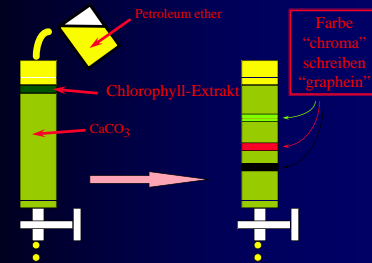




Dr. rer. nat. Frank Kannenberg
Centrum für Laboratoriumsmedizin
- Zentrallaboratorium -
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Strasse 33
D-48149 Münster
Tel.: 0251 83-47227
Fax: 0251 83-47225
zlab@lehre.uni-muenster.de
frank.kannenberg@ukmuenster.de

Säulenchromatographie

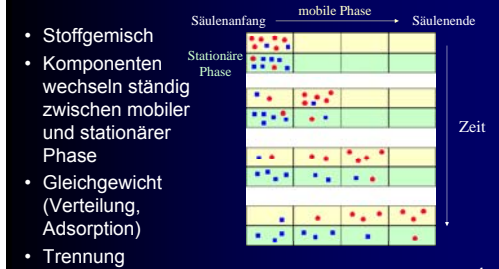


Was ist Chromatographie?

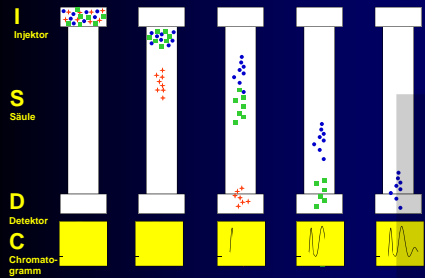
Trennung ähnlicher Moleküle aus komplexen Gemischen

- 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

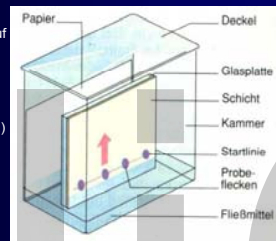


Trennprinzip



Dünnschichtchromatographie (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



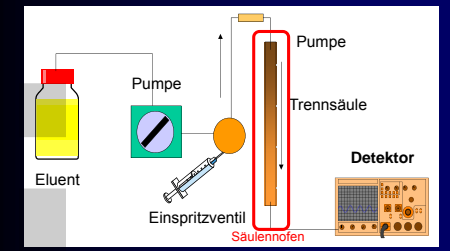
Retentionsfaktor (R_f-Wert)

- Substanzspezifisch (bei gleichen chromat. Bedingungen)

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

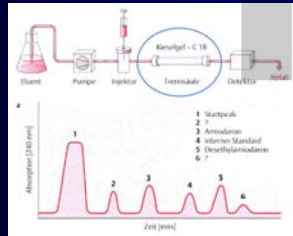


HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



RP-HPLC: Medikamentenanalyse

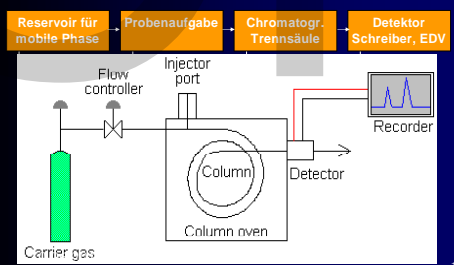
- Detektion + Quantifizierung
 - Photometrie (UV-vis Detektor)
 - auch andere Detektoren
- Peak
 - Retentionszeit substanzspezifisch
 - Höhe, Fläche proportional zur Konzentration
 - Kalibration
 - Quantifizierung



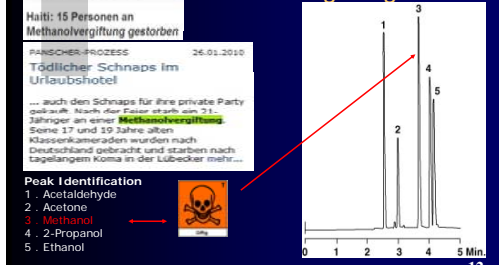
Gaschromatographie: Vgl. HPLC

- HPLC: Mobile Phase flüssig (Laufmittel)
- GC: Mobile Phase gasförmig (Trägergas)
 - 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



GC-Anwendung: Toxikologie Blutalkohol, Methanol-Vergiftung



GC-Anwendung: Stoffwechseldiagnostik Smith-Lemli-Opitz Syndrom

- SLO-Syndrom
 - vererbbarer Defekt in der Cholesterolsynthese
 - 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
 - 22 Fälle seit 1995 hier entdeckt, davon 2 pränatal

SLO: Häufige Missbildungen

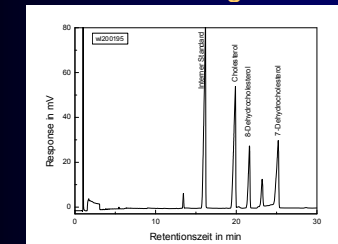
- Schädelformierung (Mikrozephalie)
- breite Nasenwurzel
- hoher Gaumen
- abnorm kleiner Oberkiefer (Mikrognathie)
- Herabhängen der Lidspalten (Ptosis)
- Verwachsungen an Fingern + Zehen (Syndaktylie)
- Minderwuchs
- geistige Retardierung
- Muskelschwäche
- Entwicklungsanomalie der Genitalien

Cholesterinvorläufer & Defekte

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

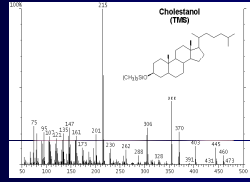


SLO: GC-Chromatogramm



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

- 17 -

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)

- 18 -

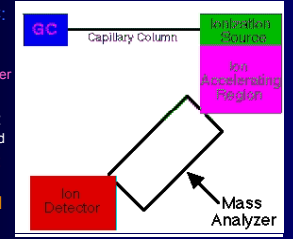
Grundprinzip der MS

- 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

- 19 -

GC/MS: schematischer Geräteaufbau

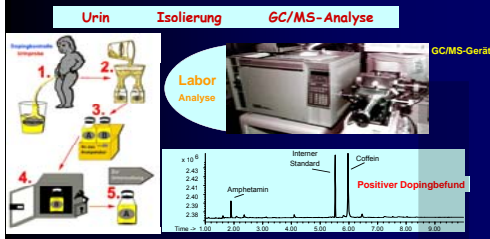
- Verbindung zum GC: Interface, Transfer Line
- Ionenerzeugung: Quelle, Ionisierungskammer
- massenspezifische Trennung der Ionen: MS-Analysator, Magnetfeld
- Detektion der Ionen: Detektor, Multiplier
- Datenaufnahme und Auswertung: PC, EDV



Quelle der Animation: T.G. Chasten 1996 (www.dru.edu)

- 20 -

GC/MS: Dopingkontrolle

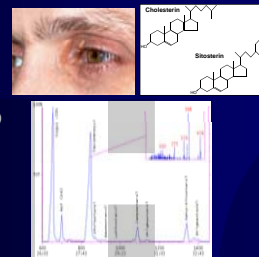


Quelle: „Doping im Sport“, W. Schänzer, Institut für Biochemie, DSHS Köln, 2000

- 21 -

Sitosterolämie (Phytosterolämie)

- Klinik:
 - Xanthome, Xanthelasma
 - Gelenkschmerzen, Arthritis
 - frühe Arteriosklerose + KHK
- Serum:
 - Cholesterin norm bis leicht ↑
 - Phytosterine ↑ (pflanzl. Kost) bes. Sitosterin, Campesterin
 - Sitostanol, Campestanol ↑
 - Gallensäure CDCA ↓
- Nachweis:
 - GC, GC/MS
 - Gen-Sequenzierung
- genetischer Defekt:
 - autosomal rezessiv
 - Mutation ABC G5, ABC G8



Quelle: www.med.tcd.ie

- 22 -

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 Schönb, Universität Bonn, 2004

- 23 -

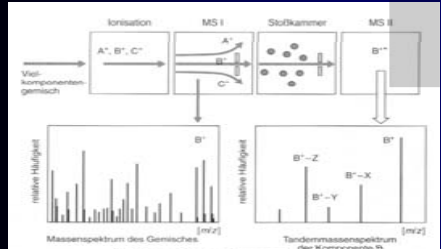
Tandem-Massenspektrometrie

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



- 24 -

MS/MS: Prinzip

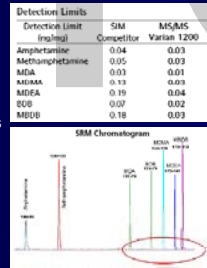


Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie (aus Inst. Analytische Chemie, K. Cammann, Spektrum 2001)

- 25 -

MS/MS: Drogen in Haaren

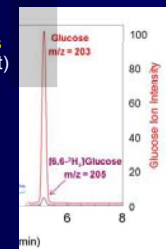
- Nachweis von Drogen in Haaren
 - GC/MS (SIM)
 - Signal: Analyt (Konzentration)
 - S/N durch „clean up“ besser
- höhere Empfindlichkeit
- qualitativ besseres Messergebnis
 - Informationsgehalt 1000x höher im Vergleich zu GC/MS
 - höhere Sicherheit bei der Substanzidentifizierung (z.B. Doping-Kontrolle)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



- 26 -

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.....



- 27 -

LCMS/MS: Immunsuppressiva

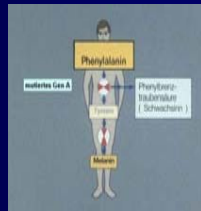
- Kontrolle nach Organtransplantationen
 - Enges therapeutisches Fenster
 - Zu niedrig: Organ-Abstoßung
 - Zu hoch: Nebenwirkungen (z.B. Nierenversagen)
- hohe Empfindlichkeit
- qualitativ bessere Messergebnisse im Vergleich zu Immunoassays
 - Bestimmung der „Muttersubstanz“
 - Metaboliten: keine Kreuzreaktivität



- 28 -

MS/MS: Neugeborenen-Screening

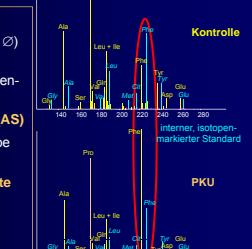
- Phenylketonurie (PKU)
- Hornsriepkrankheit (Leu, Ile, Val)
- Homocystinurie
- Glutarsäure Acidämie
- Methylmalonsäure Acidämie
- Propionsäure Acidämie
- Tyrosinämie
- Nicht-ketotische Hypergluzinämie
- Argininbernsteinsäure-Krankheit
- Hyperprolinämie
- Hypermethioninämie



- 29 -

Neugeborenen-Screening: PKU

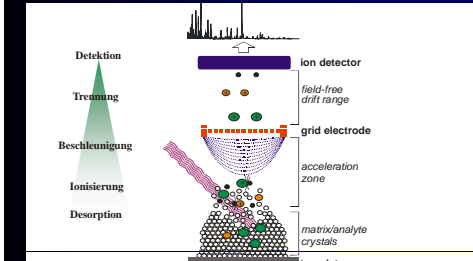
- Präparation und MS/MS-Analyse
 - Blutspot auf Filterpapier (3 mm Ø) Mikrotiterplatte
 - Zugabe von Methanol plus isotopenmarkierter interner Standard
 - Butylierung aller Aminosäuren (AS)
 - Injektion und Ionisierung der Probe keine Chromatographie!
 - MS/MS-Analyse der AS-Produkte (Neutralverlust-Analyse)
 - Quantifizierung der AS durch Standard



- 30 -

MALDI-TOF MS:

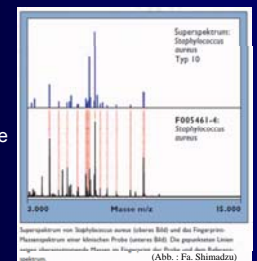
Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry



- 31 -

Mikrobiologie: Identifizierung von Keimen

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



- 32 -