



Dr. rer. nat. Frank Kannenberg

Zentrale Einrichtung Labor  
 – UKM Labor –  
 Universitätsklinikum Münster  
 Albert-Schweitzer-Campus 1  
 D-48149 Münster  
 Tel.: 0251 83-47227  
 Fax: 0251 83-47225  
 kannenberg@uni-muenster.de  
 www.klchi.uni-muenster.de

## 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

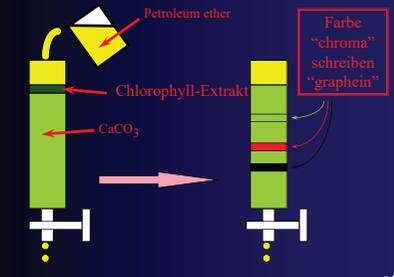


M. Tswett (Cvet; Ljeer) schlug die Methode vor und prägte den Begriff Chromatographie. Seine Arbeiten wurden viele Jahre nicht beachtet.



- **Chromatografie:** „mit Farbe schreiben“
- Tswett 1903: Auftrennung von Chlorophyll

## Säulenchromatographie

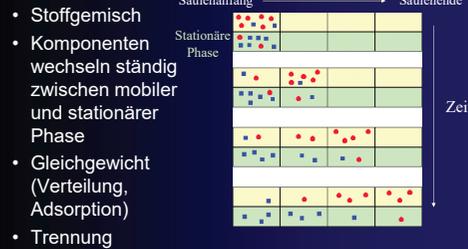


## Was ist Chromatographie?

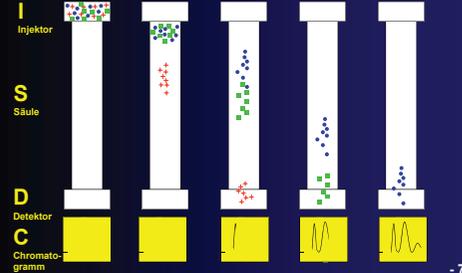
Trennung ähnlicher Moleküle aus komplexen Gemischen

- 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

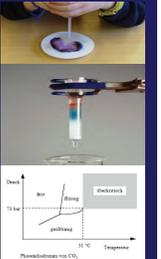


## Trennprinzip



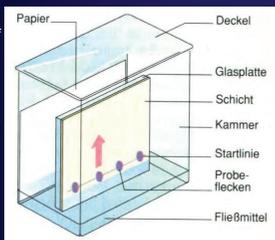
## Klassifikation der Chromatographie

- **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<sub>2</sub>



## Dünnschichtchromatographie (DC)

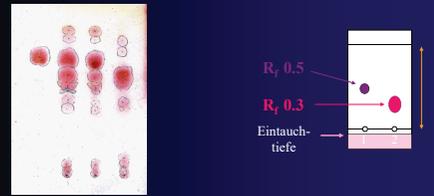
- **stationäre Phase:**
  - z.B. Kieselgel (polar) auf Glasplatte oder Alufolie
- **mobile Phase:**
  - Laufmittel, z.B. Ethanol
- **DC-Chromatogramm:**
  - Auftragen (man./autom.)
  - Entwickeln („DC-Lauf“)
  - Trocknen, Detektieren (ggf. Anfärben)
- **Polaritäten beachten!**
  - polare (hydrophile)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



## Retentionsfaktor (R<sub>f</sub>-Wert)

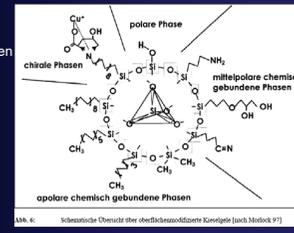
- Substanzspezifisch (bei gleichen chromat. Bedingungen)

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

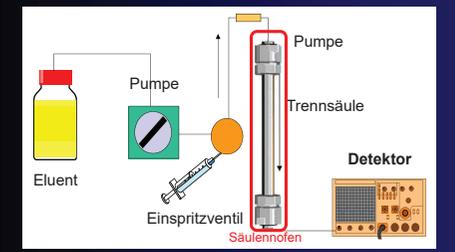


## Normal-/Umkehrphasen-Chromatographie

- **„Normalphase“:**
  - Kieselgel (SiO<sub>2</sub>)
  - polar (hydrophil)
  - für hydrophobe Analyten
  - Laufmittel unpolare (z.B. Heptan)
- **RP-Phase („reversed phase“):**
  - Kieselgel (SiO<sub>2</sub>) mit unpolaren Gruppen
  - unpolar (hydrophob)
  - Trennung hydrophiler Analyten möglich
  - Laufmittel polarer (z.B. Acetonitril/Wasser)

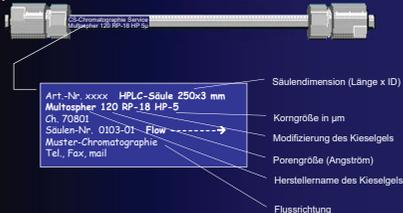


## HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



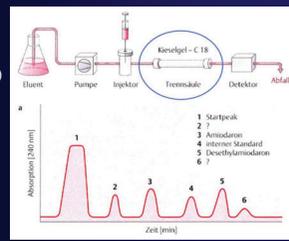
## HPLC-Säule

- **Spezifikationen**



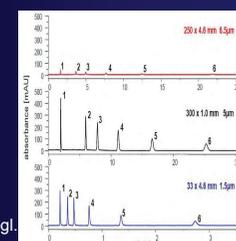
## RP-HPLC: Medikamentenanalyse

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



## HPLC: „Sensorische Verkostung“

- menschl. Geschmack als Detektor
- Eluat wird „verkostet“
- Aroma-Analytik
- „LC-Taste“<sup>SM</sup> (Abb. Fa. Symrise)

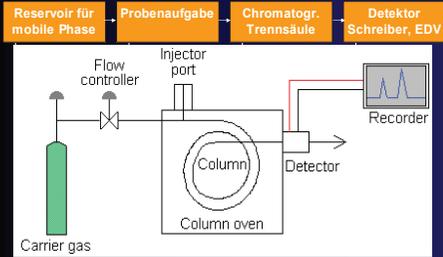


## Gaschromatographie: Vgl. HPLC

- 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)

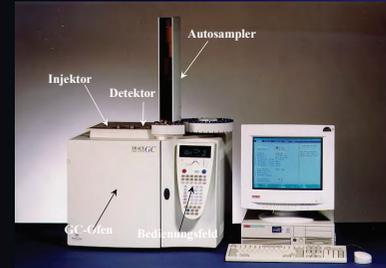
- 17 -

## GC: Schematischer Aufbau



- 18 -

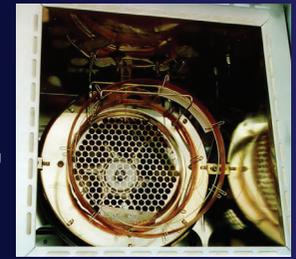
## Gaschromatograph



- 19 -

## Quarzglas-Kapillaren im GC-Ofen

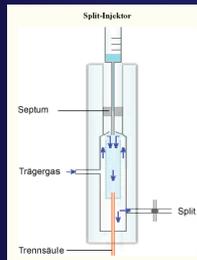
- GC-Säule aus Glas
- Polyimidbeschichtung (Flexibilität)
- 10-100 m Länge
- 0,1-0,5 mm Innendurchmesser
- 0,1-1,2 µm Beschichtung stationäre Phase
- dreidimensional vernetzt
- verschiedene Polaritäten



- 20 -

## Split-/Splitless-Injektor

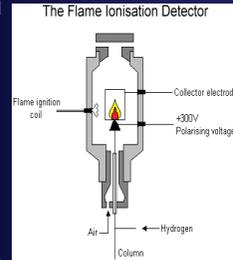
- Injektion mit Spritze durch Septum (etwa 1 µl)
- Heißes Rohr (Liner) Verbindung zur Trennsäule
- Probe verdampft
- Splitventil auf oder zu
- Trägergas nimmt Probe mit auf die Säule



- 21 -

## 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)



- 22 -

## 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.alk-hoffmann-chemie.uni-mainz.de/pdf/scipicript2.pdf>

- 23 -

## GC-Anwendung: Toxikologie Blutalkohol, Methanol-Vergiftung

Halti: 15 Personen an Methanolvergiftung gestorben

PANSCHER-PROZESS 26.01.2010

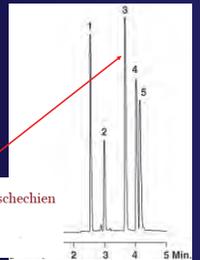
Tödlicher Schnaps im Urlaubsotel

... 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 Lebercker mehr...

15.11.11. Atemschutzgas

Bundesamt warnt vor Pansch-Alkohol aus Tschechien

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



- 24 -

## Methanol-Vergiftung, Behandlung

Ethanol =ADH=> Acetaldehyd =langsam=> Essigsäure (=>Citratzyclus CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O)  
Methanol =ADH=> Formaldehyd =schnell=> Ameisensäure (metabolische Acidose)  
Isopropanol =ADH=> Aceton

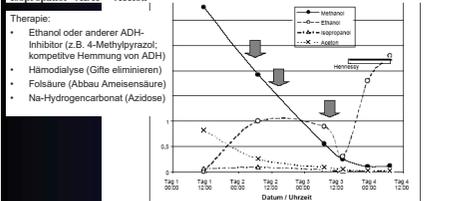


Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentrationen von Methanol, Ethanol, Isopropanol und Aceton

- 25 -

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

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

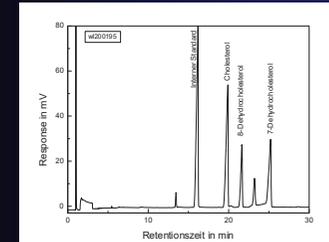
- 26 -

## 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
  - 24 Fälle seit 1995 hier entdeckt, davon 2 pränatal

- 27 -

## SLO: GC-Chromatogramm

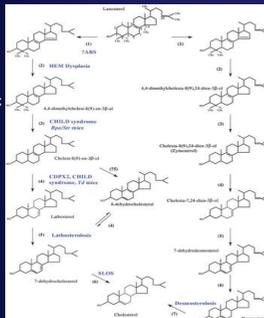


GC-Chromatogramm der Plasma-Neutralsterolfraction eines SLO-Patienten.

- 28 -

## Cholesterinvorläufer & Defekte

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



- 29 -

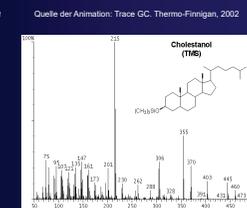
## Gliederung

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-Massenspektrometrie)
  - d) MALDI-MS („Weiche Ionisierung“, Proteomics)

- 30 -

## GC/MS-Kopplung

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



- 31 -

## 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 („Drogenkariere“ über Jahre)
- qualitativ besseres Messergebnis
  - mehr Informationen (Massenspektrum)
  - höhere Sicherheit bei der Substanzidentifizierung (z.B. Doping-Kontrolle)
  - Analyse unbekannter Verbindungen (Spektr-Bibliotheken)

- 32 -

# GC/MS 50er Jahre

## DIE 50ER JAHRE - KOMMERZIALISIERUNG



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



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



# GC/MS heute



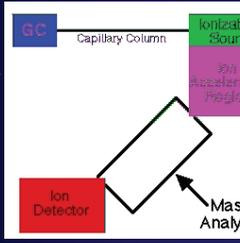
GC/MS-System „QP2010Ultra“, Abb.: Fa. Shimadzu, 2010

# 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**

# GC/MS: schematischer Geräteaufbau

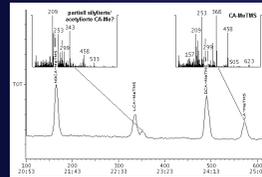
- Verbindung zum GC: Interface, Transfer Line
- **Ionenerzeugung:** Quelle, Ionisierungskammer
- massenspezifische Trennung der Ionen: MS-Analysator, Magnetfeld
- **Detektion der Ionen:** Detektor, Multiplier
- **Datenaufnahme und Auswertung:** PC, EDV



Quelle: der Animation: T.G. Chastain 1996 (www.astro.edu)

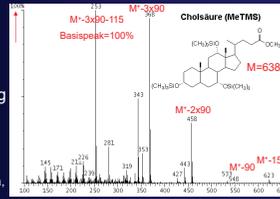
# Auswertung: „Chromatogramm“

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



# Auswertung: Massenspektren

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

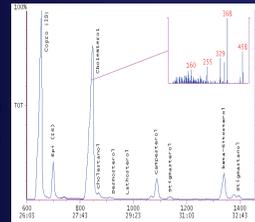


# GC/MS: Dopingkontrolle

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 ↑
  - Phytosterin ↑ (pflanzl. Kost) bes. Sitosterin, Campesterin
  - 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.medcol.ucsd.edu

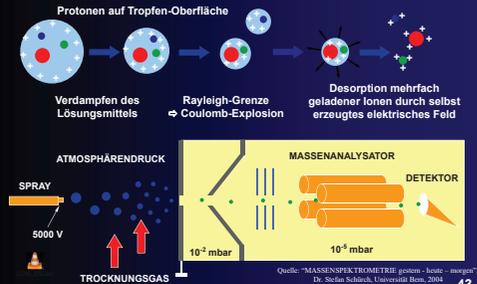
# LC/MS

- 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 Schöck, Universität Bonn, 2004

# LCMS:Elektrospray-Ionisierung (ESI)



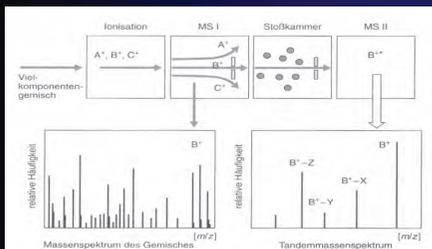
Quelle: „MASSENSPEKTROMETRIE gestern - heute - morgen“, Dr. Stefan Schöck, Universität Bonn, 2004

# 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)

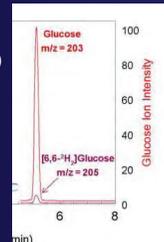
Detection Limits (ng/mg)	SIM		MS/MS
	Detection Limit	Competitor	Varian 1200
Amphetamin	0.04	0.03	
MDA	0.03	0.01	
MDEA	0.13	0.03	
MDEA	0.19	0.04	
ROB	0.07	0.02	
MBDB	0.18	0.03	

SIM Chromatogramm	MS/MS	
	MS/MS	MS/MS
Amphetamin	MS/MS	MS/MS
MDEA	MS/MS	MS/MS
MDEA	MS/MS	MS/MS
MDEA	MS/MS	MS/MS

# 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)

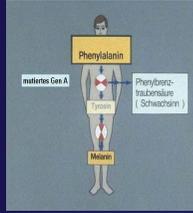
Drug	Range (µg/L)	Lower limit of quantification (µg/L)
cisA	25-5000	3.3
Everolimus	2-40	0.395
Tacrolimus	2-40	1.003
Sirolimus	2-50	0.997

Drug	Isomerase	Subst. Name (µg/L)	MS/MS
Cyclosporin A	CSA	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin B	CSB	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin C	CCS	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin D	CCD	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin E	CCE	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin F	CCF	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin G	CCG	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin H	CCH	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin I	CCI	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin J	CCJ	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin K	CCK	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin L	CCL	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin M	CCM	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin N	CCN	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin O	CCO	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin P	CCP	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin Q	CCQ	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin R	CCR	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin S	CCS	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin T	CCT	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin U	CCU	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin V	CCV	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin W	CCW	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin X	CCX	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin Y	CCY	100.0	101.0 + 1008.0
Cyclosporin Z	CCZ	100.0	101.0 + 1008.0

## MS/MS: Neugeborenen-Screening

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

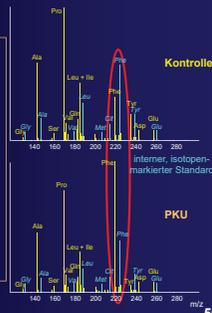


- 49 -

## Neugeborenen-Screening: PKU

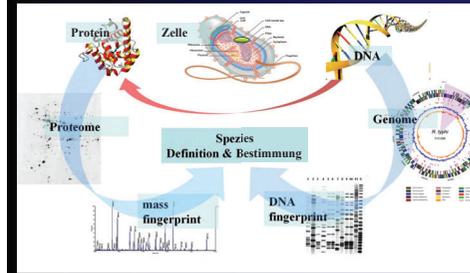
### Präparation und MS/MS-Analyse

- 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



- 50 -

## „Proteomics & Genomics“



- 51 -

## 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 Ito, Satoshi Akita, Yoshitaka Yoshida and Tatsu Yoshida  
*Journal of Organic Chemistry*, Vol. 58, No. 18, 1993  
Rapid Communications in Mass Spectrometry, Vol. 2, No. 8, 1988, 451

Dr. Franz Hillenkamp (Prof.)  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik



Geschäftsführender Direktor  
Univ.-Prof. Dr. Franz Hillenkamp

Institutstrasse  
Robert-Koch Str. 31  
48149 Münster  
Tel.: +49(0)251 81-1010, 80104  
Fax: +49(0)251 80-2021

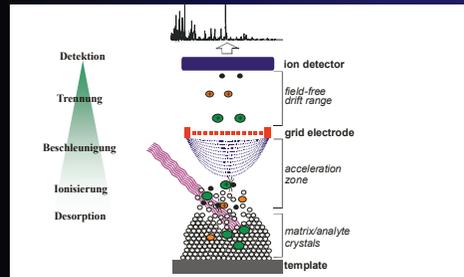


- Nobelpreis für Chemie an Koichi Tanaka im Jahr 2002 (Fa. Shimadzu, Japan)

- 52 -

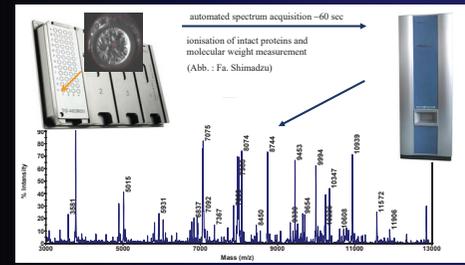
## MALDI-TOF MS

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



- 53 -

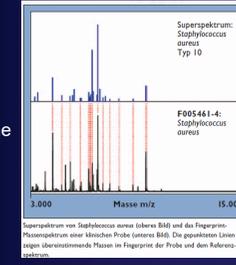
## MALDI-TOF-MS Analyse



- 54 -

## Mikrobiologie: Identifizierung von Keimen

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



- 55 -

ENDE

Herzlichen Dank fürs Zuhören!

- 56 -