^{13}Cd_2$	$C_{43}{}^{13}CH_{67}D_2NO_{12}$	806,5	824,5 → 771,6

MS/MS: Neugeborenen-Screening

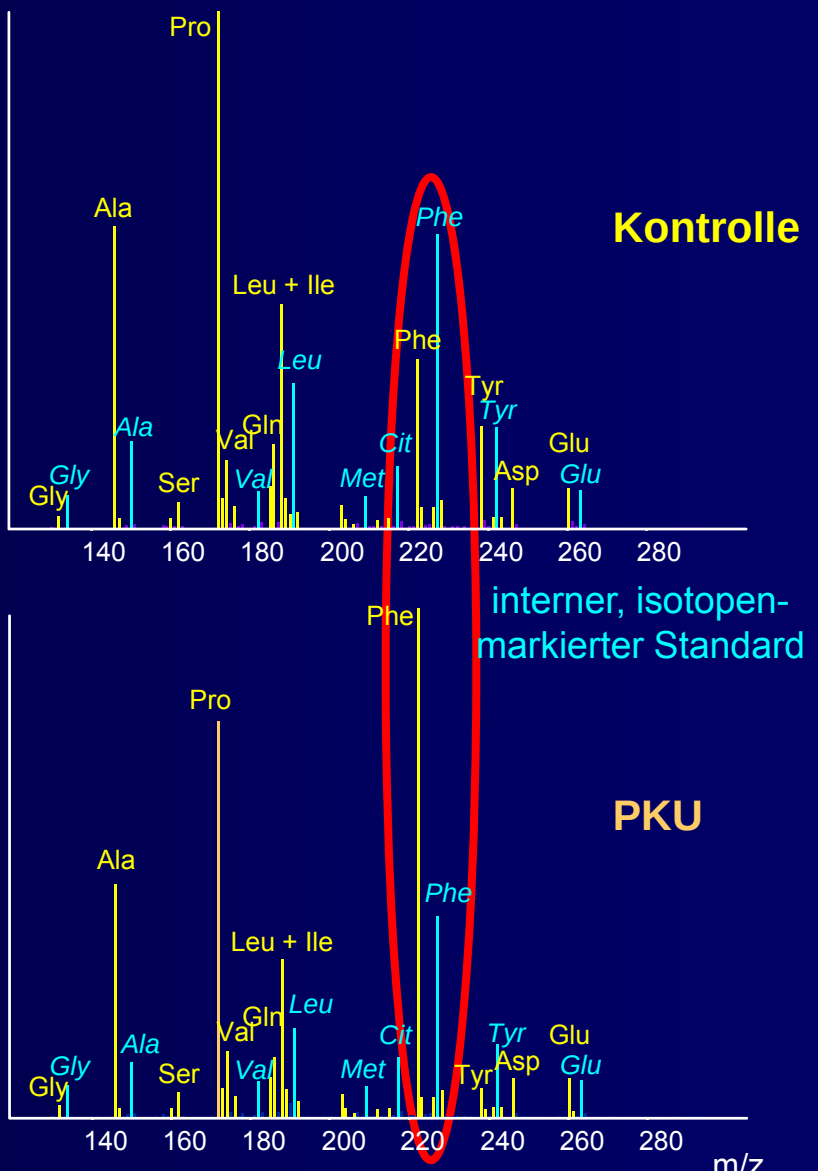
- Phenylketonurie (PKU)
- Ahornsirupkrankheit (Leu, Ile, Val)
- Homocystinurie
- Glutarsäure Acidämie
- Methylmalonsäure Acidämie
- Propionsäure Acidämie
- Tyrosinämie
- Nicht-ketotische Hyperglyzinämie
- Argininbernsteinsäure-Krankheit
- Hyperprolinämie
- Hypermethioninämie



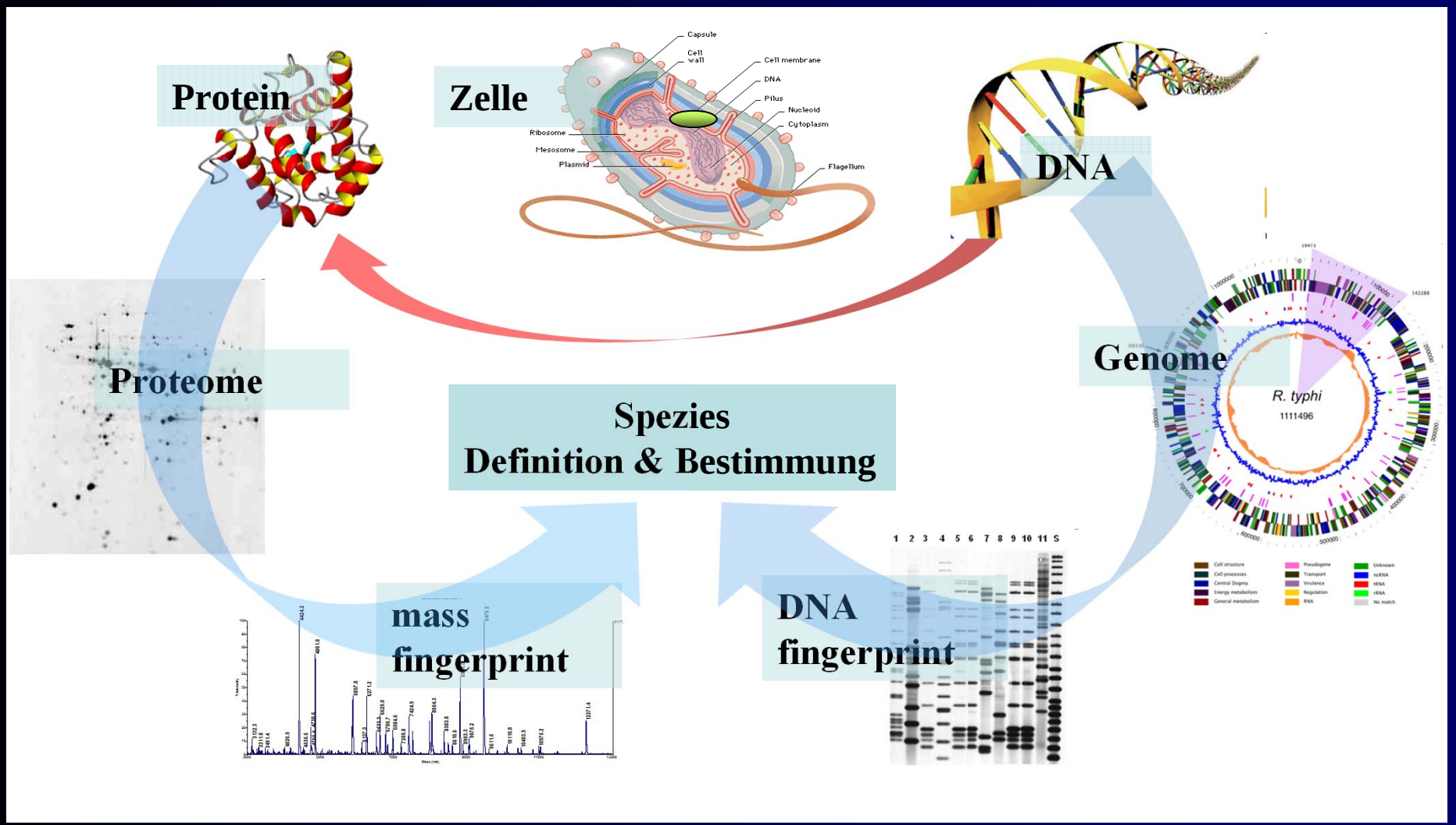
Neugeborenen-Screening: PKU

Präparation und MS/MS-Analyse

- **Blutspot auf Filterpapier** (3 mm ∅) Mikrotiterplatte
- Zugabe von Methanol plus **isotopen-markierter interner Standard**
- **Butylierung aller Aminisäuren (AS)**
- Injektion und Ionisierung der Probe keine Chromatographie !
- **MS/MS-Analyse der AS-Produkte** (Neutralverlust-Analyse)
- **Quantifizierung** der AS durch Standard



„Proteomics & Genomics“



Historisches: MALDI-TOF-MS, Münster & Nobelpreis

- **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry**
- **entwickelt in den 1980's von Karas & Hillenkamp und Tanaka *et al.***

Anal. Chem. **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons

Michael Karas*
Franz Hillenkamp

Protein and Polymer Analyses up to *m/z* 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Koichi Tanaka†, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida
Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

Dr. Franz Hillenkamp (Prof.

Institut für Medizinische Physik und Biophysik

Geschäftsführender Direktor:

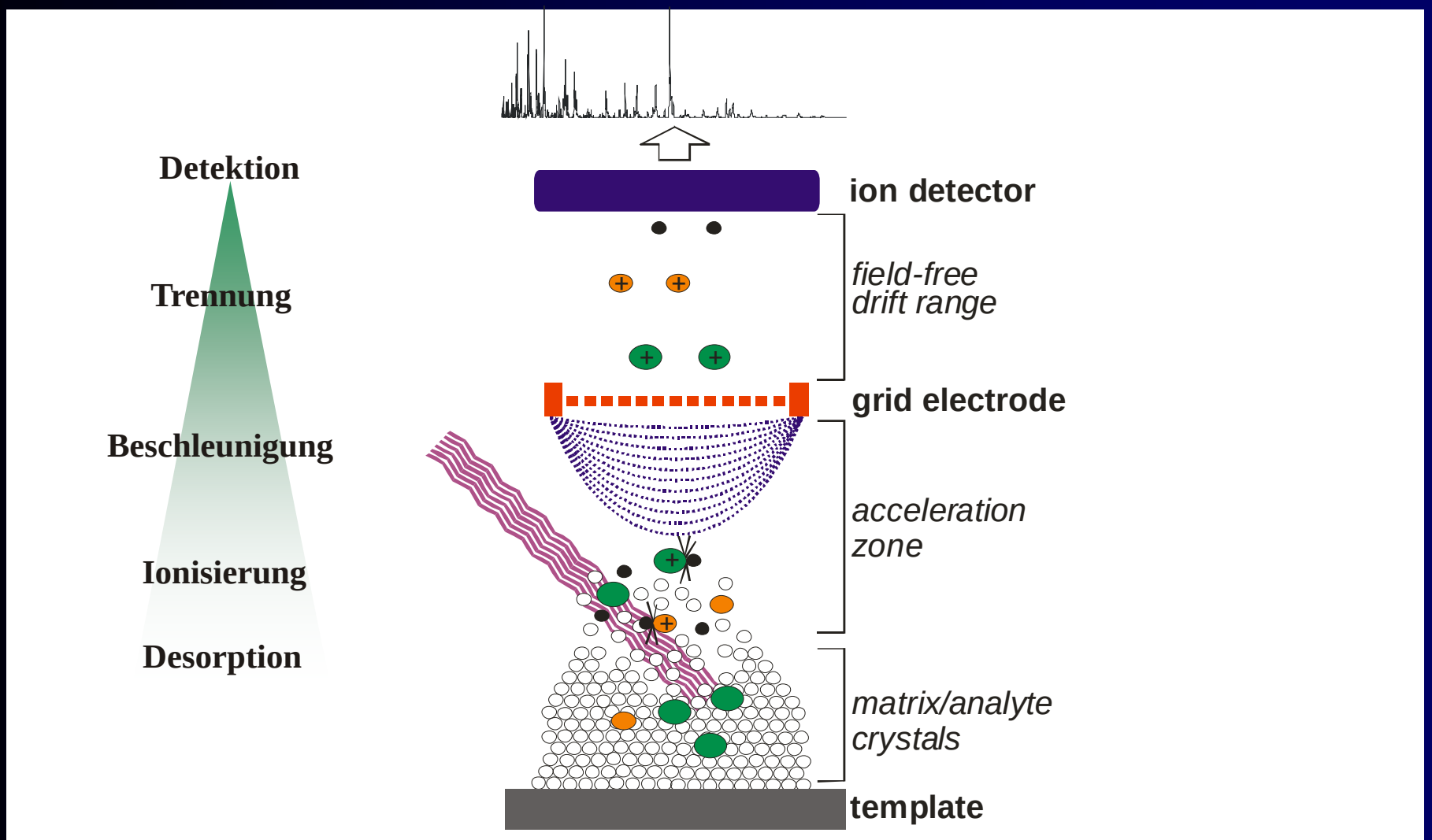
Univ.-Prof. Dr. Rudolf Reichelt

Institutssekretariat:
Robert-Koch Str. 31
D-48149 Münster
Tel.: +49(0)251/83 -55100, -55104
Fax.: +49(0)251/83 -55121

- **Nobelpreis für Chemie an Koichi Tanaka im Jahr 2002 (Fa. Shimadzu, Japan)**

MALDI-TOF MS:

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

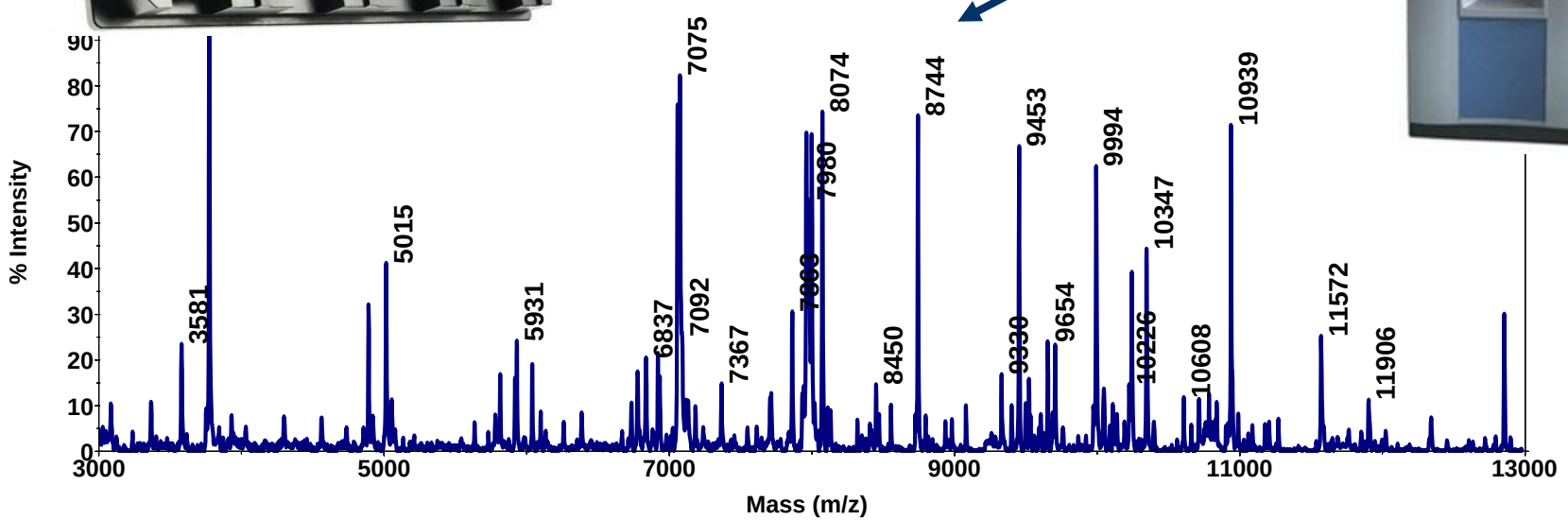


MALDI-TOF-MS Analyse

automated spectrum acquisition ~60 sec

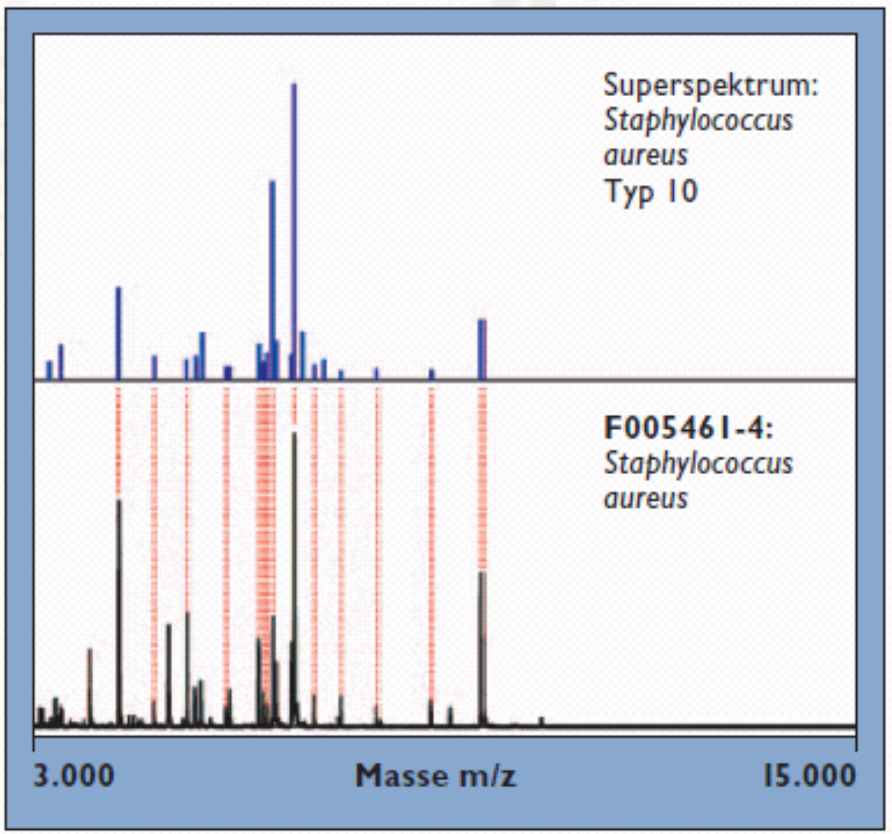
ionisation of intact proteins and molecular weight measurement

(Abb. : Fa. Shimadzu)



Mikobiologie: Identifizierung von Keimen

- Spektrenbibliotheken
- Identifizierung des Stammes und der Spezies
- z.B. auch „EHEC“ (enterohämorrhagische Escherichia coli)



Superspektrum von *Staphylococcus aureus* (oberes Bild) und das Fingerprint-Massenspektrum einer klinischen Probe (unteres Bild). Die gepunkteten Linien zeigen übereinstimmende Massen im Fingerprint der Probe und dem Referenzspektrum.

ENDE

Herzlichen Dank fürs Zuhören!