

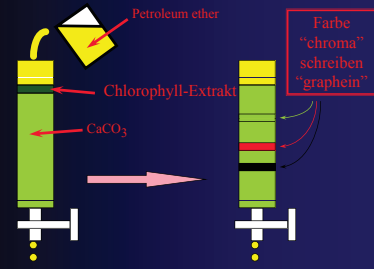


Dr. rer. nat. Frank Kannenberg
Centrum für Laboratoriumsmedizin
– Zentrallaboratorium –
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1
D-48149 Münster
Tel.: 0251 83-47227
Fax: 0251 83-47225
www.klich.uni-muenster.de
frank.kannenberg@ukmuenster.de

Wintersemester 2017/18

- 1 -

Säulenchromatographie



- 2 -

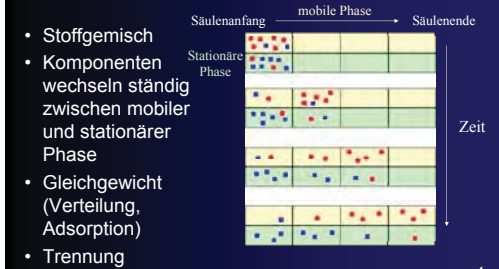
Was ist Chromatographie?

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.

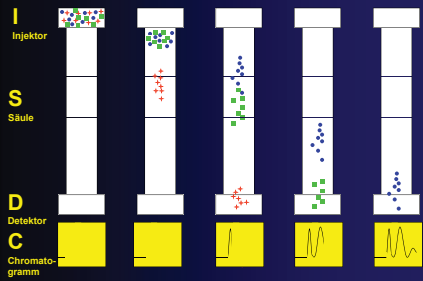
- 3 -

Trennprinzip



- 4 -

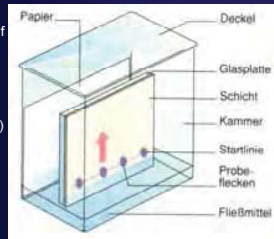
Trennprinzip



- 5 -

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

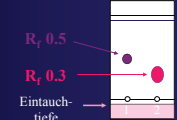


- 6 -

Retentionsfaktor (R_f-Wert)

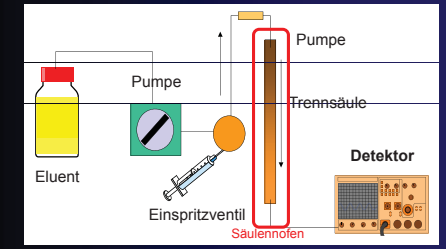
- Substanzspezifisch (bei gleichen chromat. Bedingungen)

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



- 7 -

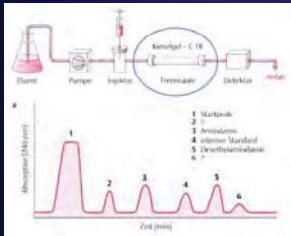
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



- 8 -

RP-HPLC: Medikamentenanalyse

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



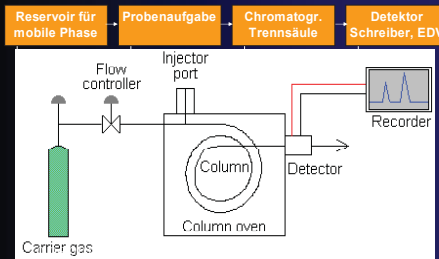
- 9 -

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)

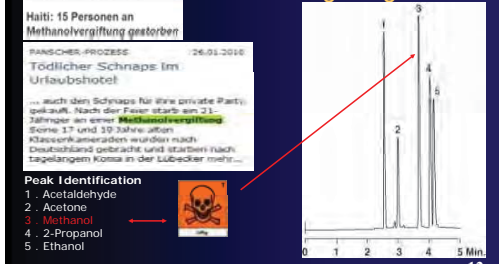
- 10 -

GC: Schematischer Aufbau



- 11 -

GC-Anwendung: Toxikologie Blutalkohol, Methanol-Vergiftung



- 12 -

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

- 13 -

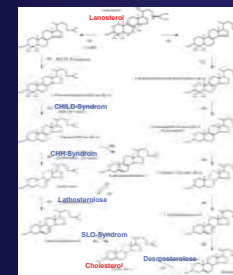
SLO: Häufige Missbildungen

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

- 14 -

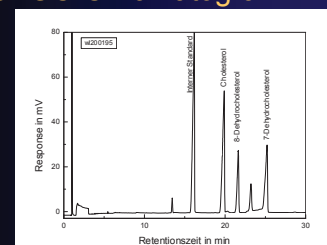
Cholesterinvorläufer & Defekte

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



- 15 -

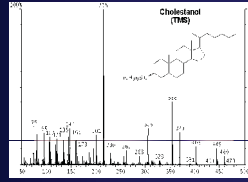
SLO: GC-Chromatogramm



GC-Chromatogramm der Plasma-Neutralsterolfraction eines SLO-Patienten. - 16 -

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 (Spektralen-Bibliotheken)

- 18 -

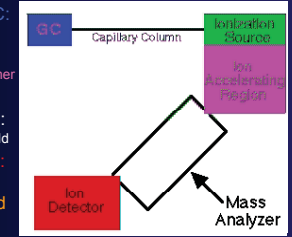
Grundprinzip der MS

- 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

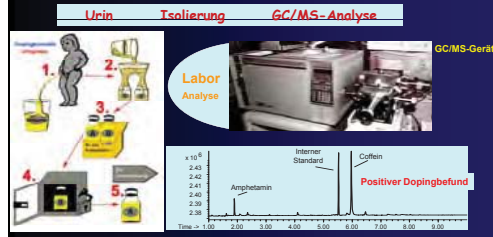
- Verbindung zum GC: Interface, Transfer Line
- Ionenerzeugung: Quelle, Ionisierungskammer
- massenspezifische Trennung der Ionen: MS-Analysator, Magnetfeld
- Detektion der Ionen: Detektor, Multiplier
- Datenaufnahme und Auswertung: PC, EDV



Quelle der Animation: T.G. Chabbert 1996 (www.dhu.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
 - 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 -

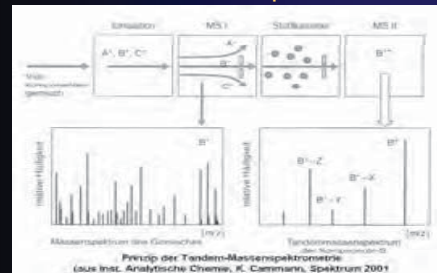
Tandem-Massenspektrometrie

- 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

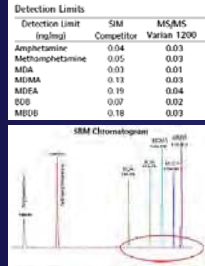


Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie (aus: Inst. Analytische Chemie, K. Cammann, Spektrum 2001)

- 25 -

MS/MS: Drogen in Haaren

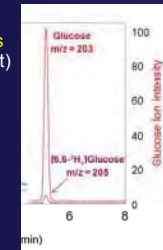
- Nachweis von Drogen in Haaren
 - GC/MS (SIM)
 - Signal: Analyt (Konzentration)
 - S/N durch „clean up“ besser
- höhere Empfindlichkeit
- qualitativ besseres Messergebnis
 - Informationsgehalt 1000x höher im Vergleich zu GC/MS
 - höhere Sicherheit bei der Substanzidentifizierung (z.B. Doping-Kontrolle)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

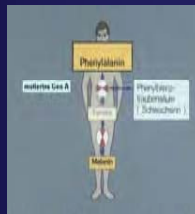
- Kontrolle nach Organtransplantation
 - Enges therapeutisches Fenster
 - Zu niedrig: Organ-Abstoßung
 - Zu hoch: Nebenwirkungen (z.B. Nierenversagen)
- hohe Empfindlichkeit
- qualitativ bessere Messergebnisse im Vergleich zu Immunoassays
 - Bestimmung der „Muttersubstanz“
 - Metaboliten: keine Kreuzreaktivität



- 28 -

MS/MS: Neugeborenen-Screening

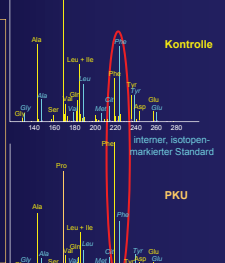
- Phenylketonurie (PKU)
- Hornsyrupkrankheit (Leu, Ile, Val)
- Homocystinurie
- Glutarsäure Acidämie
- Methylmalonsäure Acidämie
- Propionsäure Acidämie
- Tyrosinämie
- Nicht-ketotische Hyperglyzinämie
- Argininbernsteinsäure-Krankheit
- Hyperprolinämie
- Hypermethioninämie



- 29 -

Neugeborenen-Screening: PKU

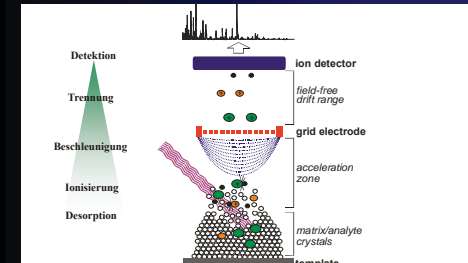
- **Präparation und MS/MS-Analyse**
- **Blutspot auf Filterpapier** (3 mm Ø) Mikrotiterplatte
- Zugabe von Methanol plus isotopenmarkierter interner Standard
- **Butylierung aller Aminosäuren (AS)**
- Injektion und Ionisierung der Probe keine Chromatographie!
- **MS/MS-Analyse der AS-Produkte** (Neutralverlust-Analyse)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



- 30 -

MALDI-TOF MS:

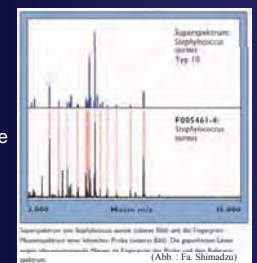
Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry



- 31 -

Mikrobiologie: Identifizierung von Keimen

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



- 32 -