

Analytische Chemie 2014/2015

Forderungen nach höherer Geschwindigkeit und die Komplexität der Fragen geben der analytischen Chemie neue Impulse. So nutzt die Prozessanalytik gepulste Ramanspektrometer, die Elemente Arsen und Quecksilber dominieren die Forschung in der Speziesanalytik, und die Omics-Techniken entwickeln sich zu Multi-Omics-Ansätzen. Ambiente MS-Techniken benötigen keine aufwendige Probenvorbereitung, multidimensionale Trenntechniken werden verstärkt in der Routine eingesetzt, und Chip-basierte Trennungen fallen durch Schnelligkeit auf. Molekülspektroskopie und Massenspektrometrie dominieren die bildgebenden Verfahren, und die Lateralauflösung der ToF-Sekundärionenmassenspektrometrie hat sich bei Oberflächenuntersuchungen verbessert.

Prozessanalytik: Spektroskopie und Miniaturisierung

◆ Die Prozessindustrie bewertet die Weiterentwicklung einiger Messaufgaben und Techniken als besonders wichtig.¹⁾ Dazu zählen Infrarot-Kaskadenlaser, die Online-Analyse von Partikeln und Emulsionen, neuartige NIR/MIR-Spektroskopiemodule und deren Miniaturisierung sowie die Ramanspektroskopie.

Quanten-Kaskadenlaser (QCL) im mittleren Infrarot (MIR) sind bereits am Markt erhältlich. Seit Kurzem gilt dies auch für Interband-Kaskadenlaser (ICL), die den Spektral- und somit den Messkomponentenbereich erweitern. Die Lichtquellen werden insbesondere für die Gasanalytik genutzt. Prozessanalytik nutzt bereits vereinzelt QCL-basierte Systeme, beispielsweise um im Kfz-Prüfstand Abgase zu messen oder um Spurengase zu detektieren. Besonders interessant sind erste Entwicklungen von Laserarrays.²⁾

Die Partikelmesstechnik wurde auf die Echtzeitanalyse von Mehrphasensystemen erweitert. Partikel wie Tropfen, Körner, Zellen oder Gasblasen müssen in vielen laufenden Prozessen präzise vermessen werden. Kürzlich entwickelte Tech-

niken wie bildgebende Sonden³⁾ mit integrierter intelligenter Bildanalyse oder Photonendichtewellen-Spektroskopie (PDW)⁴⁾ sind gerade auf dem Weg von der Labor- zur Prozessmethode. Erste Sonden wurden bereits für den Chemiebereich nach den ATEX-Richtlinien der EU zum Explosionsschutz zertifiziert.

Gepulste Ramanspektrometer akkumulieren das Ramansignal mit schnellen optischen Schaltern im Pikosekundenbereich, bevor langlebige Fluoreszenz angeregt wird. Damit lassen sich stark fluoreszierende Materialien untersuchen, die bislang nicht zugänglich waren.⁵⁾ Weitere Entwicklungen, die Shifted excitation Raman difference spectroscopy (SERDS)⁶⁾ oder die Turbidity corrected Raman spectroscopy (TCRS), sind besonders für biologische Anwendungen interessant.

Bei NIR/MIR-Spektroskopiemodulen gibt es neue Techniken der dispersiven Einheit auf der Basis von Fabry-Perot-Interferometern,⁷⁾ 2-D-Spektroskopie-Modulen, geätzten schwingenden Si-Spiegeln (Kassenscanner), linearen Verlaufsfiltern oder Mikro-FT-Einheiten. Sie machen somit eine preiswertere Gesamtlösung möglich, da teure, klassische FT-NIR-Spektrometer für viele Anwendungen nicht mehr

erforderlich sind. Hinzu kommen neuartige Lichtquellen, sodass die Spektroskopiemodule miniaturisiert werden können, ohne dass die Leistungsfähigkeit abnimmt. Kleine Sensoren werden dann bei Kommunikation oder Energieversorgung selbstständiger – etwa durch Energy Harvesting, also die Gewinnung kleiner Mengen elektrischer Energie aus Umgebungsquellen wie Temperaturprofilen oder Vibrationen.⁸⁾

Prozesssensoren haben zu allererst die Aufgabe, Prozessinforma-

GDCh-Kurs
Einführung in die HPLC
 Basiskurs mit Experimenten (308/16)
 20. - 23. Juni 2016, Nürnberg
 Leitung: Prof. Dr. Joachim Kinkel

Highlights:
 Grundlagen der HPLC
 Apparatur und Bedienung
 Methoden- und Säulenwahl
 Strategien zur optimalen Trennung
 Detektieren und Quantifizieren

Anmeldung/Information:
 Tel.: 069/7917-364
 E-Mail: fb@gdch.de
 www.gdch.de/fortbildung

tionen zu generieren. Gegenwärtig ist der Aufwand dafür hoch, denn die physikalischen und chemischen Informationen werden in vielen Fällen nicht direkt gemessen, sondern verbergen sich in Rohdaten, zum Beispiel in einem optischen Spektrum. Kalibrierungen können für komplexe Sensoren teilweise mehr Kostenaufwand bedeuten als das Messgerät selbst. Großen Nutzen bringen hier Konzepte zur modellbasierten Prozessführung, zum Soft Sensing oder zur Selbstkalibrierung.⁹⁾

Michael Maiwald, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin

Literatur

- 1) 53. Tutzing-Symposium, Prozessanalytik – Werkzeug oder Zukunftstechnologie?, Dechema, 12.–15.10.2014, Evangelische Akademie Tutzing am Starnberger See.
- 2) M. Razeghi, Q. Y. Lu, N. Bandyopadhyay et al., Optics Express 2015, 23, 8462–8475.
- 3) L. Hohl, N. Paul, M. Kraume, Chem. Eng. Process 2016, 99, 149–154.
- 4) R. Hass, M. Münzberg, L. Bressel, O. Reich, Appl. Optics 2013, 52, 1423–1431.
- 5) J. Blacksberg, E. Alerstam, Y. Maruyama, C. J. Cochrane, G. R. Rossman, Appl. Optics 2016, 55, 739–748.
- 6) M. Tesfay Gebrekidan, C. Knipfer, F. Stelzle, J. Popp, S. Will, A. Braeuer, J. Raman Spectrosc. 2016, 47, 198–209.
- 7) J. Antila, M. Tuohiniemi, A. Rissanen et al., Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2014, online, DOI: 10.1002/9780470027318.a9376
- 8) M. Maiwald, ATP-Edition 2016, 58, 28–36.
- 9) S. Lucia, T. Finkler, S. Engell, J. Process Control 2013, 23, 1306–1319.

Speziesanalytik: Arsen und Quecksilber

◆ Die Speziesanalytik bestimmt zu großen Teilen die Fortschritte der Spurenanalytik sowohl in den Lebenswissenschaften als auch bei Umweltproben. Die Ursache liegt im Anspruch der Forschung, nicht nur Elementkonzentrationen in bestimmten Kompartimenten festzustellen, sondern auch die Rolle von Elementspezies in Wirkmechanismen zu verstehen. Dazu wird das gesamte Instrumentarium der analytischen Chemie eingesetzt, von

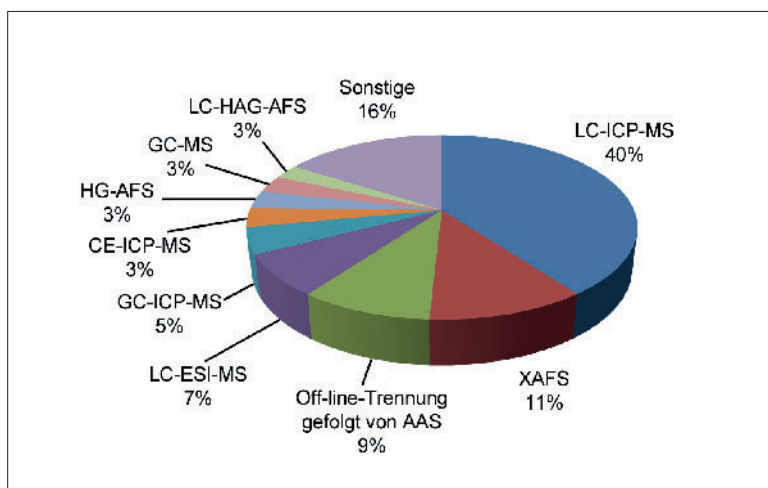


Abb. 1. Techniken der Speziesanalytik in den Publikationen der Jahre 2014 bis 2016.

relativ einfachen spektroskopischen Methoden (UV, IR, NMR), über gekoppelte Techniken (GC-MS, LC-MS, HPLC-ICP-MS) bis zu Großeinrichtungen wie den Synchrotronanlagen (SR-XRF, XANES, EXAFS). In den letzten zwei Jahren war die HPLC mit induktiv-gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (LC-ICP-MS) die am meisten verwendete Technik für die Speziesbestimmung (Abbildung 1).

Während die LC-ICP-MS die ideale Technik für die Speziation flüssiger Proben ist, erfordert die Analyse fester Proben eine Probenvorbereitung. Diese ist problematisch, da sie quantitative Extraktion gewährleisten muss, ohne dabei die Speziation zu beeinflussen. Dies ist kaum sicherzustellen, daher wird für die Analyse von festen Proben häufig die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XANES, EXAFS) ein-

gesetzt, die eine direkte Speziation erlaubt.

Gemessen an den Publikationen der letzten beiden Jahre (Abbildung 2) war das beherrschende Element der Speziesanalytik mit großem Abstand Arsen. Dies ist nicht verwunderlich, denn die komplexe Chemie des Arsens hat bisher zur Identifizierung von über 100 natürlich vorkommenden Verbindungen geführt. Einen kritischen Übersichtsartikel zur Arsenpeziation haben Maher et al. veröffentlicht,¹⁰⁾ der in die Thematik bei Umwelt, biologischen Proben und Lebensmitteln einführt. Da anorganische Arsenspezies krebserregend sind, wird eine Novellierung der Lebensmittelgesetze seit Jahren erwartet.¹¹⁾

Beunruhigende Gehalte an anorganischem Arsen wurden insbesondere in Reis, Reisgetränken¹²⁾

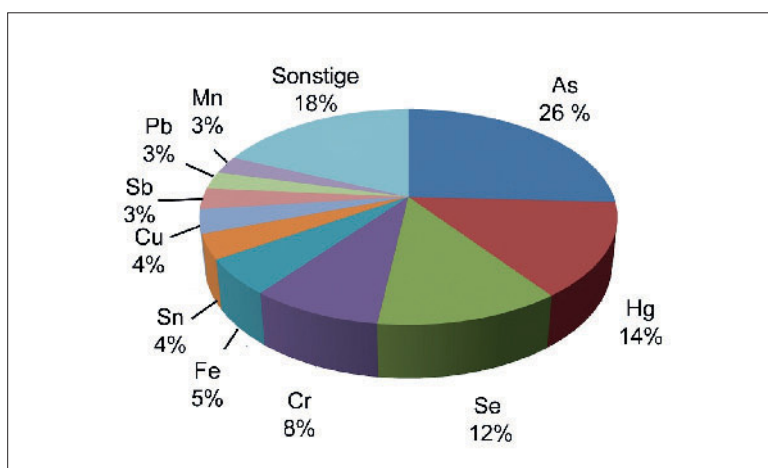


Abb. 2. Verteilung der Elemente in den Veröffentlichungen zum Thema Speziation der Jahre 2014 bis 2016.

und essbaren Algen¹³⁾ gefunden. Inwieweit die erst kürzlich entdeckten Arsenolipide toxikologisch relevant sind, wird noch untersucht. Es gibt inzwischen Hinweise darauf, dass diese im Fett von Fischen gefundenen Verbindungen giftig sind.¹⁴⁾

Das zweithäufigste auf seine Spezies untersuchte Element ist Quecksilber. Durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe steigen seine Anteile in der Umwelt. Das Quecksilber aus diesen anthropogenen Emissionen verbreitet sich global und ist durch seine Giftigkeit ein ernstes Umweltproblem. Mikroben methylieren anorganisches Quecksilber, das dann als Methylquecksilber in die Nahrungskette gelangt. Durch Bioakkumulation und Biomagnifikation kommt es zu toxischen Gehalten im Milligramm-pro-Kilogramm-Bereich.¹⁵⁾ Der Mensch nimmt mit

Meerestieren organisches Quecksilber auf, was seine Gesundheit gefährdet. Für den Metabolismus des Quecksilbers im menschlichen Organismus ist besonders die Frage des Transports über den Blutkreislauf und die Überwindung von Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung. Hogeback et al.¹⁶⁾ identifizierten einige Protein-Quecksilber-Addukte, und Lohren et al.¹⁷⁾ untersuchten Transportphänomene über die Blut-Hirn-Schranke für verschiedene Quecksilberspezies.

Einen Überblick über diese und weitere Themen der Speziesanalytik bietet die News-Sektion des Webportals des Europäischen Virtuellen Instituts für Speziationsanalytik (EVisA).¹⁸⁾

Michael Sperling, Universität Münster und EVisA – European Virtual Institute for Speciation Analysis, Münster

Literatur

- 10) W. A. Maher, M. J. Ellwood, F. Krikowa, G. Raber, S. Foster, J. Anal. At. Spectrom. 2015, 30, 2129–2183.
- 11) A. H. Petursdottir, J. J. Sloth, J. Feldmann, Anal. Bioanal. Chem. 2015, 407, 8385–8396.
- 12) A. J. Signes-Pastor, M. Carey, A. A. Meharg, Food Chem. 2016, 191, 128–134.
- 13) H. N. Lynch, G. I. Greenberg, M. C. Pollock, A. S. Lewis, Sci. Total Environ. 2014, 496, 299–313.
- 14) S. Meyer, G. Raber, F. Ebert et al., Toxicol. Res. 2015, 4, 1289–1296.
- 15) S. Valdersnes, P. Fecher, A. Maage, K. Julshamn, Food Chem. 2016, 194, 424–431.
- 16) J. Hogeback, M. Schwarzer, C. A. Wehe, M. Sperling, U. Karst, Metallomics 2016, 8, 101–107.
- 17) H. Lohren, J. Bornhorst, H.-J. Galla, T. Schwerdtle, Metallomics 2015, 7, 1420–1430.
- 18) www.speciation.net/Linklists/Speciation/News



Messe München

1/2 quer

Seite 499

Instrumentelle Fortschritte und Multi-Omics-Analyse

◆ Holistische Analysetechniken, die Proteome und Metabolome erfassen, wurden auf eine Reihe biologischer und medizinischer Fragen angewandt. Im Mittelpunkt der technischen Entwicklungen stehen Verbesserungen der massenspektrometrischen Instrumentierung und der hochauflösenden ein- und mehrdimensionalen Chromatographie.¹⁹⁾ Wegen der Möglichkeit, Massen akkurat zu bestimmen, geht der Trend zu hochauflösenden Flugzeit- und Orbitrap-Massenanalysatoren. Diese werden in Hybridgeräten mit Vorrichtungen zur Auswahl und Fragmentierung von Vorläuferionen kombiniert, meist Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenanalysatoren. In zwei verschiedenen Gerätekonfigurationen, Hybrid-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer und Hybrid-Quadrupol-Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometer (Abbildung 3), wurden in 70- bis 90-minütigen Analysen zwischen 4000 und 4800 Proteine^{20,21)} aus Hefe beziehungsweise HeLa-Zellen identifiziert.

In der markierungsfreien Quantifizierung von Proteomen wird die datenunabhängige Datenakquisition (data independent acquisition, DIA) mit SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra) angewendet. Zur Messung verwendet

man die Hybridgeräte oder Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer.²²⁾ Wichtige Anwendungen sind die Identifizierung und Validierung von Biomarkern in Plasma- oder Gewebeproben.²³⁾

In der Metabolomanalyse ist die Kopplung der Umkehrphasen-Chromatographie oder der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) mit der hochauflösenden Massenspektrometrie weiterhin die Methode der Wahl.²⁴⁾ In vielen Fällen reicht es nicht, die akkurate Masse zu bestimmen, um Analyten eindeutig zu identifizieren. Daher sind Fragmentionenspektren der Komponenten und anschließende Interpretation oder Datenbanksuche erforderlich.²⁵⁾ In den letzten Jahren gab es intensive Bestrebungen, die Datenauswertung²⁴⁾ sowie die Spektrendatenbanksuche zu automatisieren.²⁶⁾

Schließlich geht der Trend in Richtung Kombination verschiedener Omics-Analysen, um die Interaktion von Genom, Proteom und Metabolom in komplexen Netzwerken biologischer Prozesse zu beschreiben und zu verstehen. Ein Beispiel ist der Mechanismus toxi-

scher Effekte von Chemikalien und Wirkstoffen, der anhand von Zellkulturen untersucht wurde.²⁷⁾ Diese Art der Multi-Omics-Analyse wird in Kombination mit software-unterstützter Netzwerkanalyse (etwa Ingenuity Pathway Analyse IPA,²⁸⁾ Abbildung 4) eine Rolle bei der Aufklärung biologischer Prozesse bei Krankheiten und Altern spielen.

Christian Huber, Universität Salzburg

Literatur

- 19) R. Ramautar, G. J. de Jong, *Bioanalysis* 2014, 6, 1011–1026.
- 20) A. L. Richards, A. S. Hebert, A. Ulbrich et al., *Nat. Protoc.* 2015, 10, 701–714.
- 21) S. Beck, A. Michalski, O. Raether et al., *Mol. Cell Proteomics* 2015, 14, 2014–2029.
- 22) T. Sajic, Y. Liu, R. Aebersold, *Proteomics Clin. Appl.* 2015, 9, 307–321.
- 23) Y. Liu, J. Chen, A. Sethi, Q. K. Li et al., *Mol. Cell Proteomics* 2014, 13, 1753–1768.
- 24) C. Ranninger, M. Rurik, A. Limonciel et al., *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 19121–19132.
- 25) D. J. Creek, W. B. Dunn, O. Fiehn et al., *Metabolomics* 2014, 10, 350–353.
- 26) Y. Wang, G. Kora, B. P. Bowen, C. Pan, *Anal. Chem.* 2014, 86, 9496–9503.
- 27) A. Wilmes, A. Limonciel, L. Aschauer et al., *J. Proteomics* 2013, 79, 180–194.
- 28) S. E. Calvano, W. Xiao, D. R. Richards et al., *Nature* 2005, 437, 1032–1037.

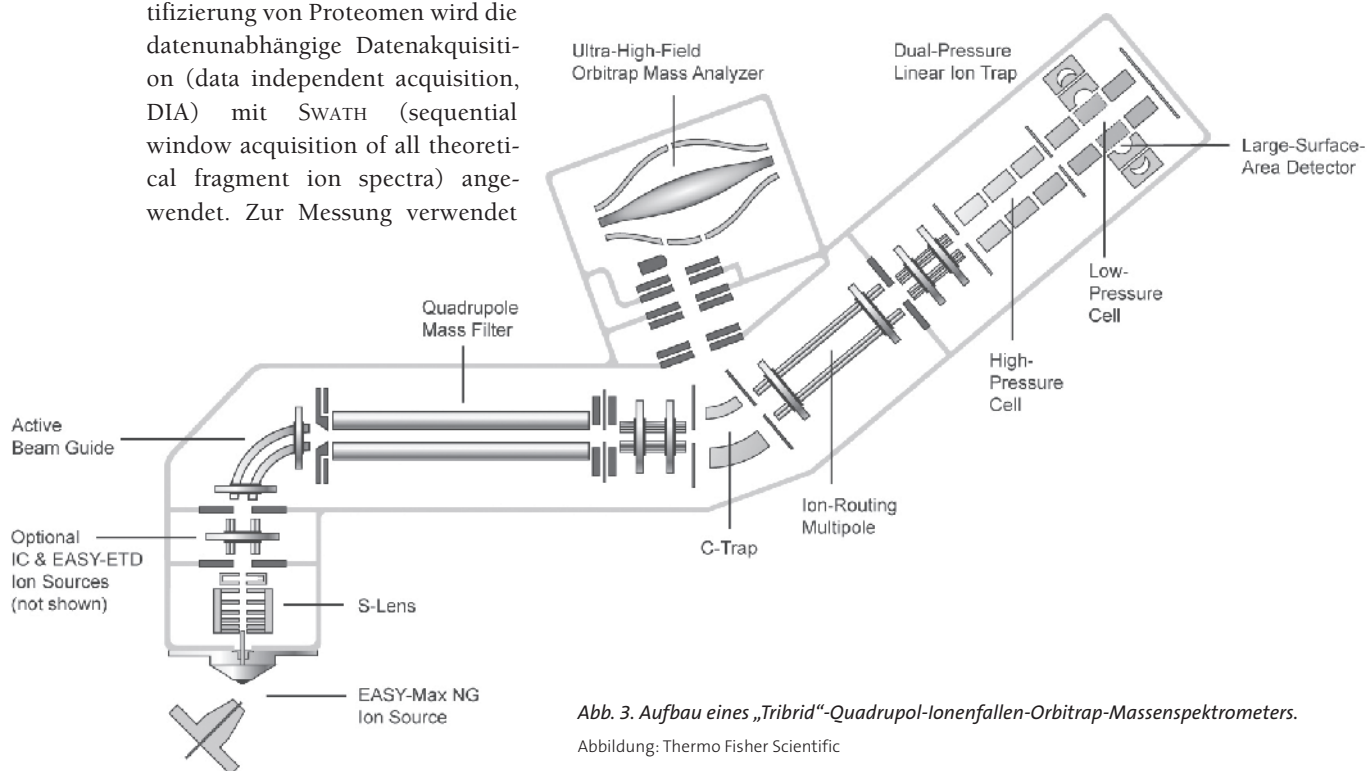


Abb. 3. Aufbau eines „Tribrid“-Quadrupol-Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometers.

Abbildung: Thermo Fisher Scientific

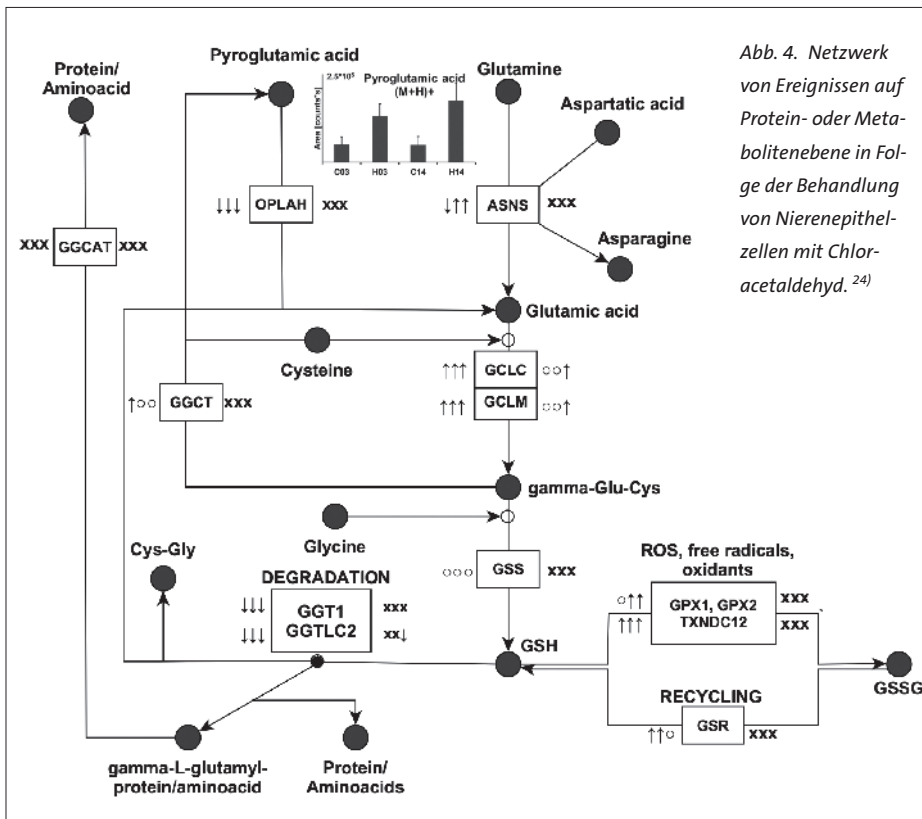


Abb. 4. Netzwerk von Ereignissen auf Protein- oder Metabolitenebene in Folge der Behandlung von Nierenepithelzellen mit Chloracetaldehyd.²⁴⁾

Ambiente Verfahren und Multianalytmethoden in der MS

◆ Vorherrschendes Thema in der Molekül-Massenspektrometrie war die Steigerung von Selektivität und Sensitivität sowie der Einsatz von Kopplungstechniken. Große Beachtung finden Methoden zur Ionenerzeugung unter Umgebungsbedingungen. Inzwischen ergänzen plasmabasierte Techniken die ersten Ambient-MS-Techniken DART (direct analysis in real time) und DESI (desorption electrospray ionization).²⁹⁾

Der besondere Charme der Ambient-MS beruht darauf, dass es ausreicht, die Probe dem ionisierenden Medium (Spray oder Plasma) unter Umgebungsbedingun-

gen auszusetzen. Da keine oder nur eine sehr geringfügige Probenvorbereitung notwendig ist, bietet sich die Kopplung mit tragbaren Massenspektrometern an. Folglich wurde ein tragbares Ionenfallen-MS mit einer plasmabasierten Ionenquelle kombiniert und eignet sich so unter anderem zur Sprengstoff- und Drogendetektion.³⁰⁾ Eine erhöhte Selektivität wurde durch Fragmentierungsexperimente in der niedrigauflösenden Ionenfalle erreicht. Analog werden hochauflösende MS (high resolution-MS, HR-MS) eingesetzt, insbesondere Flugzeit- (Time-of-Flight-MS, ToF-MS) und Orbitrap-Massenspektrometer (siehe Proteomik und Metabolomik, Seite 500).

Das Potenzial der Ambient-MS lässt sich vor allem mit hochauflösender MS ausschöpfen, da diese viele Analyten gleichzeitig mit hoher Selektivität erfasst und kontinuierliche Messungen möglich sind: Mit sekundärer Elektrosprayionisation (SESI) und HR-MS wurden die Pharmakokinetik von Ketamin, Propofol und Valproinsäure sowie deren Metaboliten in der Atemluft von Mäusen bestimmt (Abbildung 5).³¹⁾

Die Stärken der Ambient-MS-Techniken liegen vor allem in der qualitativen Analyse. Weitaus weniger Anwendungen beschäftigen sich mit der Quantifizierung. Letztere ist jedoch möglich durch stabilisotopenmarkierte Standards. Das Beispiel der Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver zeigt jedoch auch die Grenzen.³²⁾ Es besteht die Gefahr von isobaren Interferenzen zur Zielmasse, die beispielsweise bei der Ionisierung durch Fragmentierung entstehen. Daher ist eine Absicherung der Daten sinnvoll. Wertvolle Zusatzinformationen liefert beispielsweise die temperaturkontrollierte Verdampfung in einer modifizierten APCI-Quelle (Direct Inlet Probe-APCI, DIP-APCI, Abbildung 6).

Alternativen sind MS/MS-Techniken oder die Kombination mit der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) als komplementärer Technik. Die IMS-MS-Kopplung zeigt ihre Stärken besonders gut bei der Differenzierung von Isomeren. Durch diese Technik war es sogar möglich, Anomere komplexer Kohlenhydratstrukturen zu unterscheiden.³³⁾

Bei komplexen Proben und bei der Spurenanalytik stoßen die ge-

Advion
1/8 quer501ite 501

nannten Techniken an ihre Grenzen, und MS-Kopplungen mit Trenntechniken bleiben die Methoden der Wahl. Insgesamt sind deren Anwendungsgebiete breit gefächert, und es gibt einen Trend zu Multikomponentenmethoden mit HR-MS. Beispielsweise wurde eine UHPLC-Screening-Methode für über 450 Pestizide in Obst- und Gemüseproben etabliert.³⁴⁾

Auch für die Gaschromatographie (GC) hat die HR-MS großes Potenzial, und neben der ToF-MS gibt es seit dem Jahr 2015 die GC-Orbitrap-Kopplung.³⁵⁾ Die Kombination aus Trenntechnik und der HR-MS, die akkurate m/z-Verhältnisse liefert, erhöht nicht nur die Selektivität, sondern eröffnet neue Möglichkeiten in der Non-target-Analytik, beispielsweise in der

Rückstandsanalytik oder in der Metabolomik (siehe Seite 500).

Für die zielgerichtete Analyse wurden die wichtigsten Instrumente für die Ultraspurenquantifizierung – die Tripel-Quadrupol-Geräte – selektiver gestaltet. Differenzielle Ionennobilitätsspektrometrie im Ionenquellenbereich trennt isobare Matrixbestandteile ab und verbessert die Quantifizierung beispielsweise von Vitamin-D-Metaboliten.³⁶⁾

Heiko Hayen, Universität Münster

Literatur

- 29) A. Albert, J. T. Shelley, C. Engelhard, *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 6111–6127.
- 30) P. I. Hendricks, J. K. Dalgleish, J. T. Shelley, *Anal. Chem.* 2014, 86, 2900–2908.
- 31) X. Li, P. M.-L. Sinues, R. Dallmann et al., *Angew. Chem.* 2015, 127, 7926–7929.
- 32) S. Krieger, H. Hayen, O. J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 8337–8345.
- 33) J. Hofmann, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Nature* 2015, 526, 241–244.
- 34) J. Wang, C. Willis, C. James, J. W. Wong, *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 10375–10391.
- 35) A. C. Peterson, J.-P. Hauschild, S. T. Quarmby et al., *Anal. Chem.* 2014, 86, 10036–10043.
- 36) Y. Qi, T. Geib, P. Schorr, F. Meier, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2015, 25, 1–9.

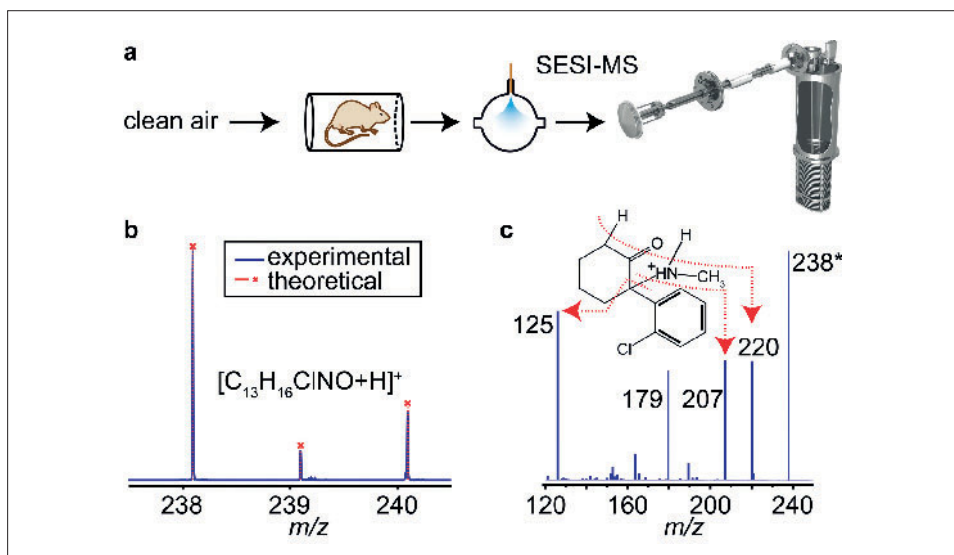


Abb. 5. a) Versuchsaufbau der Online-Atemanalytik. b) Sesi-Massenspektrum der Atemluft einer Maus, welches das Isotopenmuster im m/z-Bereich von protoniertem Ketamin zeigt. c) Fragmentionen-(Sesi-MS/MS)-Spektrum, erzeugt aus dem Vorläuferion bei m/z 238.

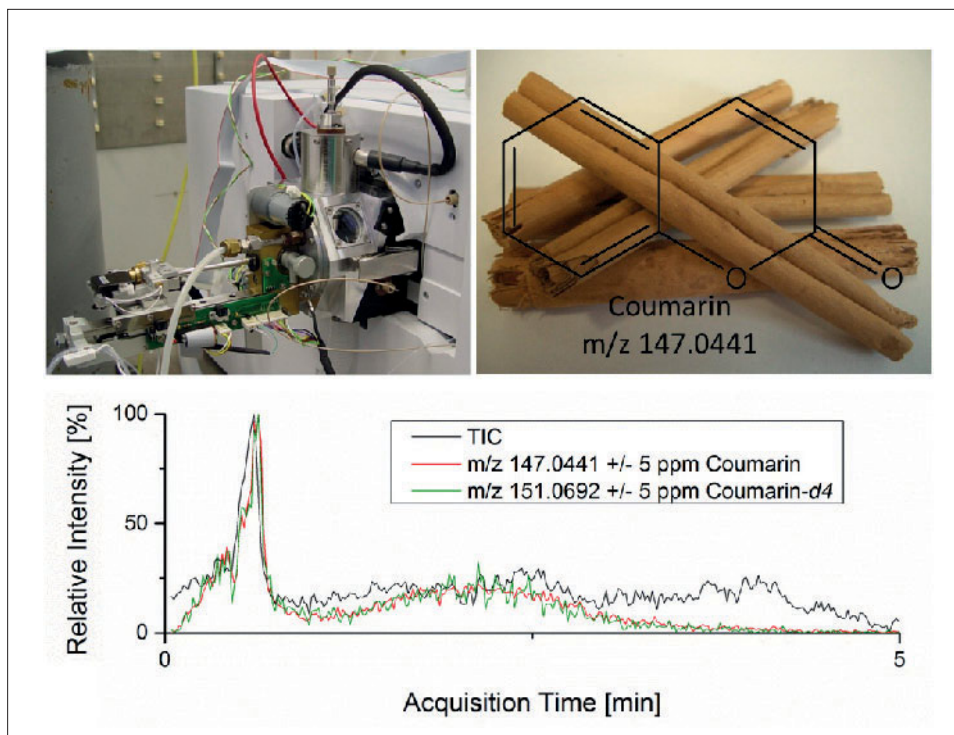


Abb. 6. DIP-APCI-Ionenquelle, gekoppelt an ein hochauflösendes Flugzeitmassenspektrometer und Massenchromatogramm der Quantifizierung von Coumarin in Zimtstangen mit deuteriertem internen Standard.

In die Routine: multidimensionale Trenntechniken

◆ Aktuelle Forschungsarbeiten und kritische Reviews zu multidimensionalen Trenntechniken hat im Jahr 2015 ein Sonderband von *Analytical and Bioanalytical Chemistry* zusammengefasst.³⁷⁾ Dabei wird zwischen drei Varianten zweidimensionaler HPLC unterschieden:

Die erste Technik ist der klassische Heart-Cut-Ansatz (LC-LC). Hierbei wird eine Fraktion aus der ersten Dimension gesammelt und auf einer zweiten Trennsäule analysiert. Der Vorteil ist, dass die Laufzeit in der zweiten Dimension nicht begrenzt ist und die Peakkapazität in der ersten und zweiten Dimension maximiert werden kann.

Der zweite Ansatz ist die umfassende zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie (LC × LC), bei der das Eluat aus der ersten Trenndimension vollständig auf ei-

ne zweite Trennsäule übertragen wird. Um die Trennung auf der ersten Dimension zu konservieren, muss das Murphy-Schure-Foley-Kriterium erfüllt werden. Demnach muss ein Peak aus der ersten Dimension mindestens drei Mal geschnitten werden. Ist dies nicht möglich, ist die theoretische Peakkapazität des zweidimensionalen Trennsystems nicht erreichbar.

Da die umfassende LC×LC auch technisch sehr anspruchsvoll ist, hat sich ein dritter Ansatz etabliert, die selektive LC×LC (sLC×LC). Bei der sLC×LC werden mehrere Fraktionen der ersten Dimension gesammelt und auf einer zweiten Trennsäule reanalysiert. Die Arbeitsgruppe um Stoll et al. hat diese Technik weiterentwickelt, um monoklonale Antikörper zu charakterisieren.³⁸⁾ Dabei wird in der ersten Dimension eine Säule auf Basis eines Kationenaustauschers verwendet, in der zweiten Dimension eine RP-Säule. So ist das Verfahren direkt kompatibel mit der massenspektrometrischen Detektion.

Vanhoenacker et al. haben eine Methode auf Basis der LC×LC vorgestellt, um einen tryptischen Verdau von Trastuzumab zu analysieren.³⁹⁾ Hierzu wurden Phasensysteme auf Basis von SCX(Strong-Cation-Exchange)×RP, RP×RP und HILIC×RP untersucht.

Wie die Beispiele zeigen, rückt die Analyse von Biopharmazeutika stärker in den Fokus. Die vorgestellten Arbeiten wurden auf kommerziell verfügbaren Systemen durchgeführt; daher ist die Anwendung multidimensionaler Trenntechniken sowohl in Forschungs- als auch Routinelaboratorien möglich. Obwohl die technischen Voraussetzungen daher gut sind, gibt es bei der automatisierten Datenanalyse und -aufbereitung noch erheblichen Forschungsbedarf. Zunächst sind die für die eindimensionale LC-MS entwickelten Softwarealgorithmen so anzupassen, dass auch zweidimensionale LC-Daten automatisiert ausgewertet werden können. Diese scheinbar triviale Aufgabe erweist sich dann als schwierig, wenn ne-

ben der akkuraten Masse MS/MS-Spektren zu berücksichtigen sind. Zudem kann das Datenvolumen für die Akquisition eines einzelnen Messlaufs mehrere Gigabyte umfassen, sodass die Speicherkapazität des Rechners entsprechend angepasst werden muss.

Thorsten Teutenberg, Institut für Energie- und Umwelttechnik (IUTA), Duisburg

Literatur

- 37) T. C. Schmidt, O. J. Schmitz, T. Teutenberg, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 117–118.
- 38) D. R. Stoll, D. C. Harmes, J. Danforth et al., *Anal. Chem.* 2015, 87, 8307–8315.
- 39) G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, K. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 355–366.



Westfalen

135 x 190 mm

Seite 503

zymmodulatoren, indem sie Multiwellplattenassays über eine Tröpfchenschnittstelle mit der ChiPElektrophorese verknüpfen.⁴⁵⁾ Die Platteninhalte wurden in 8-nL-Tröpfchen überführt und in einen Silikon-Glas-Chip transferiert, in dem dann die wässrige Phase extrahiert wurde. Der Umsatz von Phosphorylierungen wurde elektrophoretisch mit einem Durchsatz von 96 Proben in zwölf Minuten bestimmt.

Shallan, Guijt und Breadmore nutzten eine elektrokinetische Falle in einem Mikrofluidikchip, die Substanzen nach Größe und Mobilität selektiert. Durch Spannungsüberschläge erzeugte Nanokanäle sorgen hierbei für Extraktion und Konzentrierung der Analyte. Damit gelang es, durch nachfolgende Mikrochipelektrophorese Ampicillin in Blut zu quantifizieren.⁴⁶⁾

Die erste Kopplung einer chipbasierten Mikroflusselektrophorese (μ FFE) und der Massenspektrometrie haben Benz et al. vorgestellt.⁴⁷⁾ Dazu wurden die elektrophoretisch getrennten Produkte einer organischen Synthese auf einen Elektrosprayemitter abgebildet und das Trennbett gleichsam massenspektrometrisch gescannt.

Herzog et al. beschrieben die Integration fluoreszierender pH-Sensorschichten auf einem Chip durch Tintenstrahl Druck für die freiflussisoelektrische Fokussierung.⁴⁸⁾ Damit ließen sich Proteine trennen und gleichzeitig der pH-Wert orts aufgelöst erfassen. So gelang es, den isoelektrischen Punkt (pI) der Biomoleküle unmittelbar zu bestimmen.

Geiger et al. befassten sich mit der Kopplung der Nano-LC mit der μ FFE als neuartiger zweidimensionale Trennmethode.⁴⁹⁾ Das Eluat einer gradienten gesteuerten LC-Trennung lief über eine Transferkapillare in einen μ FFE-Einlass und wurde dort elektrophoretisch weiter aufgetrennt. So ließ sich ein tryptischer

Shimadzu

1/2 hoch

Seite 505



Verdau von BSA untersuchen; aufgelöst wurden zirka 105 Banden pro Minute.

Der Trend bei den chipbasierten elektrophoretischen Trennverfahren geht in Richtung Systemintegration, im Sinne eines integrierten chemischen Schaltkreises.

Detlev Belder, Stefan Nagl,
Stefan Ohla, Universität Leipzig

Literatur

- 40) M. Akbar, H. Shakeel, M. Agah, *Lab Chip* 2015, 15, 1748–1758.
- 41) S. Thürmann, C. Lotter, J. J. Heiland, B. Chankvetadze, D. Belder, *Anal. Chem.* 2015, 87, 5568–5576.
- 42) L. Xia, C. Choi, S. C. Kotheke, D. Dutta, *Anal. Chem.* 2016, 88, 781–788.
- 43) K. M. Krone, R. Warias, C. Ritter et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 2102–2105.
- 44) Y. Zhao, F. Pereira, A. J. deMello, H. Morgan, X. Niu, *Lab Chip* 2014, 14, 555–561.
- 45) E. D. Guetschow, D. J. Steyer, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* 2014, 86, 10373–10379.
- 46) A. I. Shallan, R. M. Guijt, M. C. Breadmore, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 7359–7362.
- 47) C. Benz, M. Boomhoff, J. Appun, C. Schneider, D. Belder, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 2766–2770.
- 48) C. Herzog, E. Beckert, S. Nagl, *Anal. Chem.* 2014, 86, 9533–9539.
- 49) M. Geiger, N. W. Frost, M. T. Bowser, *Anal. Chem.* 2014, 86, 5136–5142.

Bildgebende Untersuchungstechniken

◆ Ein Bild sagt mehr als tausend Worte – dies ist der Grund, warum bildgebende Untersuchungstechniken nicht nur in der medizinischen Diagnostik, sondern auch in der analytischen Chemie an Bedeutung gewinnen. Dieses Imaging erfordert rasche Aufnahme, Bearbeitung und Interpretation großer Datenmengen. Bereits etabliert sind mikroskopische Imaging-Verfahren in der Fluoreszenz- und der Schwingungsspektroskopie. In den letzten Jahren haben sich Wissenschaftler verstärkt bildgebenden massenspektrometrischen Verfahren zugewandt. Nach der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS, siehe ToF-SIMS auf Seite 507) und der matrixassistenten Laserdesorptions-Ionisationsmassenspektrometrie (MALDI-MS) werden nun auch die induktiv gekoppelte Plas-

ma-Massenspektrometrie (ICP-MS) sowie die Ambient-Techniken (siehe auch Seite 501) in steigendem Umfang für das Imaging eingesetzt. Treibende Kraft hierfür sind weitgehend biomedizinische oder pharmazeutische Fragen, sodass nicht nur die Grundlagenforschung diese Techniken anwendet, sondern auch klinische Laboratorien sowie die chemische und die pharmazeutische Industrie. Dementsprechend gab es in den letzten Jahren zahlreiche Highlights, hier einige Beispiele:

Gerwert et al. wiesen mit Raman-Imaging den Effekt des therapeutischen Antikörpers Panitumumab auf Zelllinien nach.⁵⁰⁾ Römpf und Kollegen schlagen Strategien vor, wie biomedizinische Multizentrenstudien mit MALDI-MS mit ver-

schiedenen Massenanalytoren und SIMS durchgeführt werden können. Zudem formulieren sie die Voraussetzungen, die für Behandlung und Auswertung der Daten gelten sollten.⁵¹⁾ Wesentlicher Bestandteil ist dabei das Datenformat imzML.

Niedermolekulare Metaboliten in Gewebedünnschnitten des Käfers *Paederus riparius* lokalisierten Spengler et al. mit hochaufgelöster MALDI-MS.⁵²⁾ Den steigenden Einsatz der LA-ICP-MS von Gewebedünnschnitten in der Biomedizin fassen Feldmann et al. zusammen.⁵³⁾ Einen neuen Ansatz zum LA-ICP-MS-Imaging in submikrometrischen Dimensionen durch Signal- und Bilddekonvolution stellen Vanhaecke et al. vor.⁵⁴⁾ Die Arbeitsgruppen von Günther und

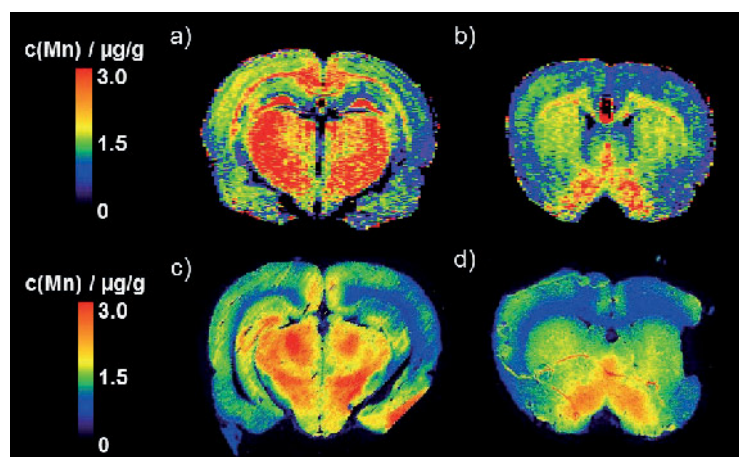


Abb. 9. a, b) In vivo durch MRI ermittelte Mangankonzentration zweier Hirnareale einer Ratte nach Kalibration durch LA-ICP-MS und c, d) entsprechende LA-ICP-MS-Daten derselben Areale, welche die gute Korrelation zeigen.

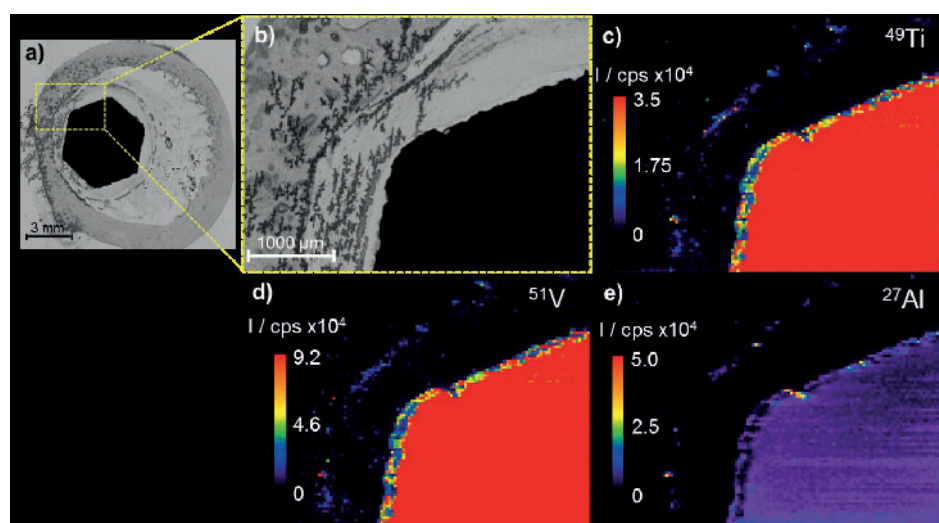


Abb. 10. a) Mikroskopisches Image eines Gewebeschnitts durch den Oberschenkelknochen eines Hundes mit Metallimplantat, b) Ausschnittsvergrößerung des mikroskopischen Bildes und die durch LA-ICP-MS ermittelten Verteilungen der Elemente c) Titan, d) Vanadium und e) Aluminium.

Bodenmiller entwickelten ein hochparalleles Imaging von 32 Proteinen und Proteinmodifikationen. Sie nutzten dazu Lanthanoidmarker und LA-ICP-MS mit einem Flugzeit-Massenanalysator⁵⁵⁾ und erreichten zusätzlich eine Ortsauflösung von etwa einem Mikrometer.

Auch die Kombination verschiedener bildgebender Verfahren generiert wertvolle Informationen: Eine gemeinsame Arbeit der Gruppen Kneipp und Jakobowski kombiniert die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) mit der LA-ICP-MS, um Gold-Nanopartikel und ihre Aggregate in Zellproben zu detektieren.⁵⁶⁾ Medizinische bildgebende Verfahren wie die Kernspintomographie (MRT) liefern komplementäre Daten zur LA-ICP-MS, wie eine Arbeit der Gruppen Faber und Karst zeigt. Sie quantifizierten Mangan im manganverstärkten Kernresonanzimaging (MEMRI) mit LA-ICP-MS als Kalibrationsverfahren (Abbildung 9).⁵⁷⁾

Methodisch näher liegt die Kombination röntgenspektroskopischer und plasmamassenspektrometrischer Imagingverfahren, um biologische Proben zu untersuchen. Dies zeigten Karst et al. am Beispiel von Benchtop-Mikro-Röntgenfluoreszenz (μ XRF) und LA-ICP-MS von Nanosilber-beschichteten Proben aus Prothesenmaterial (Abbildung 10).⁵⁸⁾ Die nachweisstärkere Synchrotron-Röntgenfluoreszenzspektroskopie kombinierten Doble et al. mit der LA-ICP-MS, um redoxaktive Metalle in Gehirndünnschnitten zu quantifizieren.⁵⁹⁾

Uwe Karst, Universität Münster

Literatur

- 50) S. F. El-Mashtoly, H. K. Yosef, D. Petersen et al., *Anal. Chem.* 2015, 87, 7297–7304.
- 51) A. Römpf, J.-P. Both, A. Brunelle et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 2329–2335.
- 52) D. R. Bhandari, M. Schott, A. Römpf, A. Vilcinskas, B. Spengler, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 2189–2201.
- 53) D. S. Urgast, J. H. Beattie, J. Feldmann, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care* 2014, 17, 431–439.

- 54) S. J. M. Van Malderen, J. T. van Elteren, F. Vanhaecke, *Anal. Chem.* 2015, 87, 6125–6132.
- 55) C. Giesen, H. A. O. Wang, D. Schapiro et al., *Nature Meth.* 2014, 11, 417–422.
- 56) T. Büchner, D. Drescher, H. Traub et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 7003–7014.
- 57) A.-C. Niehoff, L. Wachsmuth, F. Schmid, M. Sperling, C. Faber, U. Karst, *Chem. Select* 2016, 2, 264–266.
- 58) F. Blaske, O. Reifschneider, G. Gosheger et al., *Anal. Chem.* 2014, 86, 615–620.
- 59) K. M. Davies, D. J. Hare, S. Bohic et al., *Anal. Chem.* 2015, 87, 6639–6645.

Umfassende 3-D-Mikrobereichsanalyse: ToF-Sims

◆ Viele technisch relevante Oberflächenphänomene wie Benetzbarkeit, optische oder auch elektrische Eigenschaften ergeben sich aus der chemischen Zusammensetzung in den obersten 0,1 bis 1000 Nanometern eines Festkörpers. Die Technik für eine zielgerichtete Analytik ist ausgehend von gewünschter Lateralauflösung

Berghof
1/4 hoch
Seite 507

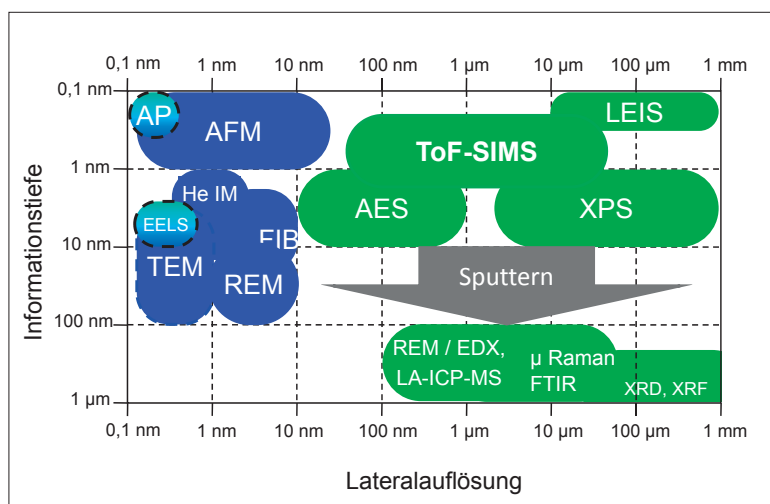


Abb. 11. Analytischer Baukasten: Techniken in der Oberflächen- und Nanoanalytik als Funktion von erreichbarer Lateralauflösung und Informationstiefe; blau: Techniken mit im Wesentlichen abbildenden Eigenschaften; grün: Techniken mit Informationen zur chemischen Zusammensetzung; Abkürzungen: AP: Atom Probe, AFM: Atomic Force Microscopy, HeIM: Helium Ion Microscope, EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy, FIB: Focused Ion Beam, TEM: Transmissionselektronenmikroskopie, REM: Rasterelektronenmikroskopie, LEIS: Low Energy Ion Scattering, ToF-SIMS: Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, AES: Auger Electron Spectroscopy, XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy, EDX: Energy Dispersive X-Ray Emission, LA-ICP-MS: Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, FTIR: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, XRD/XRF: X-Ray Diffraction/Fluorescence.

und Informationstiefe auszuwählen. Man fragt also:

- Welches Detail soll noch aufgelöst werden?
- Aus welchem Abstand von der Oberfläche wird die Information benötigt?

Unter den Techniken für Oberflächen- und Nanoanalytik (Abbildung 11) hat die ToF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) an Bedeutung gewonnen. Dies liegt vor allem an folgenden Eigenschaften:

- simultaner Nachweis von Elementen und Molekülen,
- hohe Nachweisempfindlichkeit bis zu ppm und fmol,
- hohe Oberflächenempfindlichkeit mit einer Informationstiefe von einer bis drei Monolagen,
- Zugang tieferer Schichten durch Ionenzerstäubung (Sputtern).

Dies macht die ToF-SIMS zu einem besonders geeigneten Screening-Tool, insbesondere wenn nur wenig über die chemische Zusammensetzung einer Oberfläche bekannt ist.

In den letzten Jahren verbesserte sich vor allem die Lateralauflösung, sodass nun Bilder mit einem Fokus unter 100 nm erstellt werden können. Zusammen mit der Tiefenauflösung unter 5 nm ist somit eine 3-D-Nanoanalytik der chemischen Zusammensetzung routinemäßig möglich.⁶⁰⁾

Tiefere Schichten sind üblicherweise durch kontinuierlichen Probenabtrag mit Ionenzerstäubung (Sputtern) zugänglich. Bis vor kurzem zerstörte das Sputtern die chemischen Bindungen im Probeninnern, sodass nur die Elementverteilung als Funktion der Tiefe verfolgt werden konnte. Neuerdings kön-

nen große Ionencluster (z. B. Ar^+_{2000}) das Material abtragen, welche die chemischen Bindungen weitgehend unangetastet lassen. Damit ist auch die dreidimensionale organische Zusammensetzung einer ToF-SIMS-Analyse zugänglich.⁶¹⁾ Abbildung 12 zeigt beispielhaft die 3-D-Verteilung von Melamin als Flammschutzmittel in Polyamid. Es wurde das intakte Molekül ohne Markierung nachgewiesen.⁶²⁾

Insgesamt eröffnen sich durch Clusterionen neue analytische Möglichkeiten: zum Beispiel bei der Analyse von Nanopartikeln, inklusive Core-Shell-Strukturen, bei der Charakterisierung von Drug-Delivery-Systemen, der Charakterisierung von OLEDs, in der Nano- und Mikrobereichsanalyse von halbleitenden Strukturen, bei der Charakterisierung von Additiven in Polymeren oder auch bei der allgemeinen Fehleranalyse (z. B. Probleme bei der Haftfestigkeit).

Birgit Hagenhoff, Tascon, Münster

Literatur

- 60) TOF-SIMS: Materials Analysis by Mass Spectrometry [Hrsg.: J. C. Vickerman, D. Briggs], IM Publications, Chichester, 2013.
- 61) S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009, 23, 3264–3268.
- 62) B. Hagenhoff, Kunststoffe, 2014, 4, 65–69.

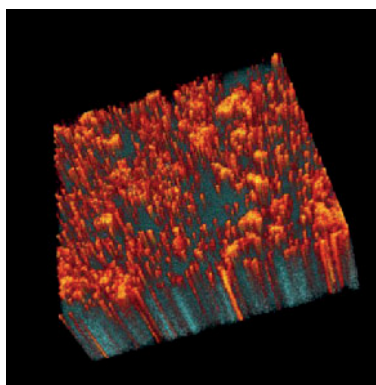


Abb. 12. 3-D-Verteilung von Melamin in einem Polyamid-Werkstoff; ToF-SIMS-3-D-Tiefenprofilierung mit Ar-Clusterionen zum Probenabtrag; Bildfeld: $30 \times 30 \times 0,5 \mu\text{m}$.⁶²⁾

Den Trendbericht Analytische Chemie hat in diesem Jahr **Martin Vogel** koordiniert. Vogel studierte Chemie an der Universität Münster und promovierte im Jahr 2001 in analytischer Chemie. Von 2001 bis 2006 arbeitete er als Universitär Dozent an der Universität Twente in den Niederlanden. Seit 2006 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Münster. Seine Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der analytischen Kopplungstechniken – insbesondere auf der Kopplung aus Elektrochemie und Massenspektrometrie (EC/MS). Er war von 2004 bis 2015 Mitglied im Vorstand der Fachgruppe Analytische Chemie, deren Vorsitzender er von 2012 bis 2015 war. Seit Anfang des Jahres ist er Vorsitzender des Arbeitskreises Separation Science in der Fachgruppe Analytische Chemie.

