

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Chromatographie und Massenspektrometrie



Dr. rer. nat. Frank Kannenberg

..... - - 'O
..... - yMU 'O -

Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1

48149 Münster

Tel.: 0251 83-47227

Fax: 0251 83-47225

kannenberg@uni-muenster.de

www.klichi.uni-muenster.de

Gliederung

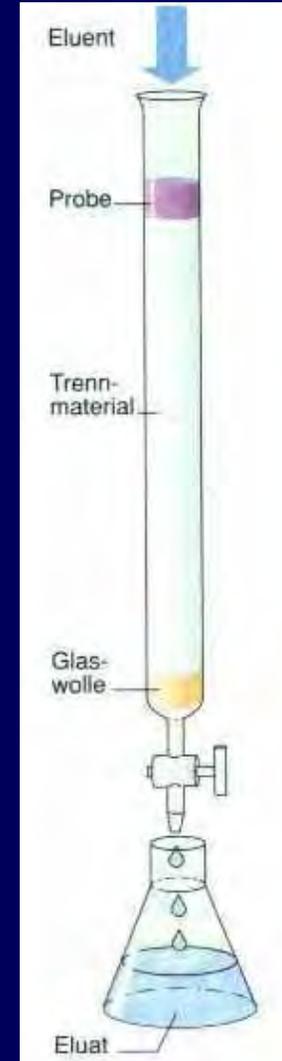
- 1. Chromatographie, Geschichte, Prinzip**
2. DC (Dünnschicht-Chromatographie)
3. HPLC (Flüssig-Chromatographie)
4. GC (Gas-Chromatographie)
5. Massenspektrometrie und MS-Kopplungen

M. Tswett 1903

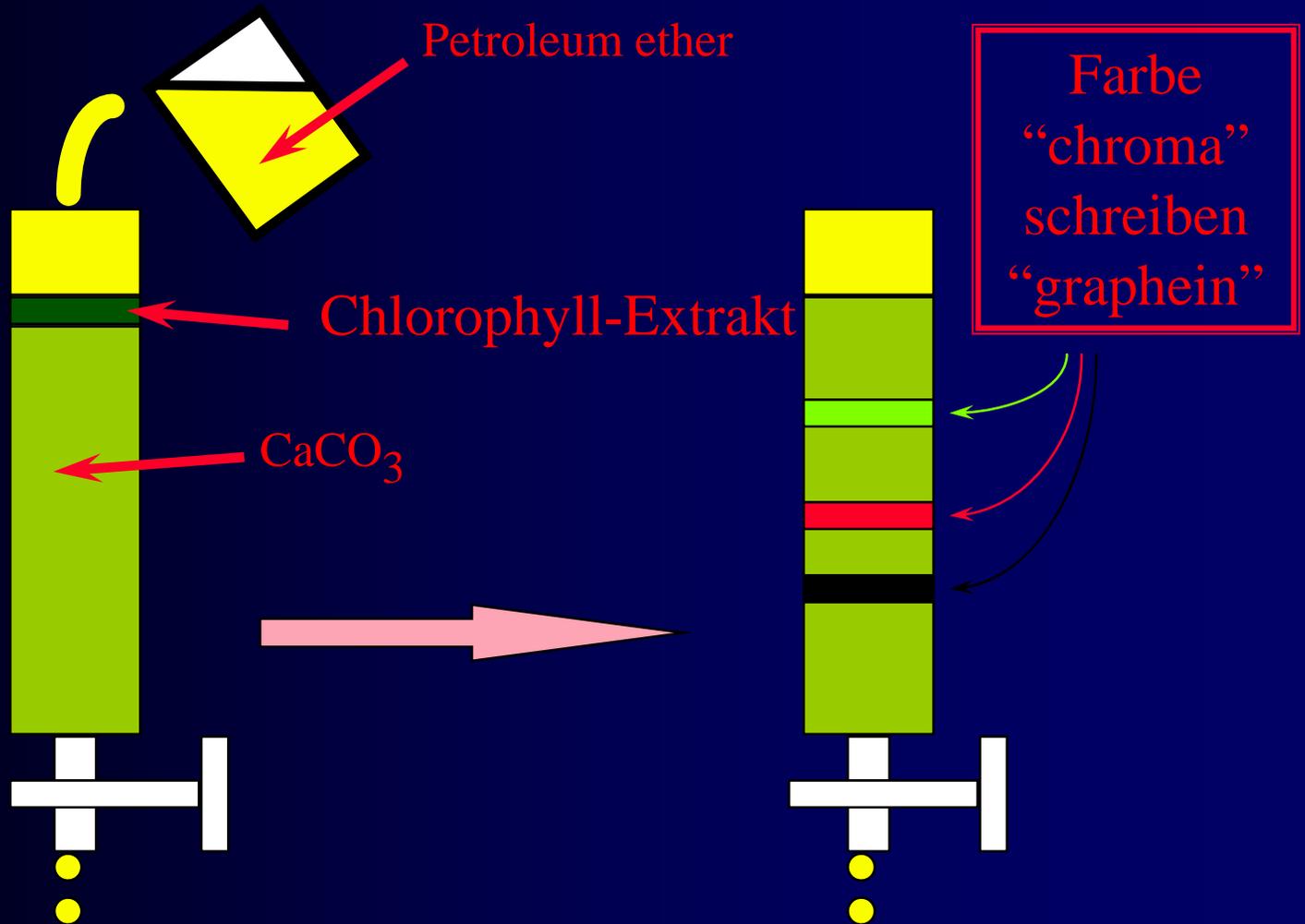


M. Tswett (Cvet; Цвет) schlug die Methode vor und prägte den Begriff Chromatographie. Seine Arbeiten wurden viele Jahre nicht beachtet.

- Chromatographie^f: „mit Farbe schreiben“
- Tswett 1903: Auftrennung von Chlorophyll



Säulenchromatographie



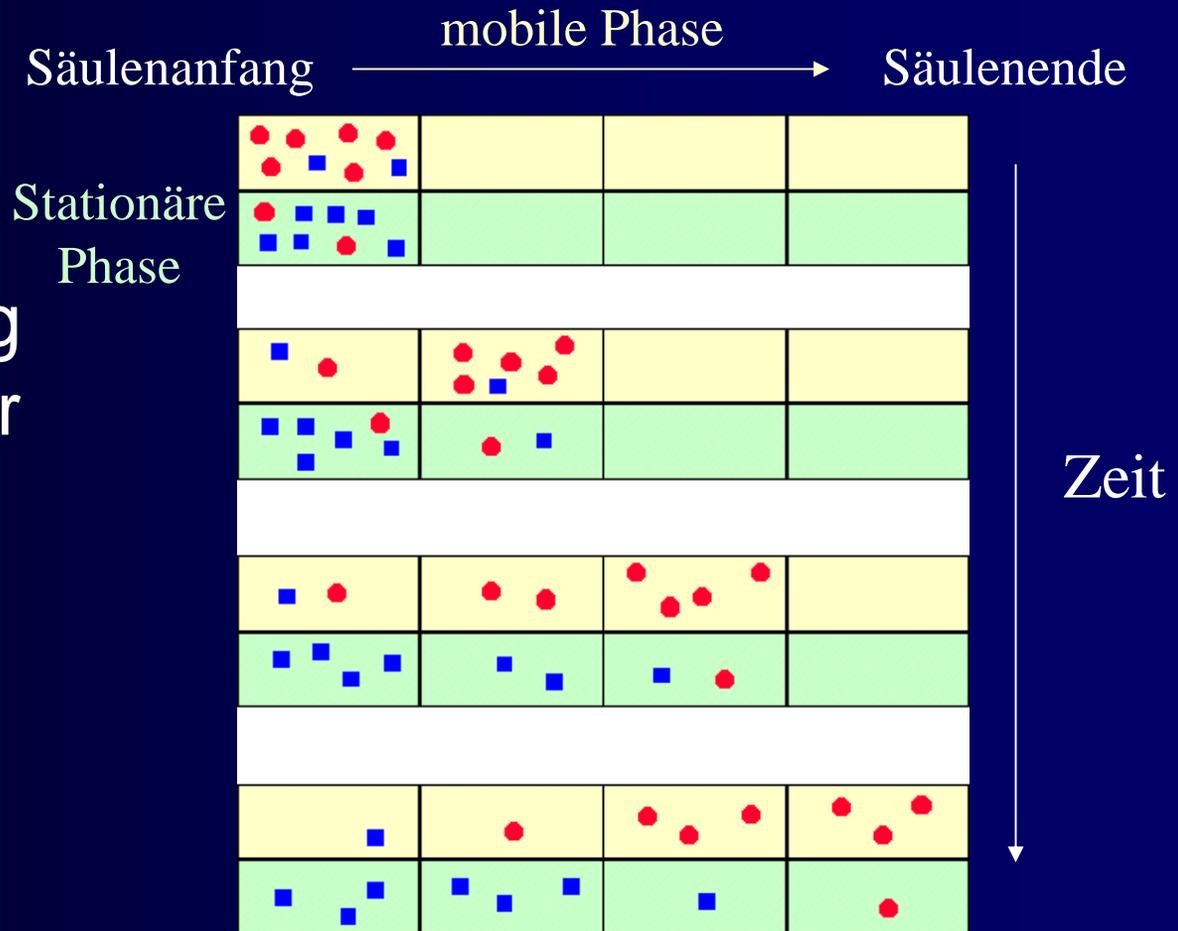
Was ist Chromatographie?

Trennung ähnlicher Moleküle aus komplexen Gemischen

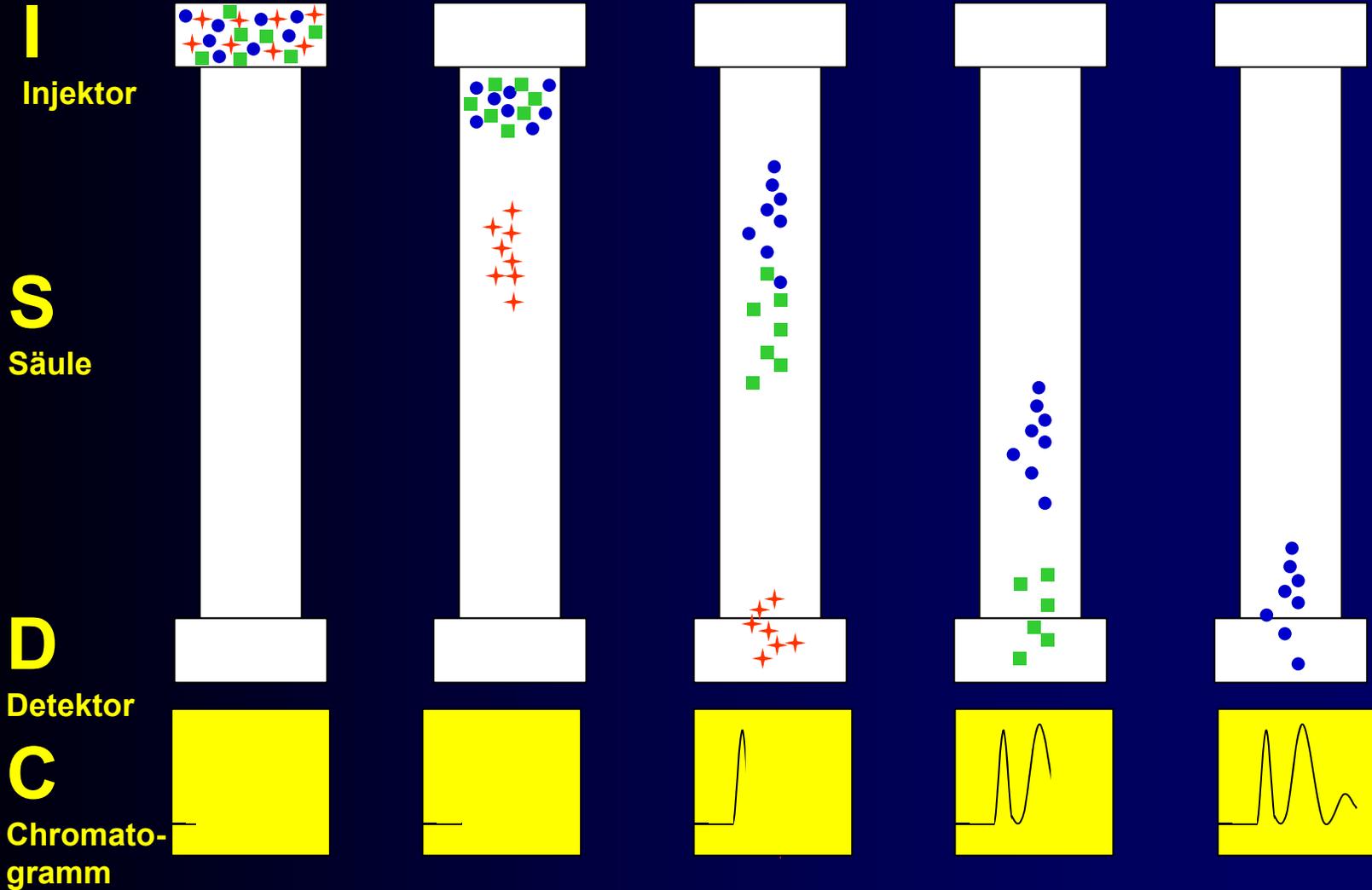
- Die Analyte werden in einer **mobilen Phase** gelöst und darin durch eine **stationäre Phase** transportiert.
- Die Phasen werden so gewählt, dass sich die Analyte unterschiedlich in ihnen **verteilen**.
- Durch die dadurch entstehenden Mobilitätsunterschiede trennen sich die Probe-Komponenten in Banden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

Trennprinzip

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

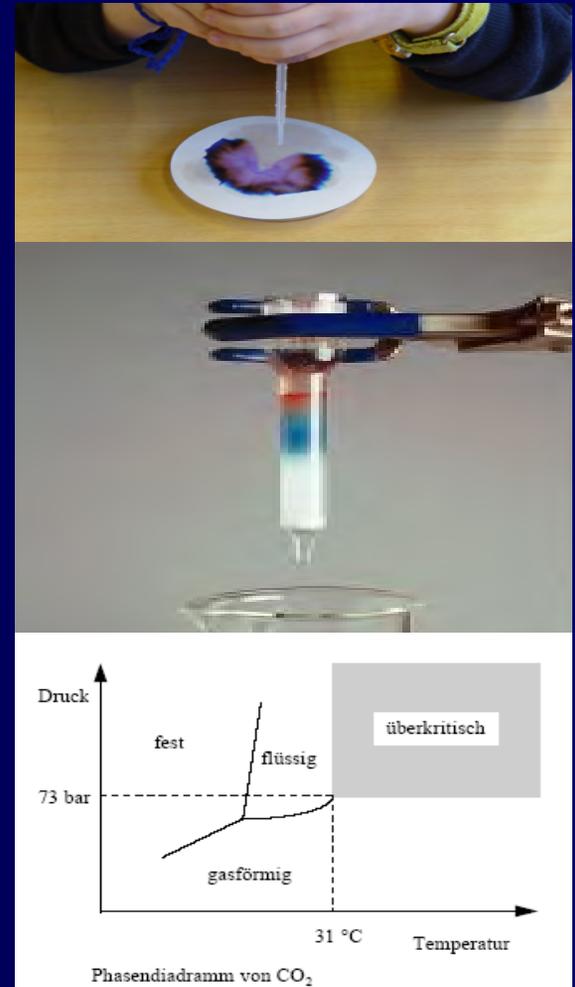


Trennprinzip



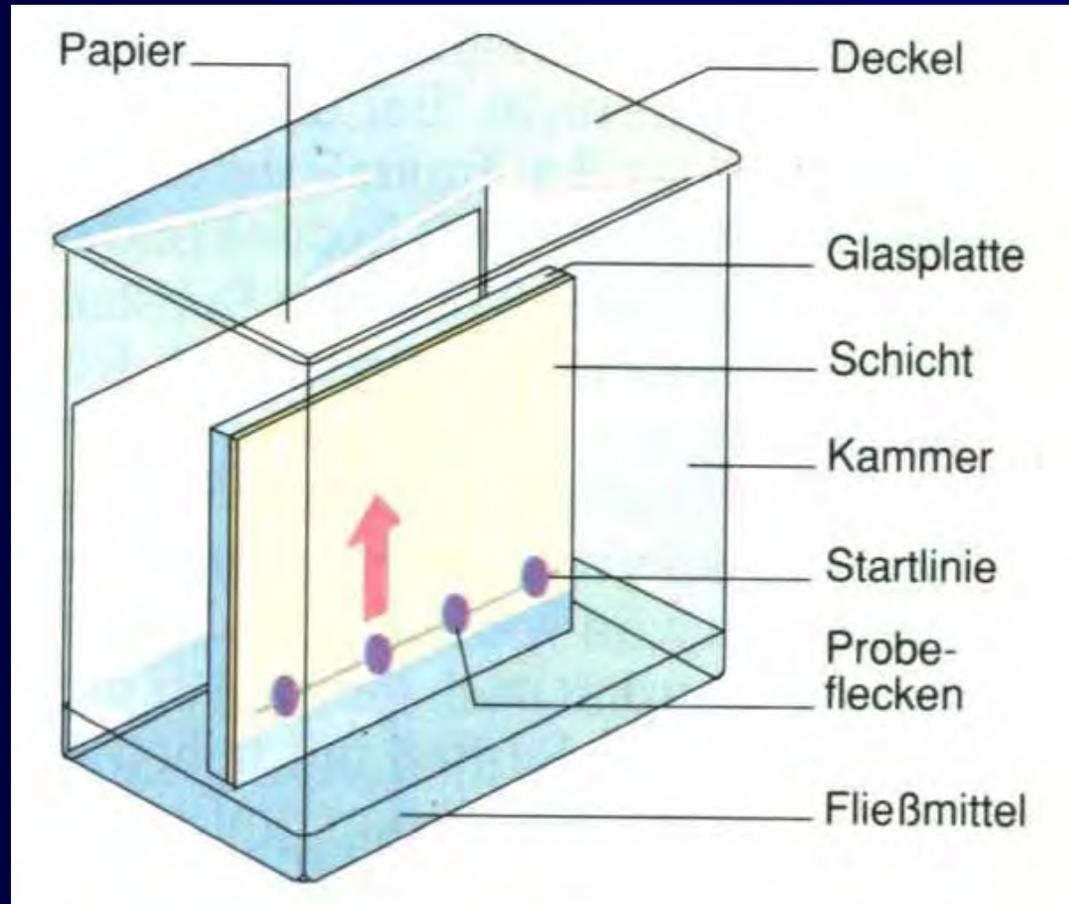
Klassifikation der Chromatographie

- 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



Dünnschichtchromatographie (DC)

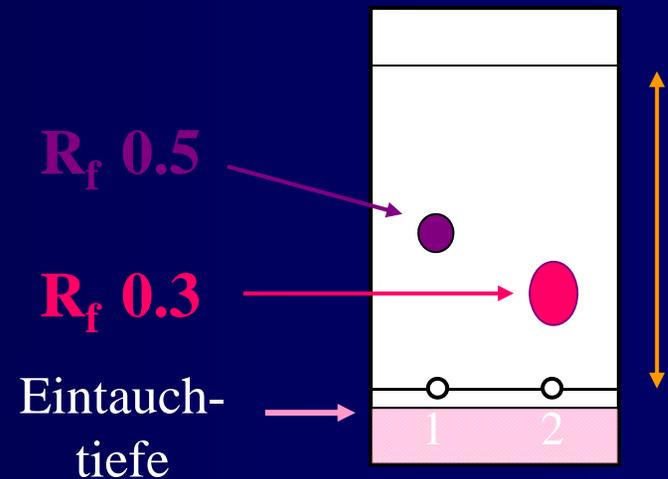
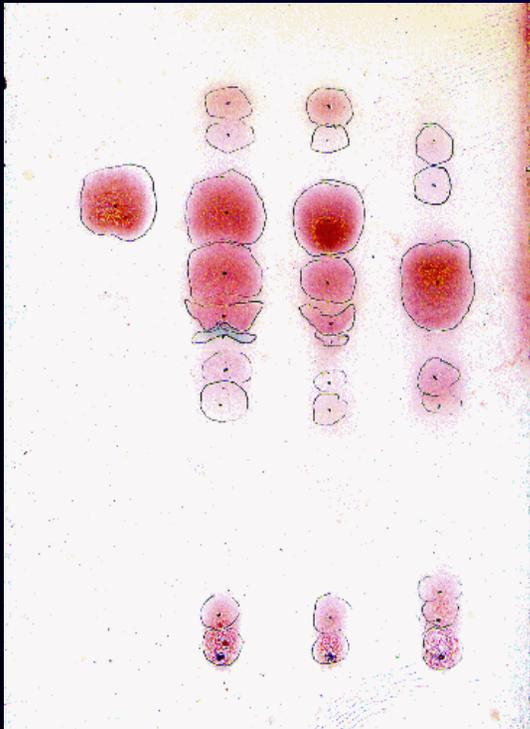
- stationäre Phase:
 - z.B. Kieselgel (polar) auf Glasplatte oder Alufolie
- mobile Phase:
 - Laufmittel, z.B. Ethanol
- DC-Chromatogramm:
 - Auftragen (man./autom.)
 - Entwickeln („DC-Lauf“)
 - Trocknen, Detektieren (ggf. Anfärben)
- Polaritäten beachten!
 - polare (hydrophile) Analyten „laufen“ auf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



Retentionsfaktor (R_f -Wert)

- Substanzspezifisch
(bei gleichen chromat.
Bedingungen)

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



Normal-/Umkehrphasen-Chromatographie

- „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)

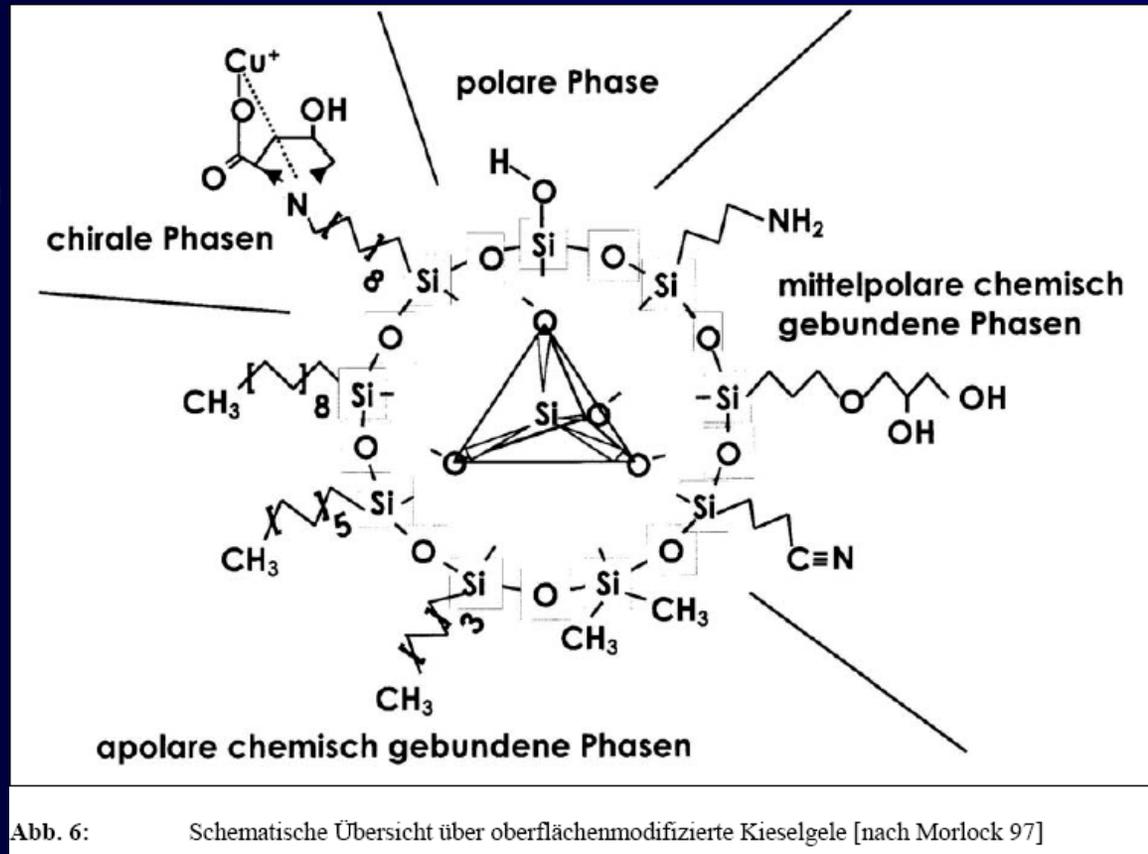
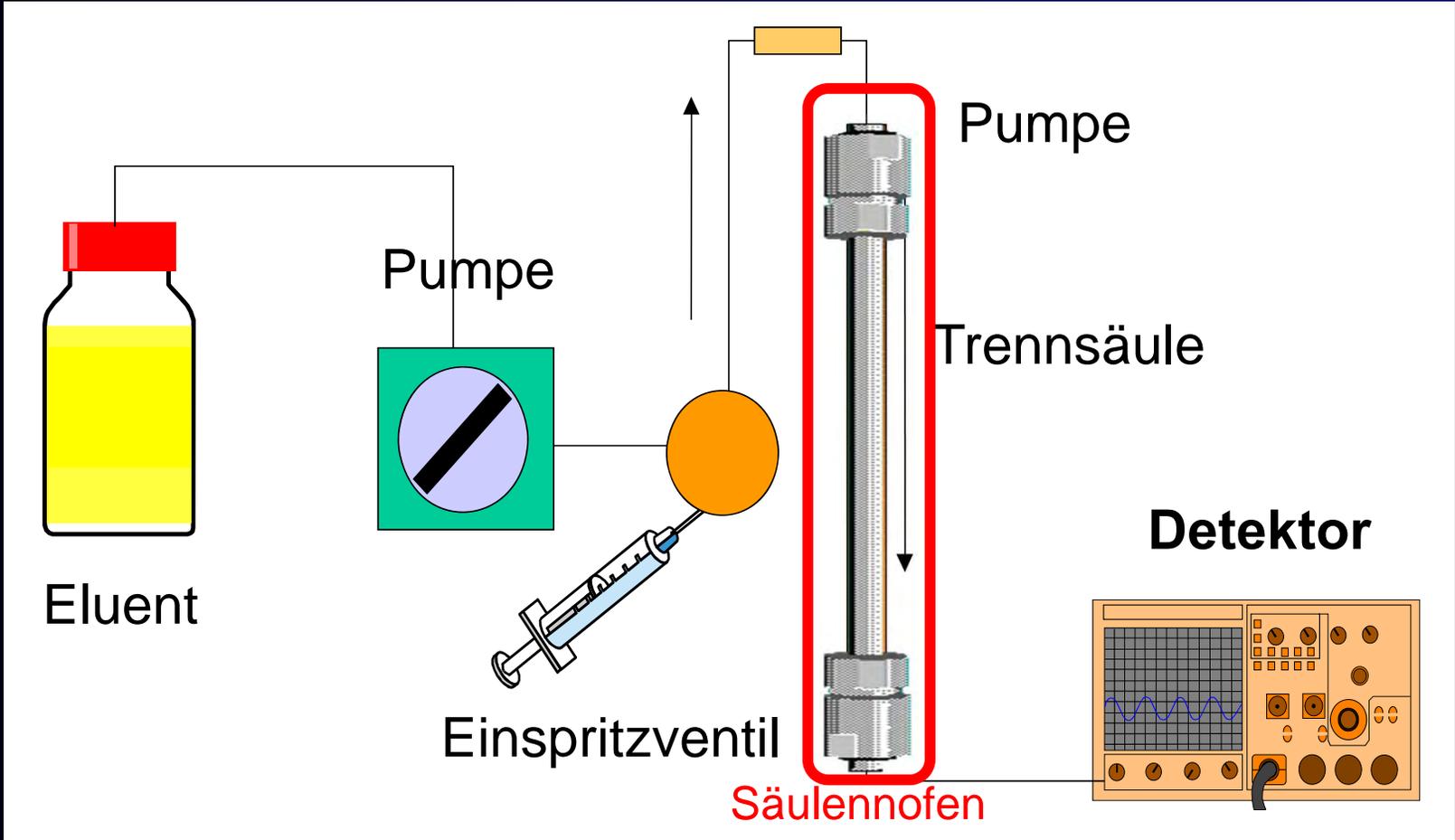


Abb. 6:

Schematische Übersicht über oberflächenmodifizierte Kieselgele [nach Morlock 97]

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



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

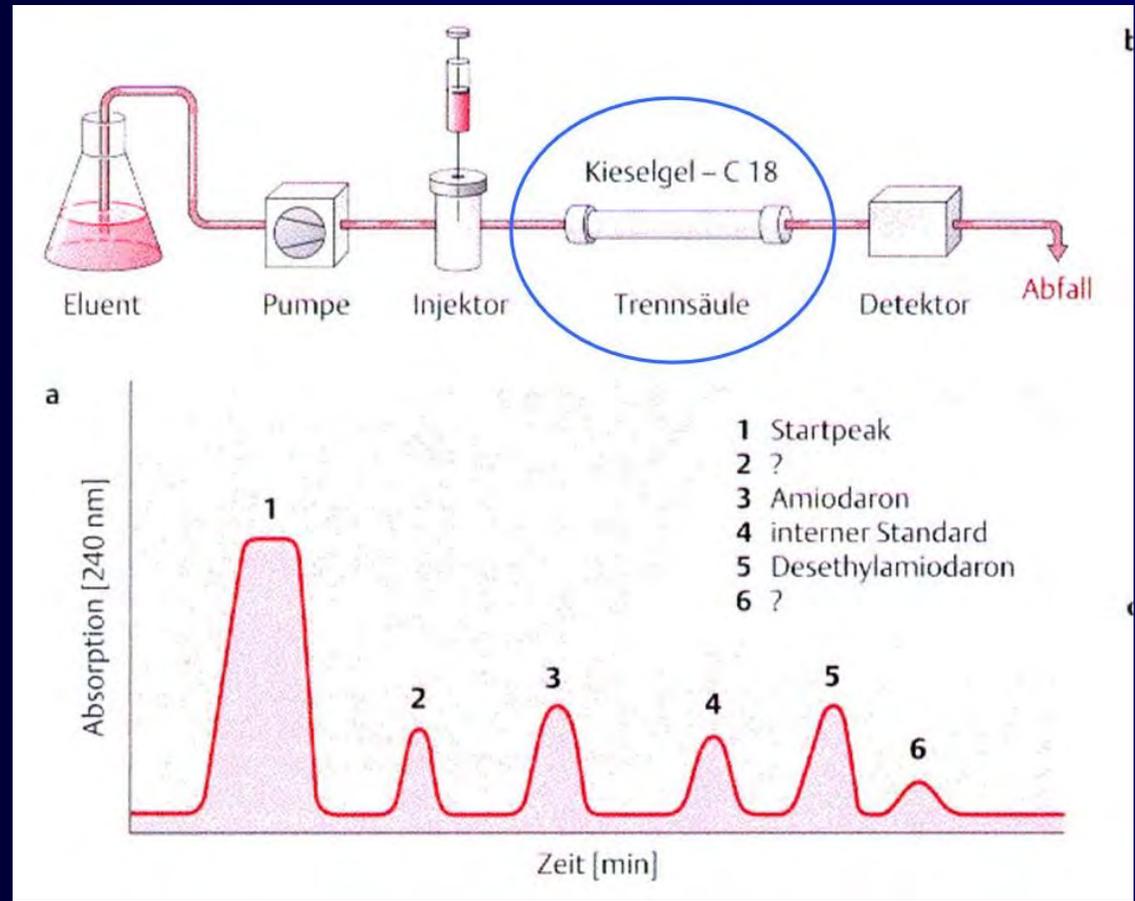
Porengröße (Angström)

Herstellernamen des Kieselgels

Flussrichtung

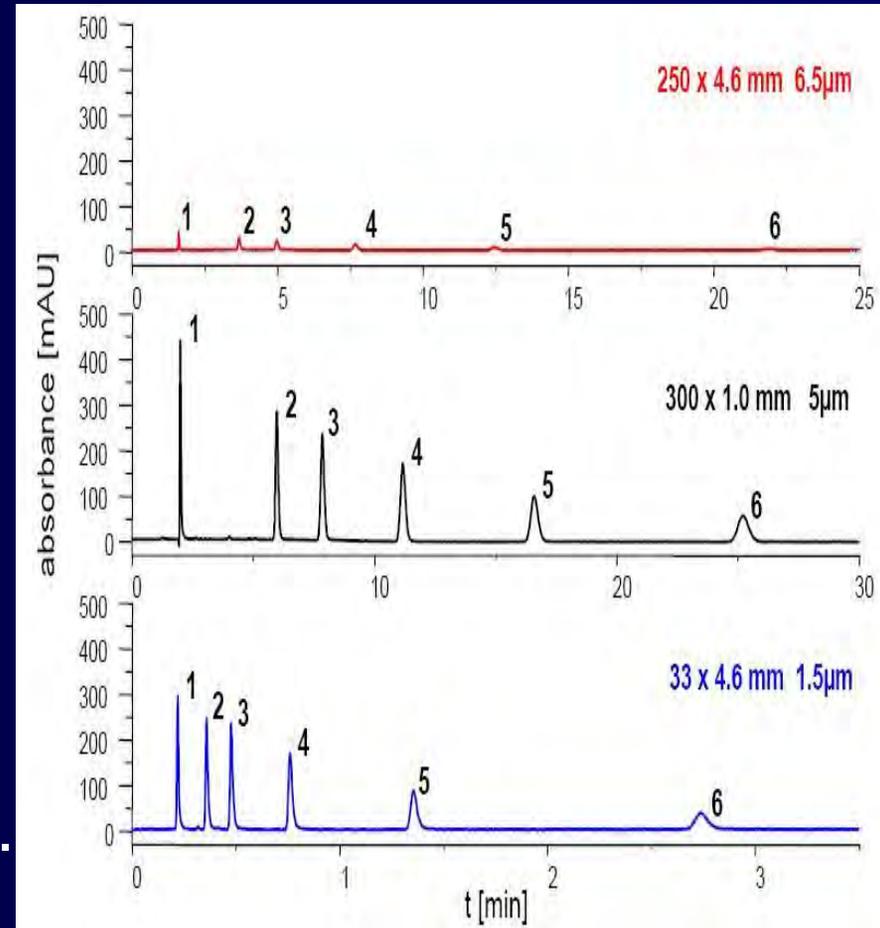
RP-HPLC: Medikamentenanalyse

- 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)

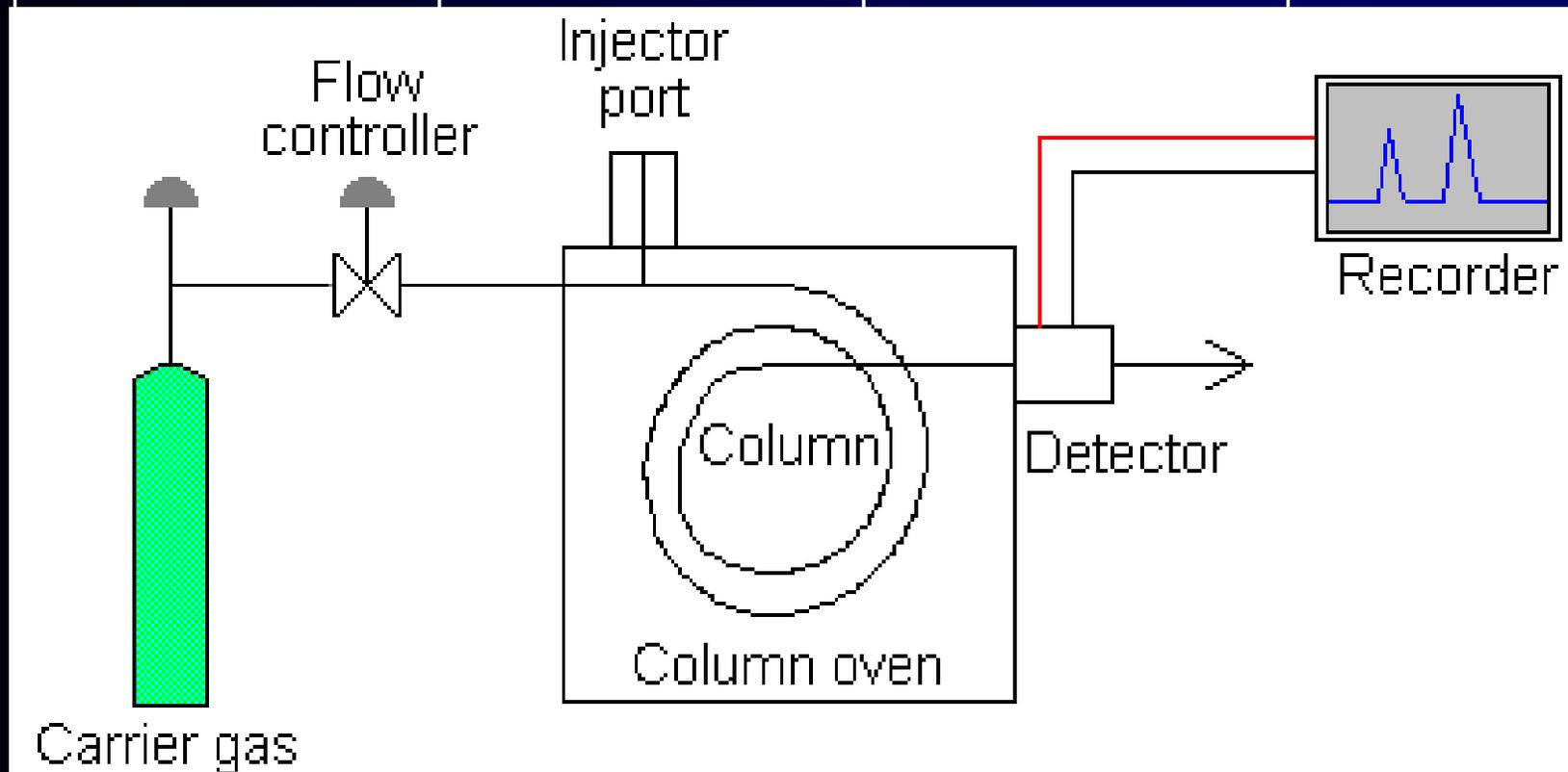
GC: Schematischer Aufbau

Reservoir für
mobile Phase

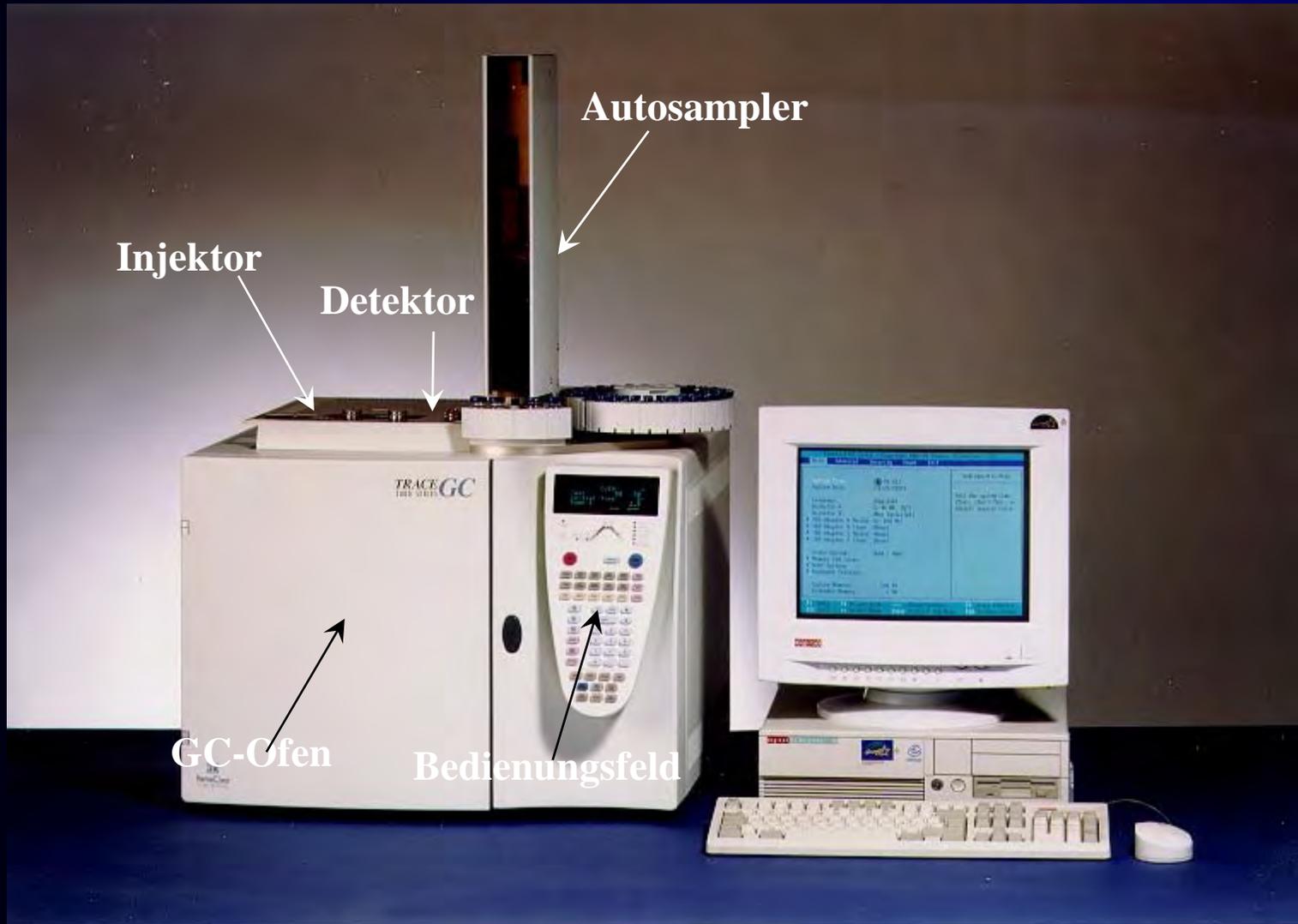
Probenaufgabe

Chromatogr.
Trennsäule

Detektor
Schreiber, EDV

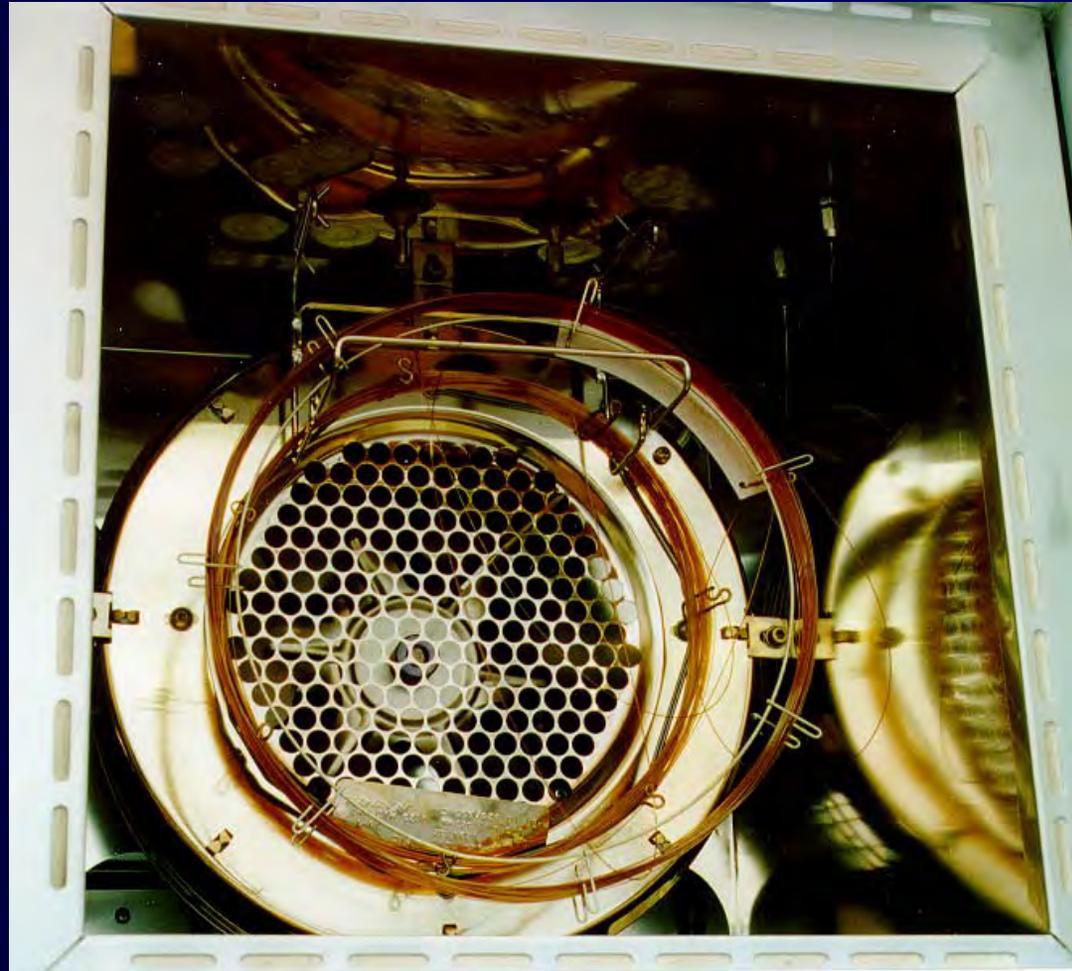


Gaschromatograph



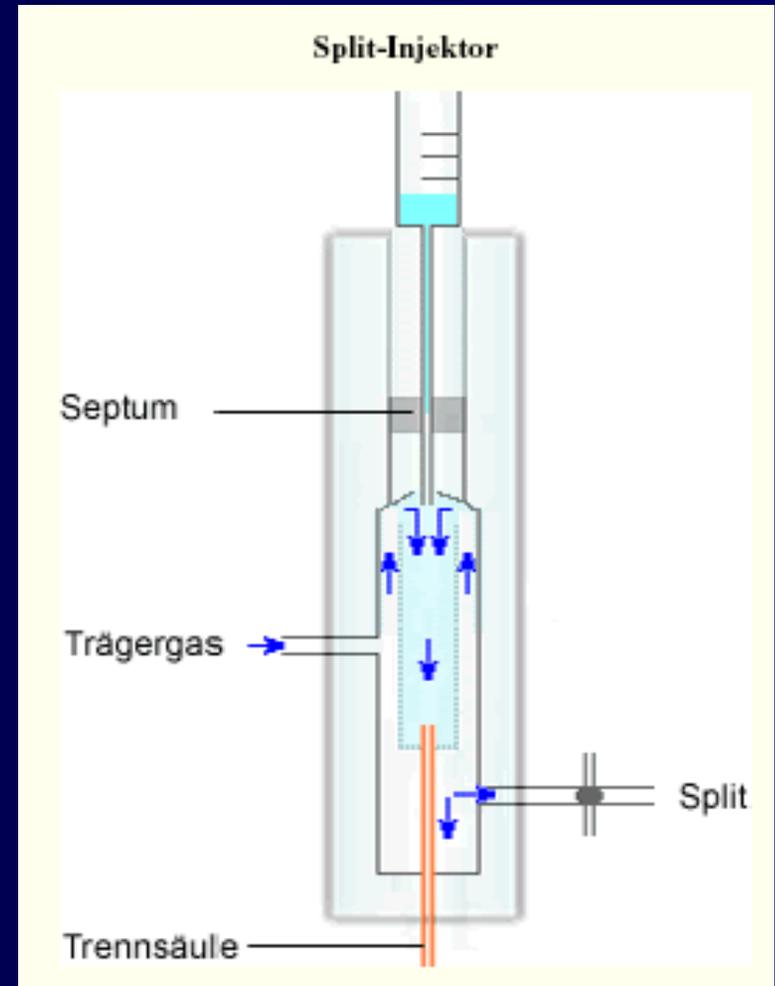
Quarzglas-Kapillaren im GC-Ofen

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



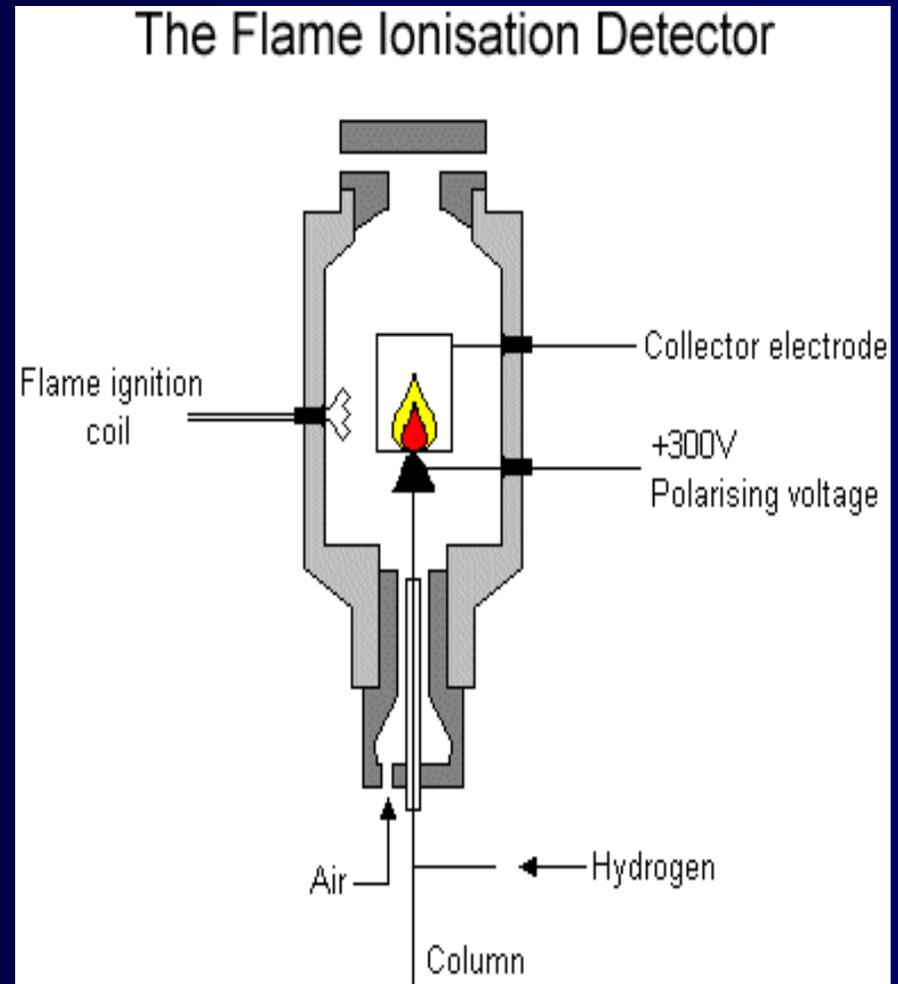
Split-/Splitless-Injektor

- Injektion mit Spritze durch Septum (etwa 1 μ l)
- 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



GC-Anwendung: Toxikologie

Blutalkohol, Methanol-Vergiftung

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

Haiti: 15 Personen an Methanolvergiftung gestorben

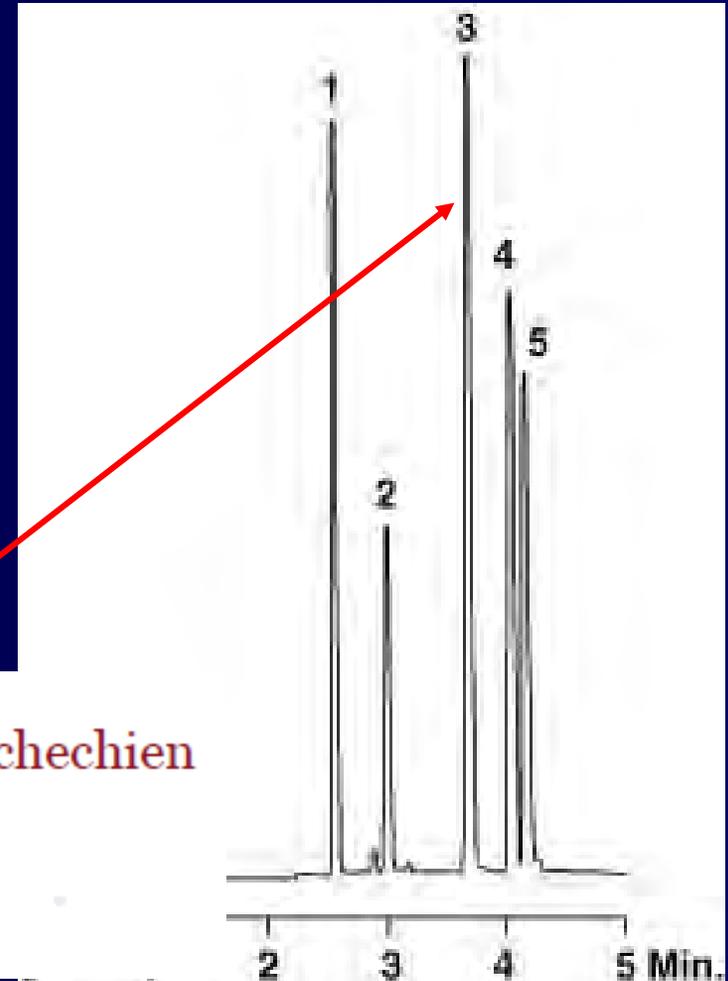
PANSCHER-PROZESS 26.01.2010
Tödlicher Schnaps im Urlaubshotel

... 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 **Gesundheitsgefährdung**

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 Herkunftsnachweis: Sie können giftiges Methanol enthalten.



Methanol-Vergiftung, Behandlung

Ethanol =ADH=> Acetaldehyd =langsam=> Essigsäure (=>Citratzyclus CO₂, H₂O)

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

Isopropanol =ADH=> Aceton

Therapie:

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

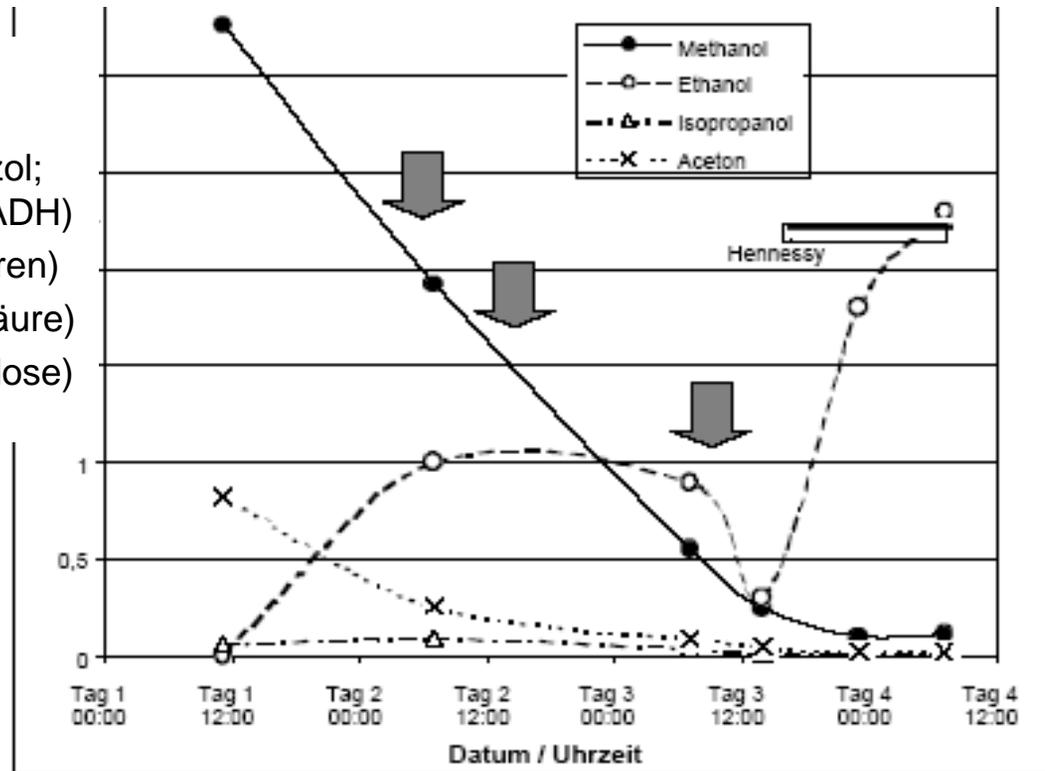


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentrationen von Methanol, Ethanol, Isopropanol und Aceton



Hämodialyse

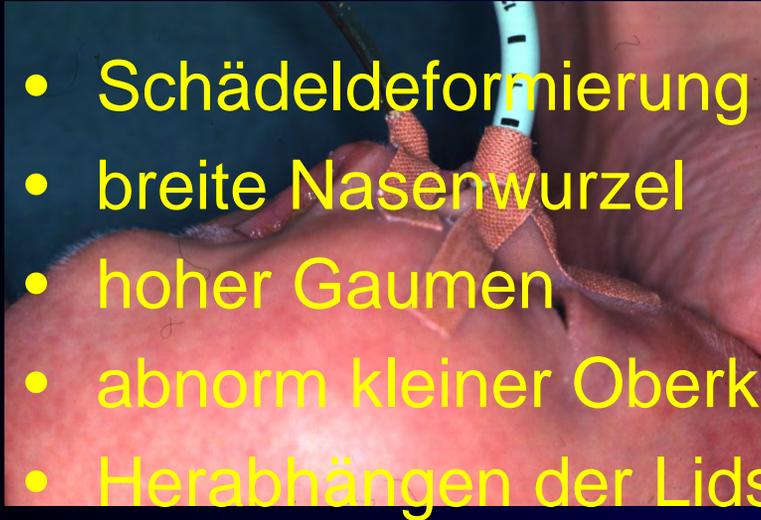


Ethanolzufuhr durch orale Gabe von Cognac (Hennessy)

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

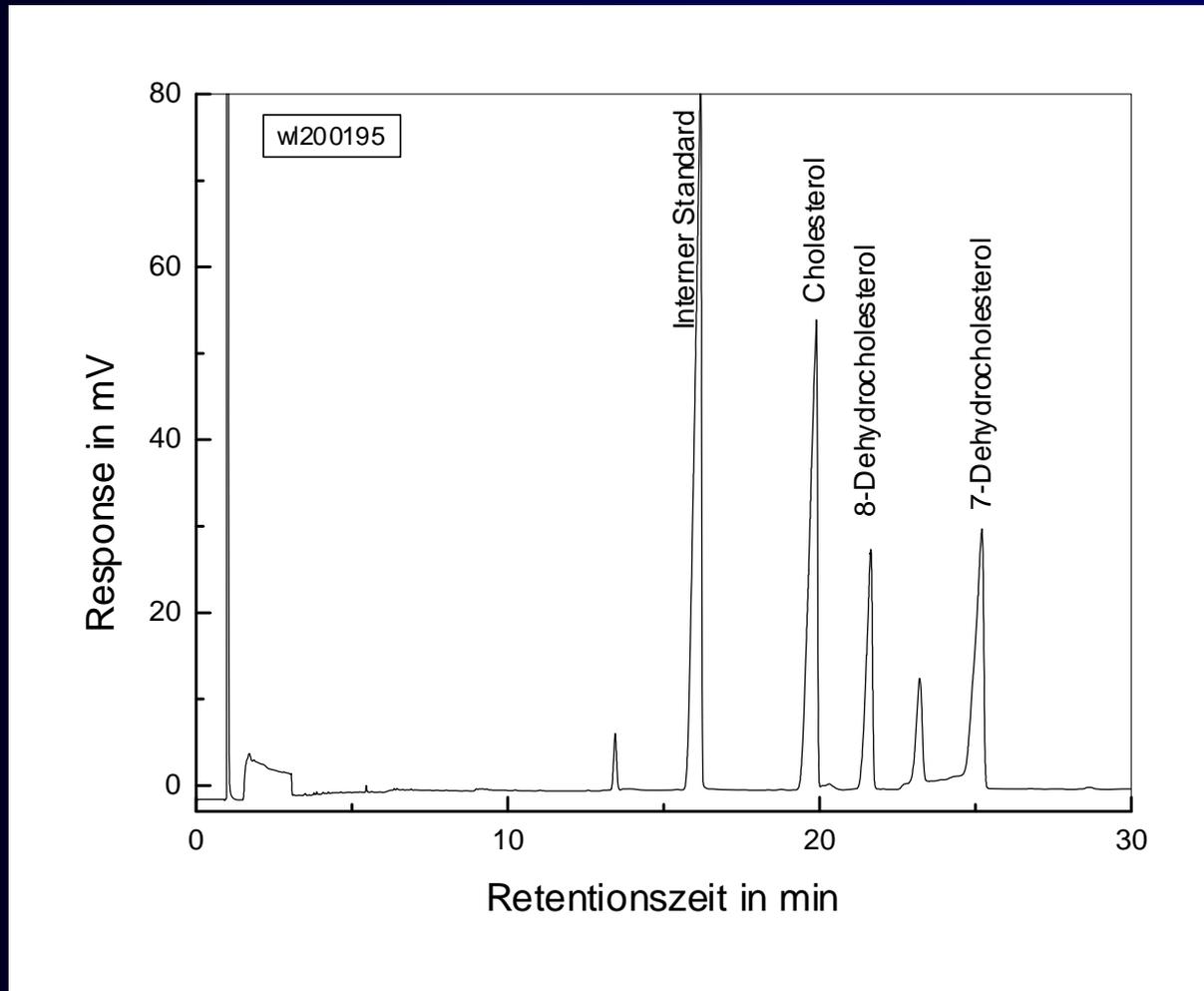
- SLO-Syndrom

- vererbbarer Defekt in der Cholesterolbiosynthese
- schwere Missbildungen
- Cholesterin stark erniedrigt
- 7-Dehydrocholesterin (7-DHC) und 8-DHC stark erhöht (Marker)

- Analytik

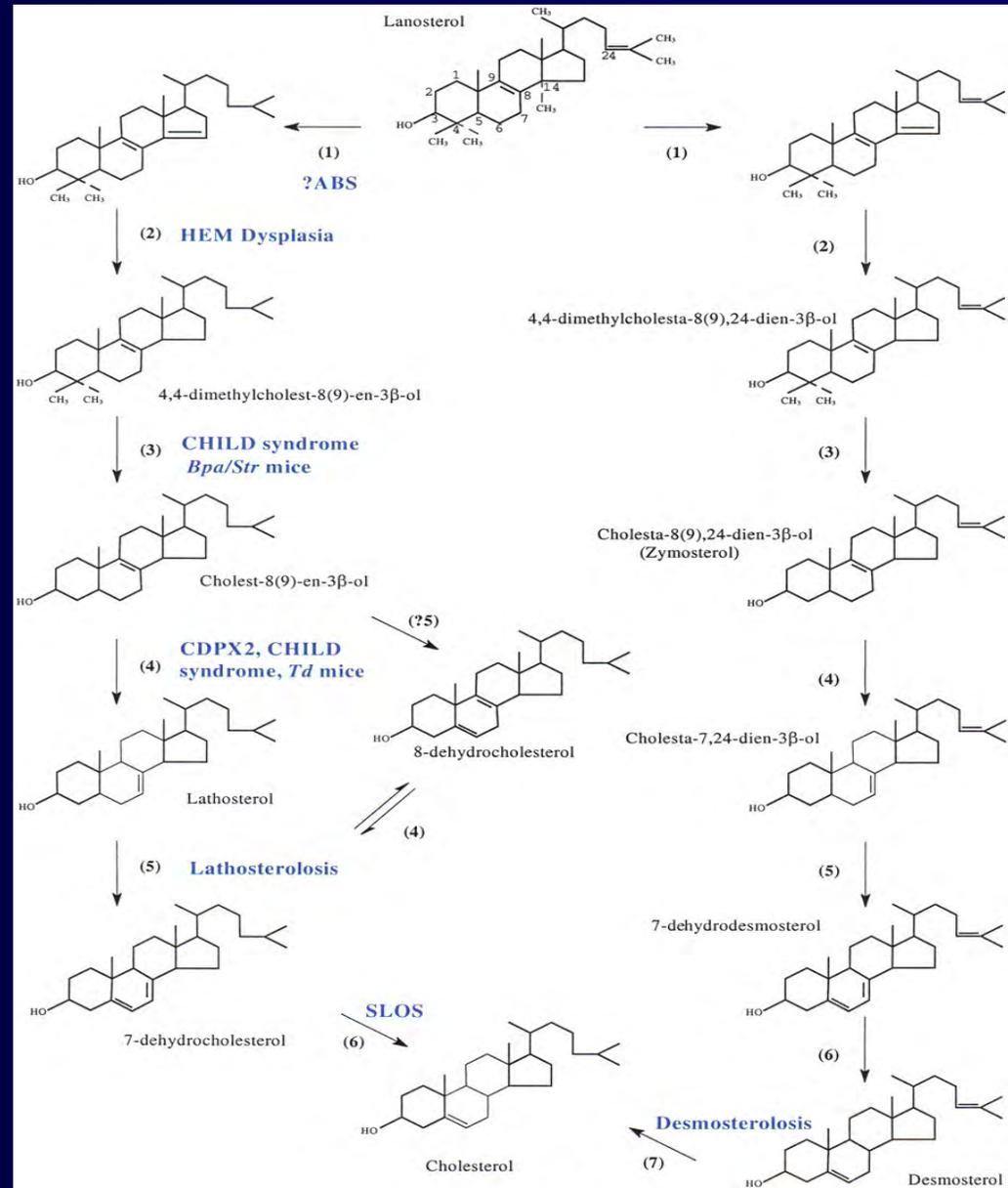
- Routine Cholesterin-Analytik ungeeignet
- GC zur Quant. von Cholesterin, 7-DHC, 8-DHC
- 24 Fälle seit 1995 hier entdeckt, davon 2 pränatal

SLO: GC-Chromatogramm



Cholesterinvorläufer & Defekte

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



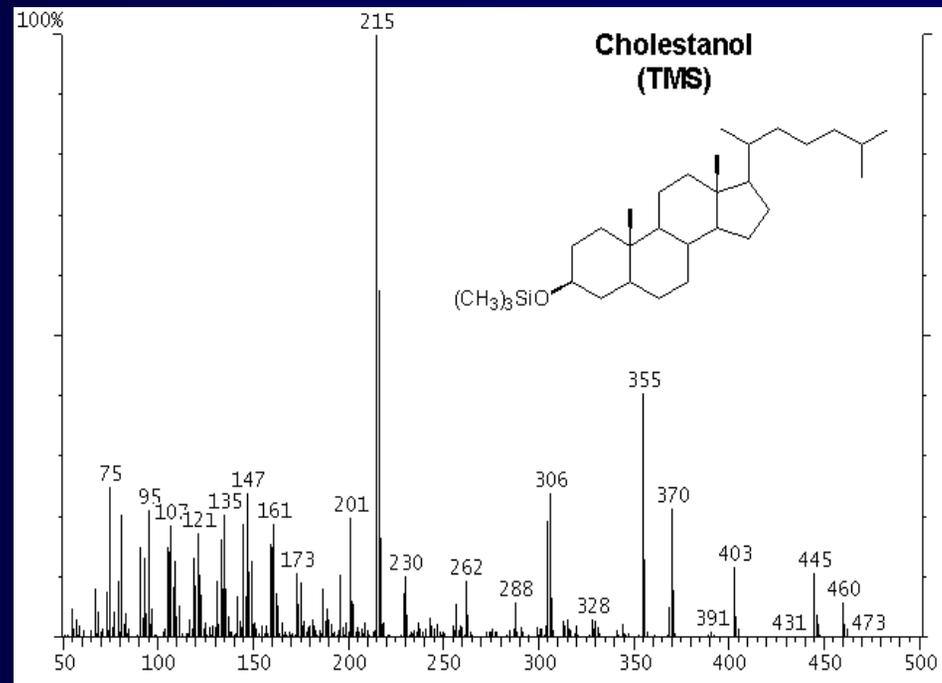
Gliederung

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-Massenspektrometrie)
 - 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

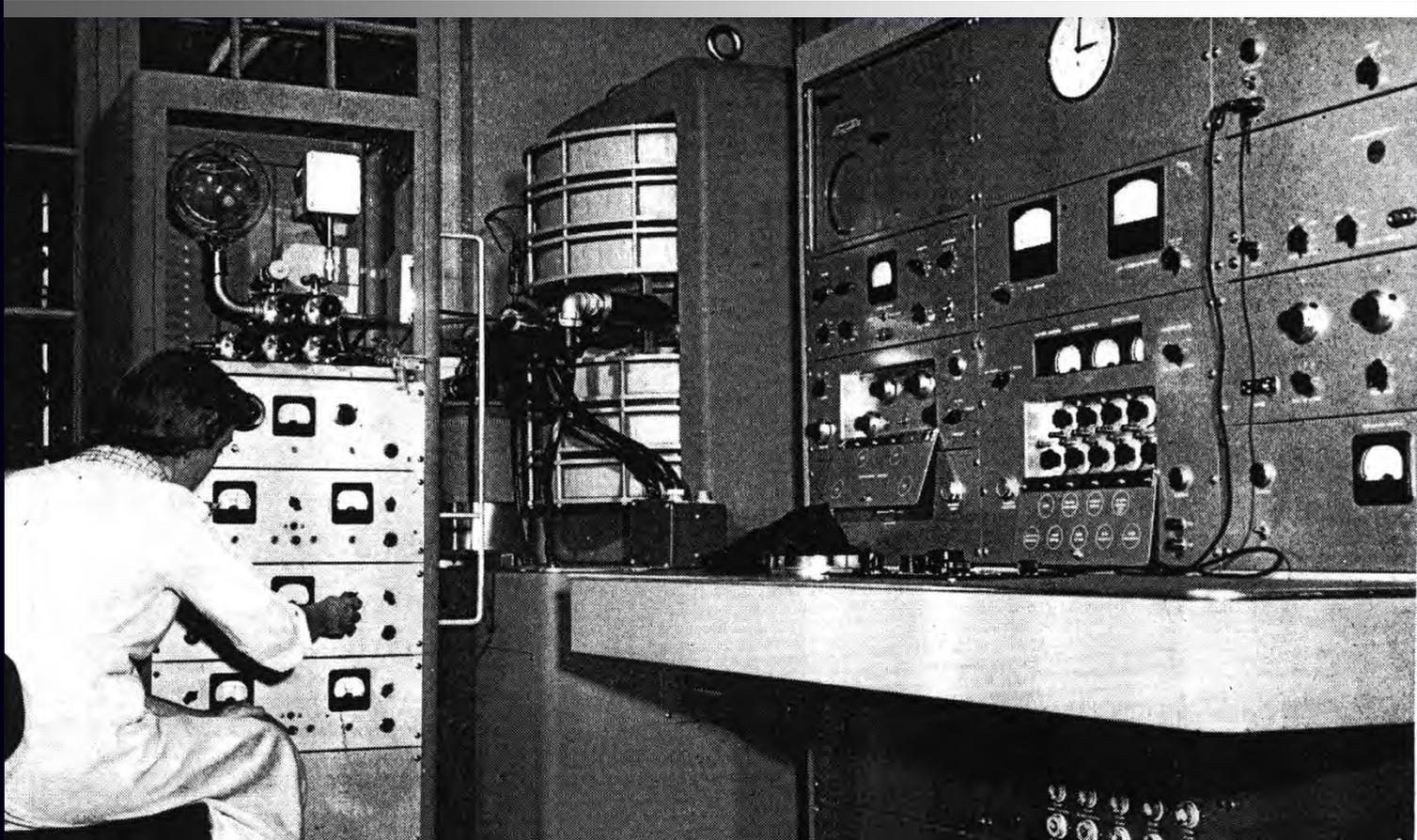


Warum GC (oder HPLC) + MS?

- 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

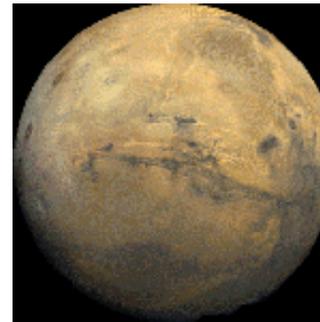
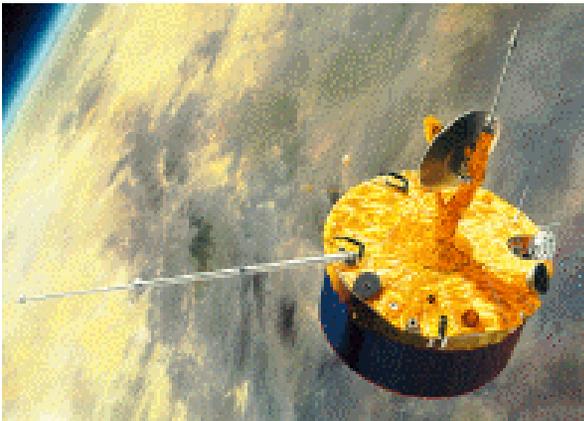
DIE 50ER JAHRE - KOMMERZIALISIERUNG



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



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



GC/MS heute



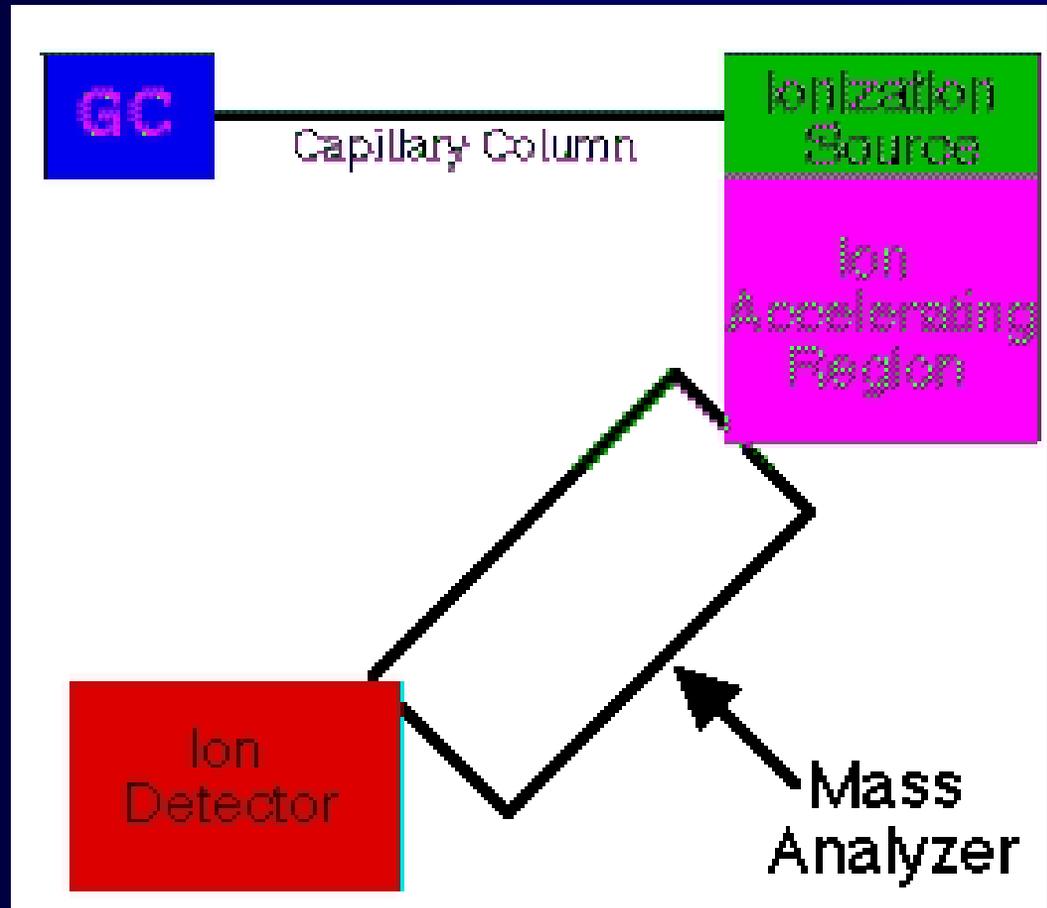
GCMS-System „QP2010Ultra“; Abb.: Fa. Shimadzu, 2010

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**

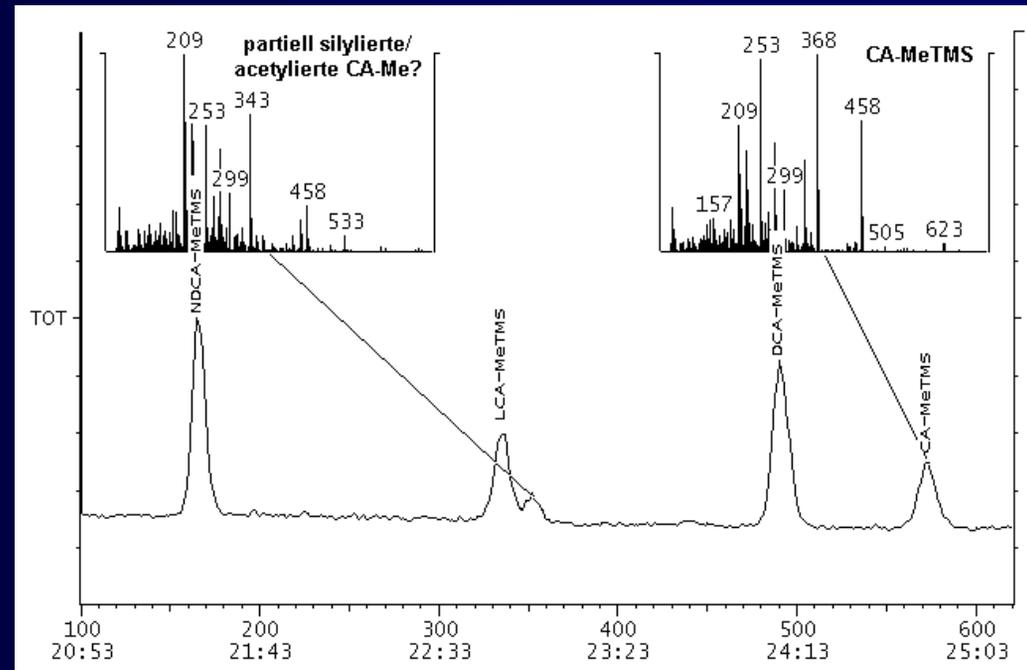
GC/MS: schematischer Geräteaufbau

- 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



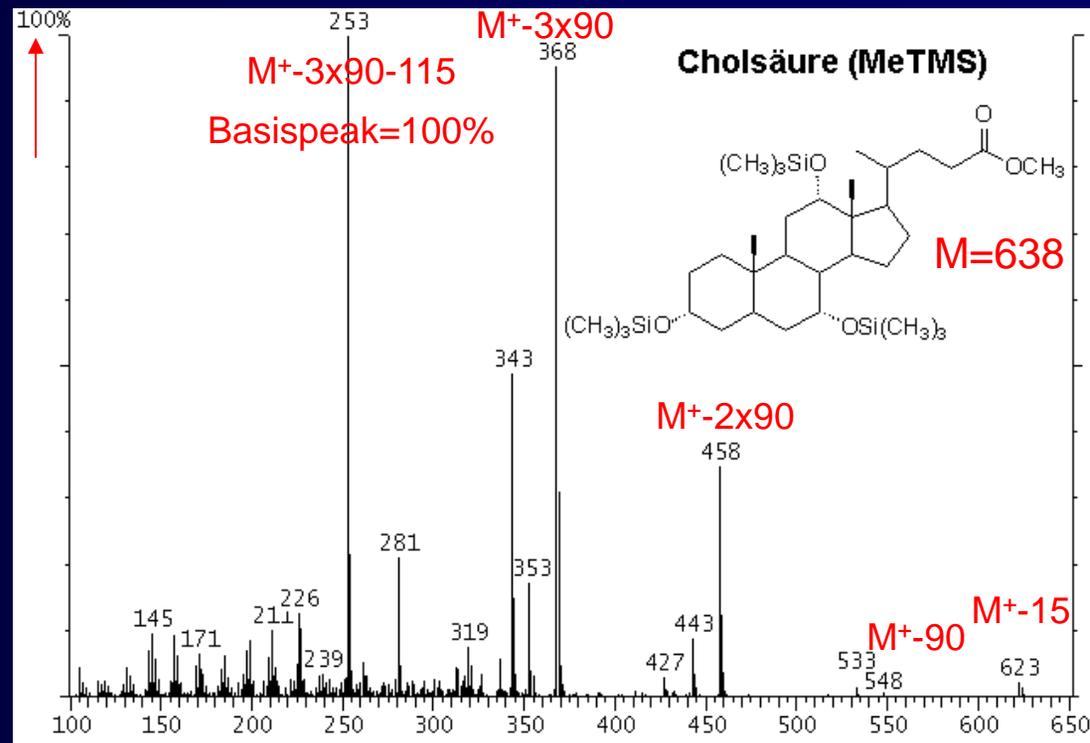
Auswertung: „Chromatogramm“

- 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

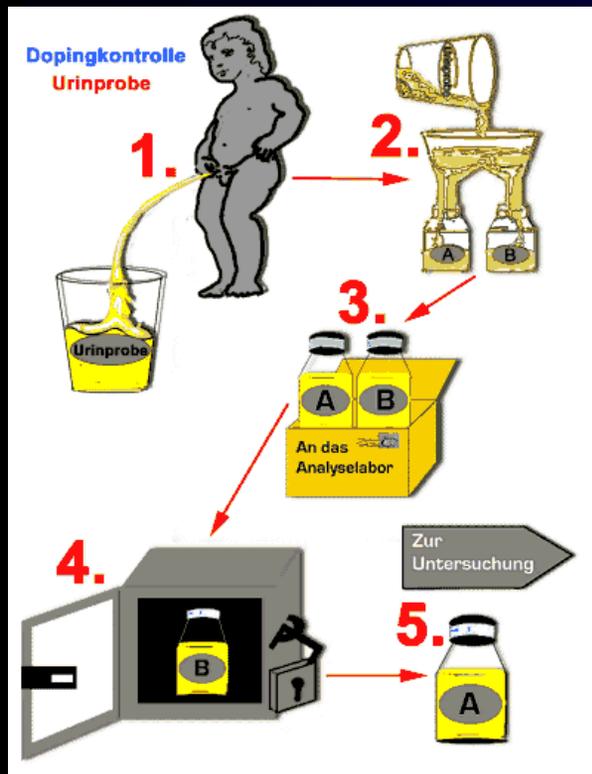


GC/MS: Dopingkontrolle

Urin

Isolierung

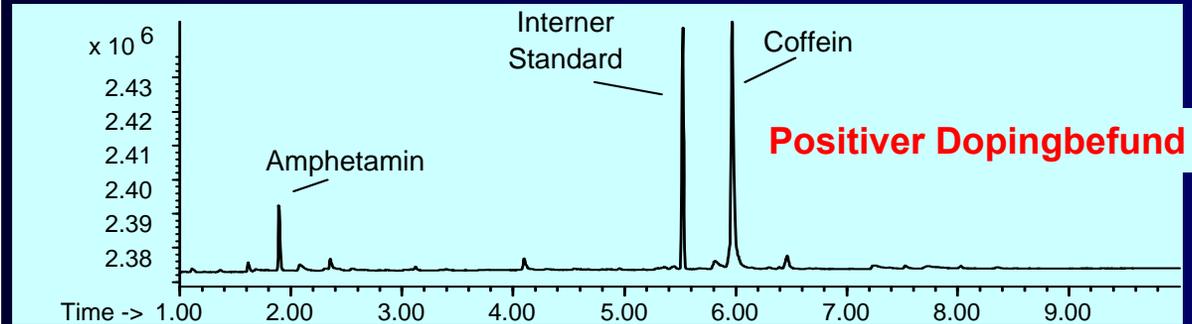
GC/MS-Analyse



Labor
Analyse



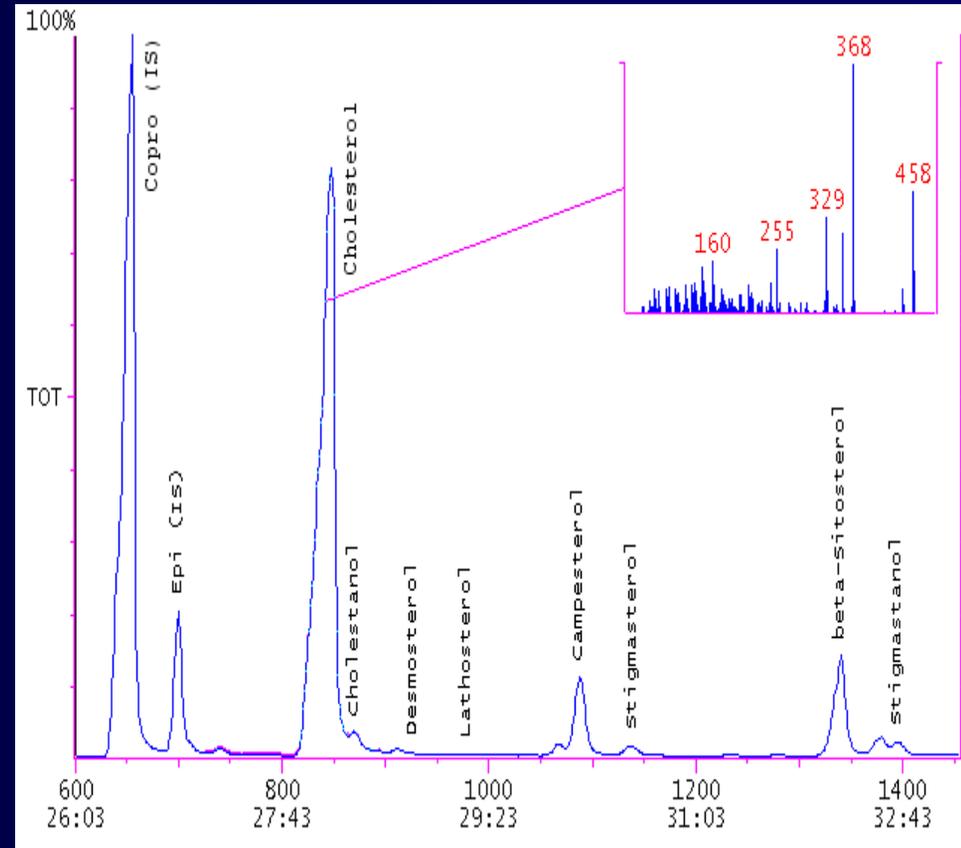
GC/MS-Gerät



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, 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



LC/MS

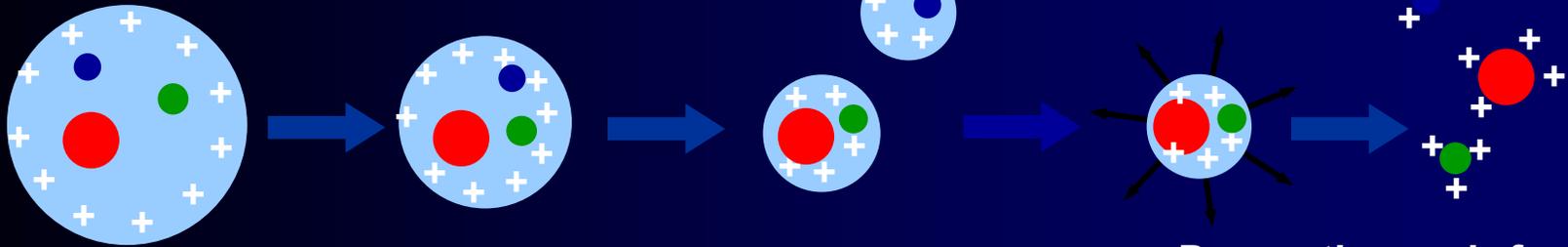
- HPLC (LC)
 - Chromatographische Trennung
- MS
 - Problem: Lösungsmittel
 - Ionisation: Elektrospray (ESI)
 - Massenspezifische Trennung
 - „Sanfte Ionisierung“
 - Analyse großer Moleküle und Proteine



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

LCMS:Elektrospray-Ionisierung (ESI)

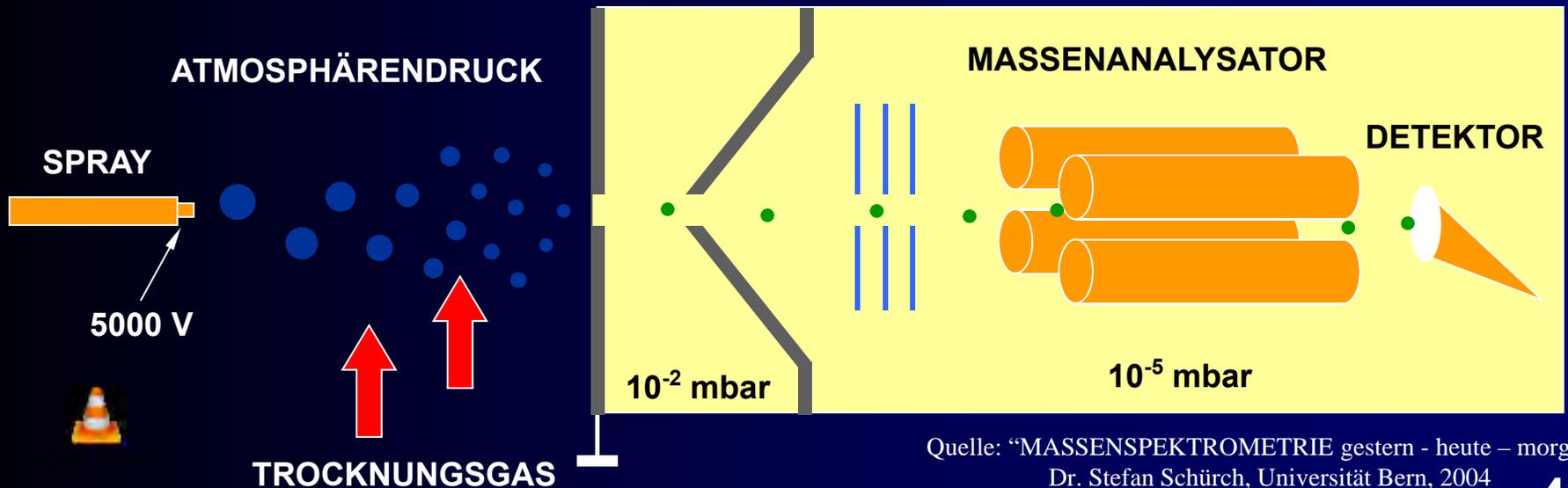
Protonen auf Tropfen-Oberfläche



Verdampfen des Lösungsmittels

Rayleigh-Grenze
⇒ Coulomb-Explosion

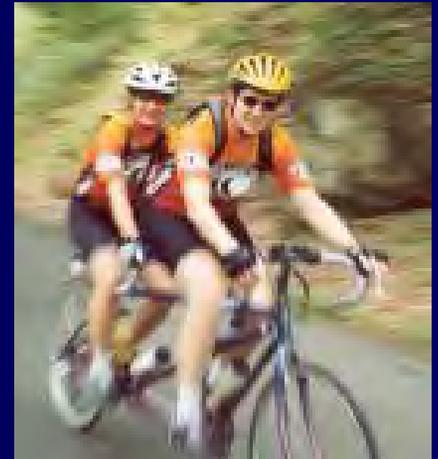
Desorption mehrfach geladener Ionen durch selbst erzeugtes elektrisches Feld



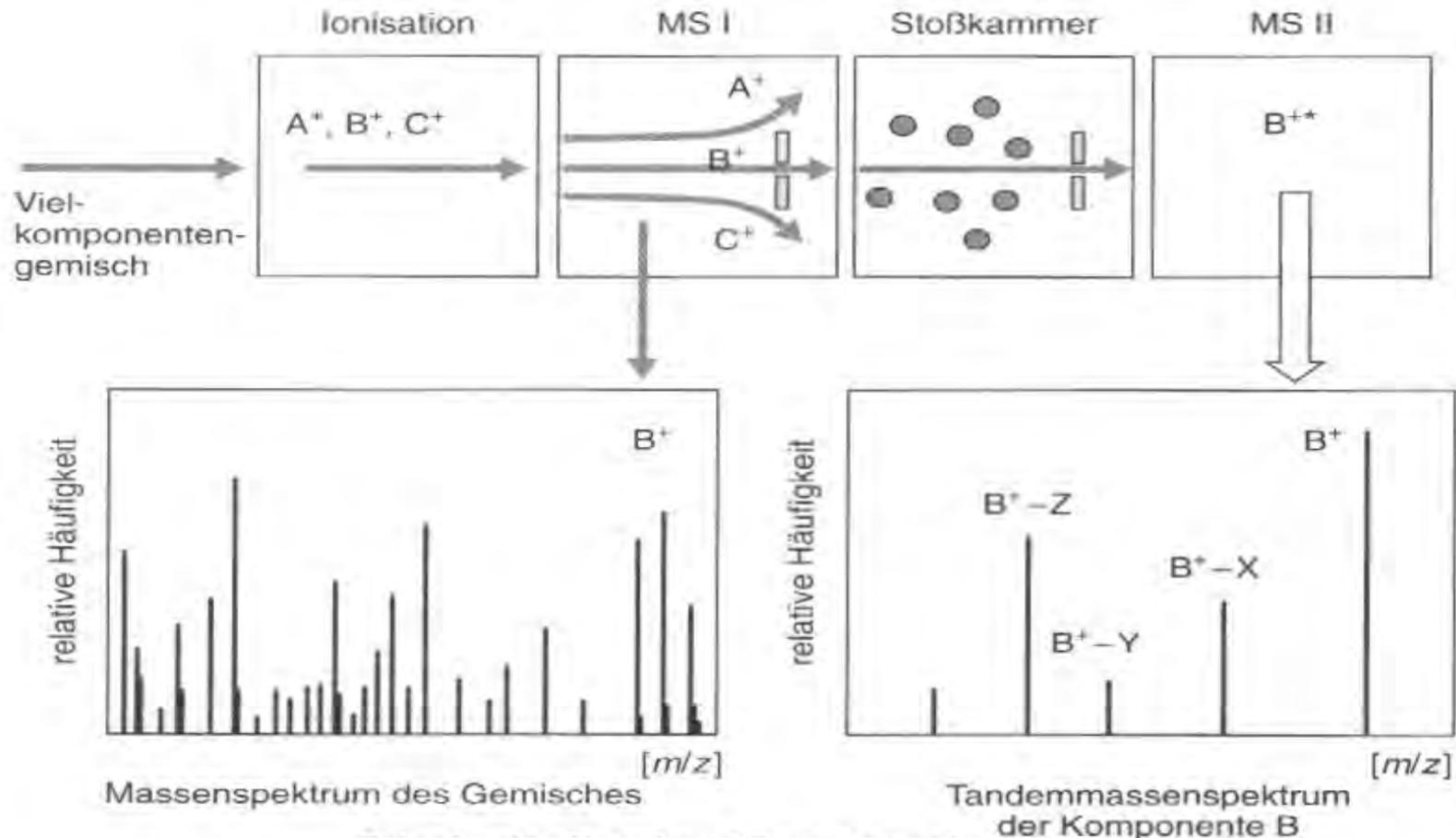
Quelle: "MASSENSPEKTROMETRIE gestern - heute - morgen";
Dr. Stefan Schürch, Universität Bern, 2004

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



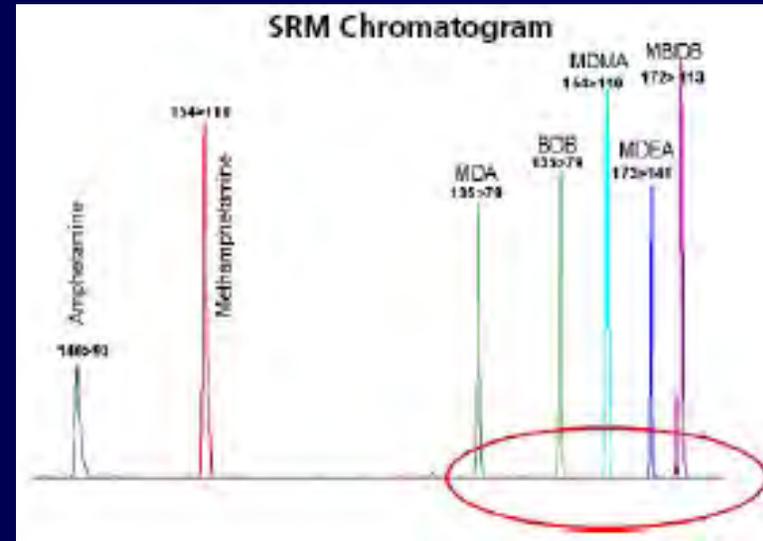
Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie
(aus Inst. Analytische Chemie, K. Cammann, Spektrum 2001)

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)

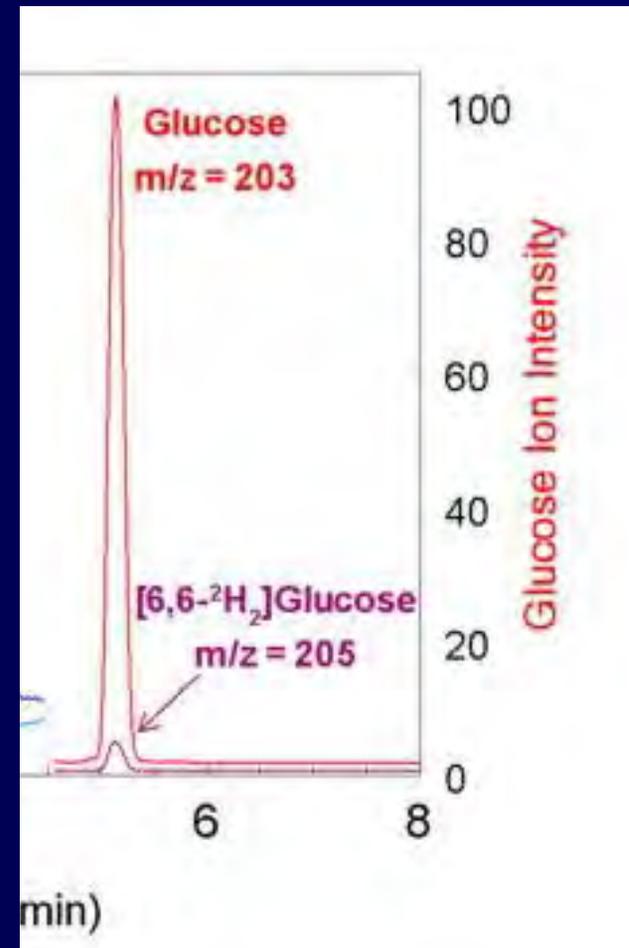
Detection Limits

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

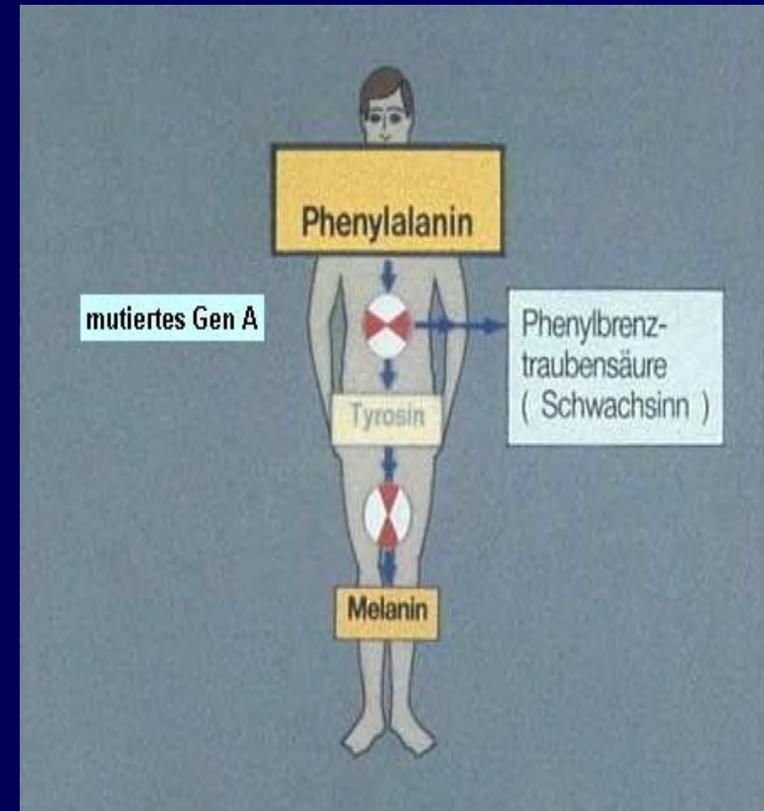


Drug	Range (µg/l)	Lower limit of quantification(µg/l)
CsA	25-900	3,9
Everolimus	2-40	0,395
Tacrolimus	2-40	1,003
Sirolimus	2-50	0,997

Analyt	Summenformel	Exakte Masse (g/mol)	MRM
Cyclosporin A	$C_{28}H_{31}N_{11}O_{12}$	1201,8	1219,9 → 1202,8
Cyclosporin A-d ₄	$C_{28}H_{27}D_4N_{11}O_{12}$	1205,8	1223,9 → 1206,8
Everolimus	$C_{33}H_{41}NO_{14}$	957,6	975,6 → 908,5
Everolimus-d ₄	$C_{33}H_{37}D_4NO_{14}$	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	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	803,5	821,5 → 768,6
Tacrolimus- ¹³ Cd ₂	$C_{34}^{13}CH_{47}D_2NO_{12}$	806,5	824,5 → 771,6

MS/MS: Neugeborenen-Screening

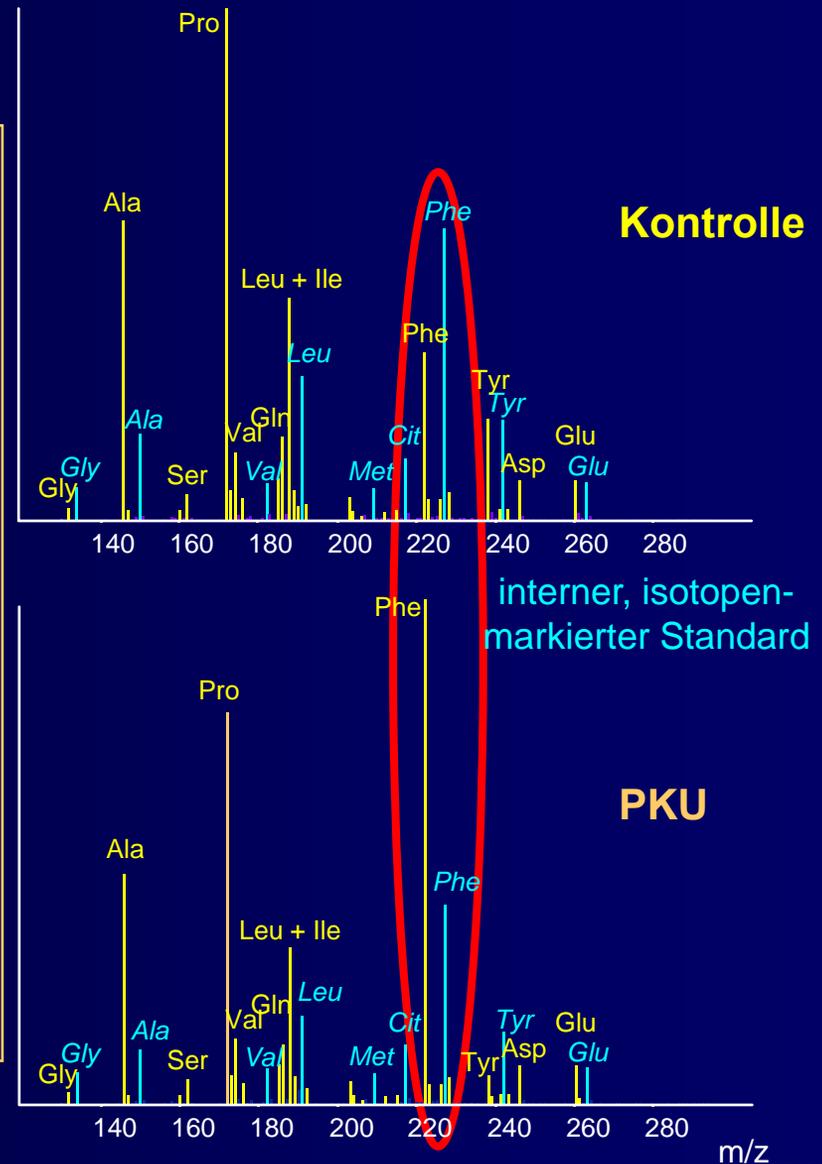
- Phenylketonurie (PKU)
- Ahornsirupkrankheit (Leu, Ile, Val)
- Homocystinurie
- Glutarsäure Acidämie
- Methylmalonsäure Acidämie
- Propionsäure Acidämie
- Tyrosinämie
- Nicht-ketotische Hyperglyzinämie
- Argininbernsteinsäure-Krankheit
- Hyperprolinämie
- Hypermethioninämie



Neugeborenen-Screening: PKU

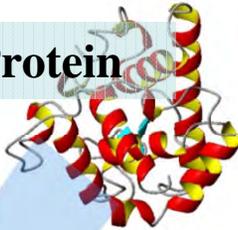
Präparation und MS/MS-Analyse

- **Blutspot auf Filterpapier** (3 mm \varnothing)
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

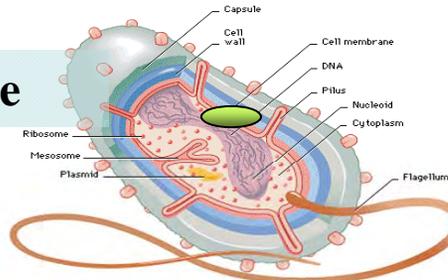


„Proteomics & Genomics“

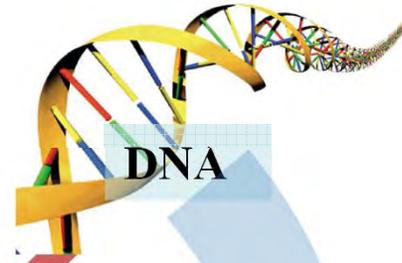
Protein



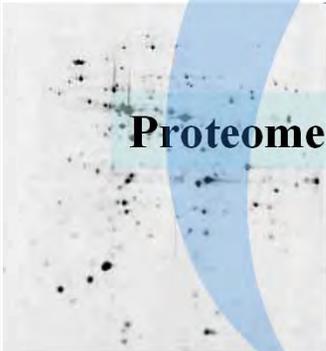
Zelle



DNA

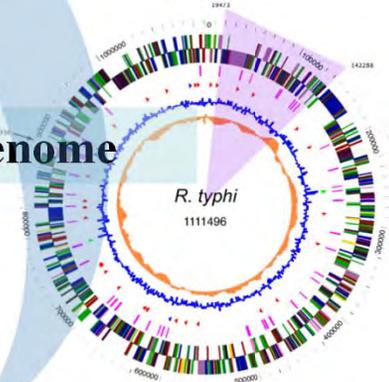


Proteome

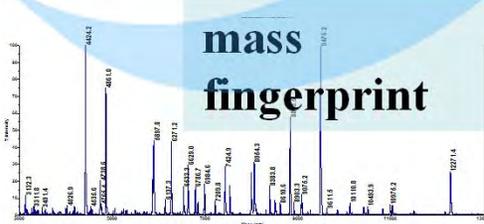


Spezies
Definition & Bestimmung

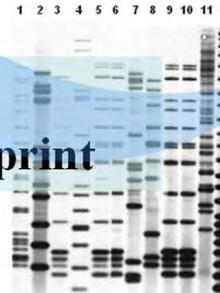
Genome



mass
fingerprint



DNA
fingerprint



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

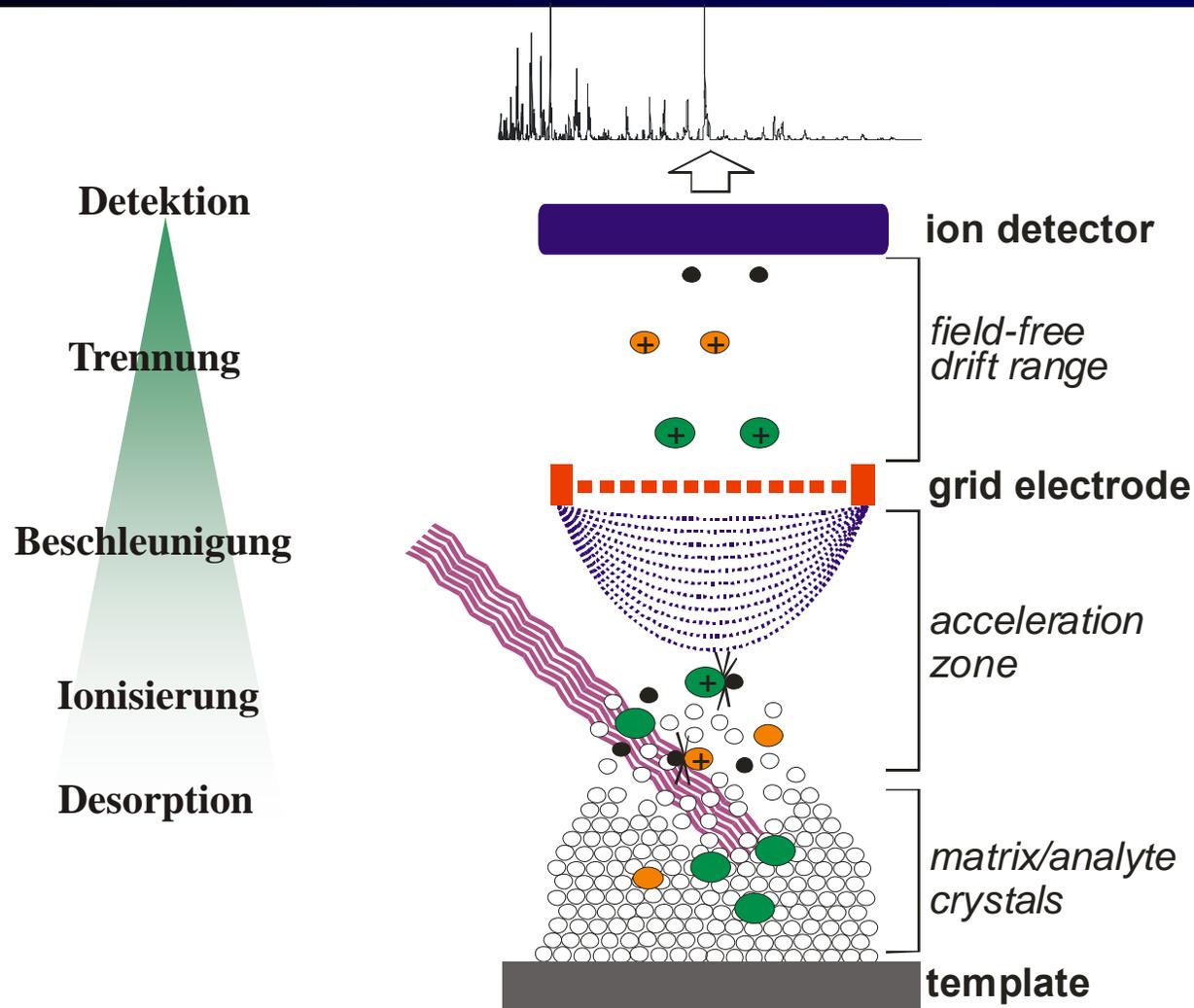
Institutssekretariat:
Robert-Koch Str. 31
D-48149 Münster
Tel.: +49(0)251/83 -55100, -55104
Fax.: +49(0)251/83 -55121



- **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



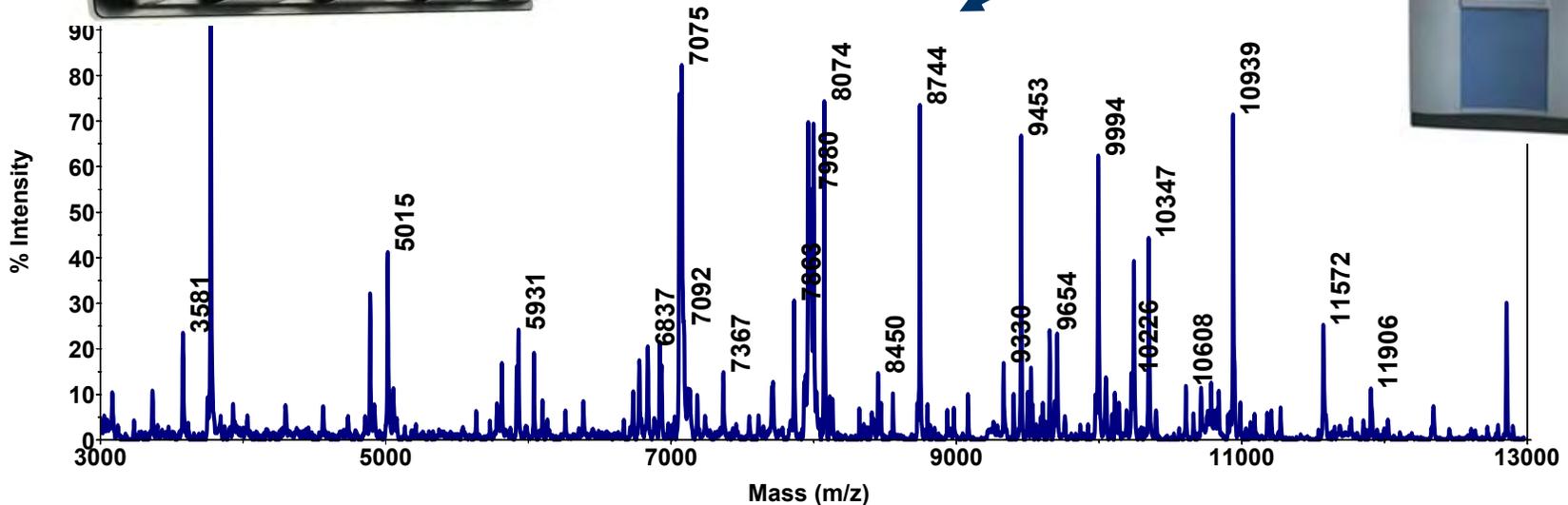
MALDI-TOF-MS Analyse



automated spectrum acquisition ~60 sec

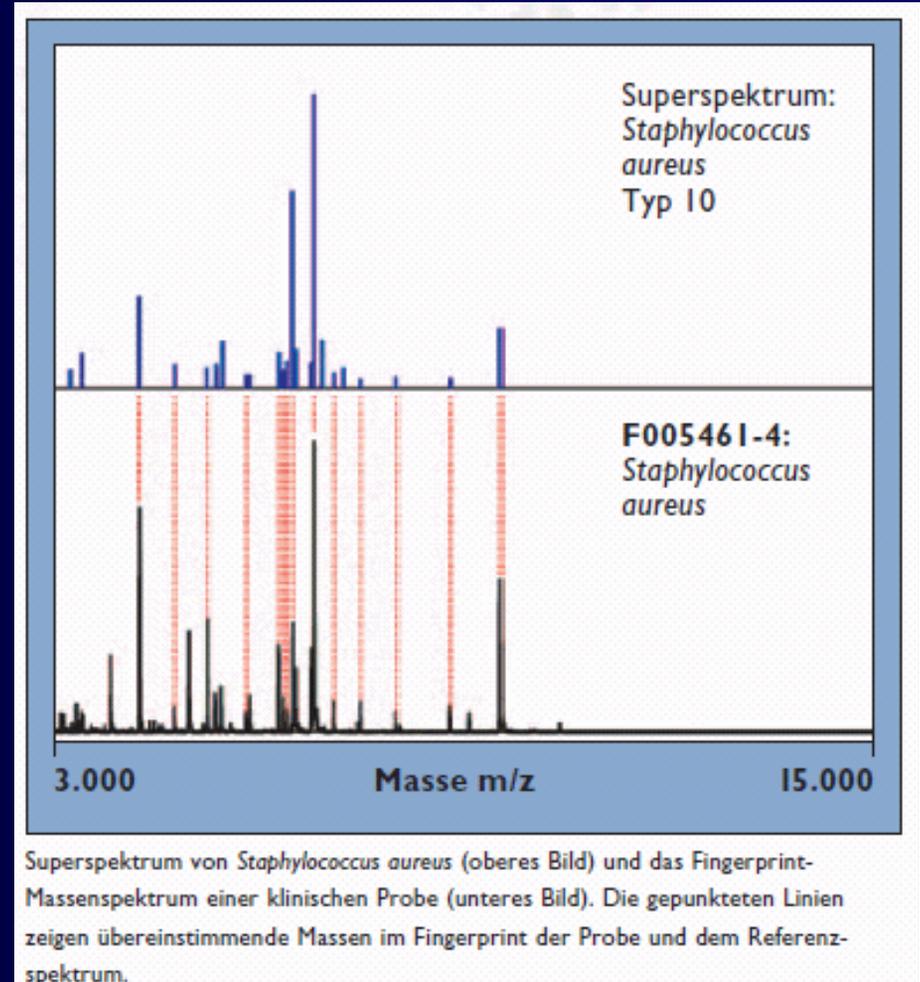
ionisation of intact proteins and
molecular weight measurement

(Abb. : Fa. Shimadzu)



Mikrobiologie: Identifizierung von Keimen

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



ENDE

Herzlichen Dank fürs Zuhören!