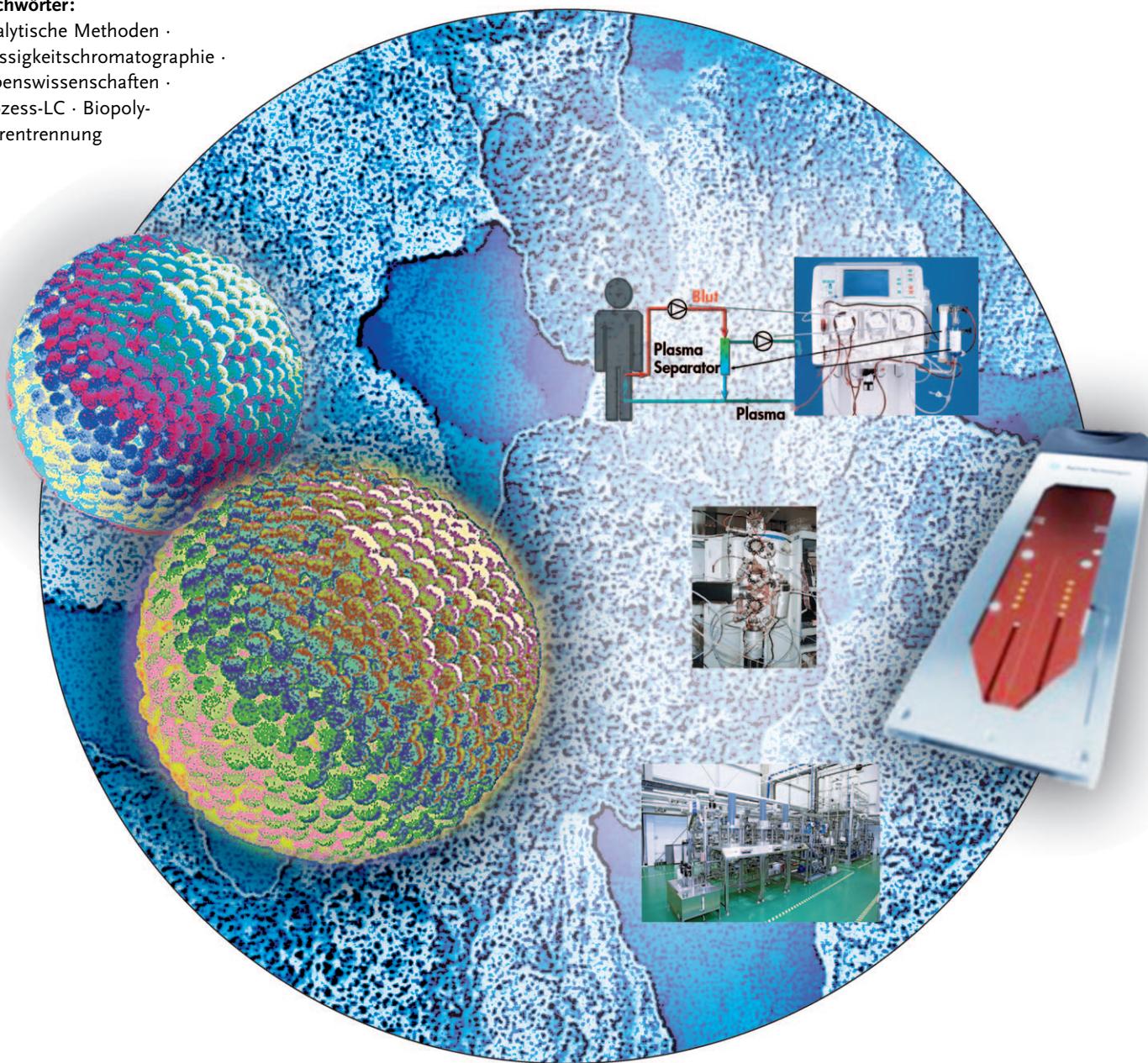


Flüssigkeitschromatographie – ihre Entwicklung und Bedeutung für die Lebenswissenschaften

Klaus K. Unger,* R. Ditz, E. Machtejevas und R. Skudas

Stichwörter:

Analytische Methoden ·
Flüssigkeitschromatographie ·
Lebenswissenschaften ·
Prozess-LC · Biopolymerentrennung



Flüssigkeitschromatographische Methoden umfassen den breitesten heute vorstellbaren Anwendungsbereich. Dies wird nirgendwo so deutlich wie in den Lebenswissenschaften, wenn es darum geht, Krankheitsmechanismen aufzuklären und komplexe Gemische bis in den Femtomol-Bereich zu analysieren. Auf der anderen Seite besteht Bedarf an hochreinen therapeutischen Wirkstoffen, die als Pharmaka auf den Markt kommen und hohen Reinheitsanforderungen genügen müssen. Diese Aufreinigung wird mithilfe der Prozesschromatographie im Tonnenmaßstab bewerkstelligt. Die hohe Komplexität und breiten Konzentrationsbereiche biologischer Systeme in Kombination mit den extremen Reinheitsanforderungen der Arzneimittelproduktion sind die Herausforderungen, auf die die Flüssigchromatographie heute, nach mehr als einem Jahrhundert der Forschung und Entwicklung, erfolgreich reagiert hat. Noch immer sind aber ein tiefergehendes Verständnis der grundlegenden Phänomene sowie deren effiziente Nutzung für die Verbesserung der Lebensqualität notwendig.

1. Einführung

Dieser Aufsatz versucht, den Weg von der Entdeckung der Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography, LC) über eine eher stochastische Evolution bis hin zum derzeitigen Stand der Entwicklung (im Besonderen in den Lebenswissenschaften) nachzuzeichnen.

Die Flüssigkeitschromatographie hat sich zur weitestverbreiteten Analysenmethode entwickelt. Zwar gibt es eine umfangreiche Palette von leistungsstarken Alternativmethoden für die Charakterisierung von Materialien und Oberflächen, jedoch nimmt die Bedeutung der Flüssigkeitschromatographie bei der Entschlüsselung der Geheimnisse der modernen Lebenswissenschaften immer weiter zu. Daneben ist Flüssigkeitschromatographie die einzige Methode mit gleicher Leistungsfähigkeit in analytischen wie in präparativen und sogar Produktionsanwendungen. So wäre die Herstellung moderner Biotherapeutika, wie rekombinanter Proteine und Antikörper, ohne mehrere chromatographische Aufarbeitungsschritte schlicht unmöglich.

Ziel dieses Aufsatzes ist es, die Entwicklung der verschiedenen Zweige der Flüssigkeitschromatographie aus der historischen Perspektive zu beschreiben und die Errungenschaften und Fortschritte, besonders im Bereich der Lebenswissenschaften, herauszuarbeiten. Unter „Lebenswissenschaften“ versteht man im weitesten Sinne die Wissenschaften mit Bezug zu Pflanzen, Tieren, Menschen und anderen Organismen. Wir schlagen eine Erweiterung und Aufteilung in endogene Faktoren mit den Bereichen klinische Diagnostik, therapeutische Anwendungen und Metabolismus sowie in exogene Faktoren mit den Bereichen Lebensmittel, Verunreinigungen und Begleitstoffe, Schadstoffe und Allergene vor. Beziehen wir weiter die Wirkstoff-Forschung, -Entwicklung und -Produktion mit ein, sind auch die erste Isolierung von Pflanzeninhaltsstoffen durch Tswett sowie die Arbeiten von Kuhn und Lederer bereits Beispiele lebenswissenschaftlicher Anwendung.^[1,2] Die Trennung und Isolierung von

Proteinen begann in den 1950ern und wurde über die folgenden Jahrzehnte kontinuierlich verbessert, vornehmlich in der präparativen Anwendung, was in der ersten produktionstechnischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen für die therapeutische Anwendung resultierte.^[3] Lebenswissenschaftliche LC-Anwendungen haben mehr als andere Anwendungsfelder unter einem Mangel an selektiver Detektion gelitten. Brechungsindex- und Ultraviolettdetektoren und sowohl Einzel- wie auch Mehrwellenlängensysteme erreichten nicht die notwendige Selektivität und Empfindlichkeit, wogegen es Fluoreszenz- und elektrochemischen Detektoren an Universalität mangelte. Ein Durchbruch gelang erst, als die Massenspektrometrie (MS) für die Charakterisierung von Peptiden und Proteinen eingesetzt wurde, was deren Identifizierung und Reinheitskontrolle ermöglichte. Die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie schuf die Basis für eine analytische Plattform, die die Anforderungen der Postgenomära erfüllen kann.

2. Errungenschaften der Flüssigkeitschromatographie und ihre Auswirkungen

Bevor wir die spezifischen Beiträge und das Potenzial der Flüssigkeitschromatographie in den Lebenswissenschaften

Aus dem Inhalt

1. Einführung	2351
2. Errungenschaften der Flüssigkeitschromatographie und ihre Auswirkungen	2351
3. Die LC in der Zeit nach dem Humangenomprojekt	2356
4. Flüssigkeitschromatographie im Jahr 2010 – wo stehen wir heute?	2358
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	2360

diskutieren, verdient die generelle Entwicklung der Flüssigkeitschromatographie etwas Aufmerksamkeit. Adsorptive Trennungen wurden bereits im 19. Jahrhundert praktiziert.^[1,2] Tswett war jedoch der Erste, der 1903 den Begriff „Chromatographie“ („mit Farbe schreiben“) für die Isolierung von Chlorophyllbestandteilen^[1,2] verwendete. Die praktische Anwendung dieser Methode war, wie sich schnell herausstellte, in hohem Grade abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter und ausreichend gut charakterisierter Adsorbentien. Dies zeigte bereits frühzeitig, dass die Beherrschung der Flüssigkeitschromatographie eine Kombination von Fähigkeiten erfordert, die außer der richtigen Materialauswahl und -charakterisierung auch ein grundlegendes Verständnis von Fest-flüssig-Wechselwirkungen einschließt.

Kuhn und Lederer in Heidelberg griffen die Isolierung von Pflanzeninhaltsstoffen zwei Jahrzehnte später wieder auf.^[4] Kuhn und Brockmann erkannten im Verlauf dieser Arbeiten die Notwendigkeit für reproduzierbarere, aber auch selektivere Adsorbentien, speziell abgestimmt auf spezifische Anwendungen.^[4] Diese Erkenntnis führte in der Folge zu den ersten in ihrer Adsorptionsstärke standardisierten Materialien und damit zu den ersten Versuchen hin zu reproduzierbaren Trennungen.

Nach diesen ersten Ansätzen fanden die wesentlichen Weiterentwicklungen der Flüssigkeitschromatographie zwischen 1960 und 1970 statt und führten schließlich zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) als analytische Methode neben der Gaschromatographie.^[5] Zu dieser Zeit dominierte die Gaschromatographie (GC) die Analytik, angetrieben von den Bedürfnissen der petrochemischen Industrie.^[5] Darüber hinaus wuchs jedoch der Bedarf an effizienten Trennmethoden für polare und geladene Substanzgemische auf den Gebieten der pharmazeutischen und der Umweltanalytik sowie der Reinheitskontrolle chemischer Industrieprodukte. Stand der Technik war hier die klassische Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung von weiten Glassäulen, die mit grobkörnigen Kieselgel- oder Aluminiumoxidpartikeln gepackt waren. Durch Schwerkraft und mit organischen Eluenten betrieben, konnten lineare Flussgeschwindigkeiten von ca. 0.01 mm s^{-1} erreicht werden, d.h., die Trennungen waren extrem langsam.



Klaus K. Unger (geb. 1936) studierte Chemie an der Technischen Universität Darmstadt (TUD) und promovierte 1965 bei Prof. H. W. Kohlschütter am Zintl-Institut für Physikalische Chemie und Anorganische Chemie. 1969 folgte die Habilitation an der TUD. 1977–2001 war er Professor für Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und von 2001 bis 2009 Leiter einer Forschungsgruppe im Bereich Bioseparation der Merck KGaA (Darmstadt). Seine Forschungsschwerpunkte sind das Design und die Synthese poröser Materialien als Adsorbentien und Katalysatoren, Oberflächenfunktionalisierung und Charakterisierung, Entwicklung von Flüssigphasentrennmethoden sowie multidimensionale LC in der Proteomik

Adsorbentien und Katalysatoren, Oberflächenfunktionalisierung und Charakterisierung, Entwicklung von Flüssigphasentrennmethoden sowie multidimensionale LC in der Proteomik

Die Untersuchung und Beschreibung der Massentransportprozesse und der Verteilungsgleichgewichte von Analyten in Säulen sowie die Erfassung der hydrodynamischen Gesetzmäßigkeiten in einer LC-Säule führten zu Berechnungen, die klare Hinweise lieferten, wie sich die klassische Säulenflüssigkeitschromatographie hin zu einer moderneren und effizienteren Version verbessern ließe: Reduktion der Adsorbenspartikelgröße von 100 auf ca. 10 μm , Packen der Partikel in druckstabile Stahlsäulen und Betrieb dieser Säulen bei höheren und konstanten Flüssen von ca. 1 mm s^{-1} .^[6]

Später wurden mechanisch stabile mikropartikuläre Kieselgelsorbentien hergestellt, in enge Größenfraktionen getrennt und unter hohem Druck in Stahlsäulen gepackt.^[7] Diese Säulen erforderten für effizienten Betrieb pulsationsfreie Pumpen, geeignete Probendosiervorrichtungen und Durchflusszellen für eine kontinuierliche Detektion. In dieser Phase trieb die Materialentwicklung das Design und die Konstruktion der chromatographischen Instrumente wesentlich voran.

Dieses Wechselspiel zwischen der Weiterentwicklung der Adsorbentien mit der dafür angepassten Säulenauslegung und der entsprechenden Systementwicklung wurde zum typischen Innovationszyklus während der Explorationsphase der HPLC und hat sich in dieser Form über die letzten 50 Jahre fortgesetzt.

Bei der Diskussion der Entwicklung der HPLC als analytische Methode wird häufig übersehen, dass Flüssigkeitschromatographie zuerst als Aufreinigungsmethode und damit als präparative Methode angewendet wurde. Daher ist es wohl richtig festzustellen, dass die Flüssigkeitschromatographie die einzige Technologie ist, welche die Trennung und Identifizierung von femtomolaren Substanzmengen aus komplexen Matrices in den Lebenswissenschaften und zugleich die Isolierung und Aufreinigung synthetischer Industrieprodukte im Vieltonnenbereich ermöglicht.

Eine kritische Betrachtung der Flüssigkeitschromatographie zeigt, dass die Entwicklung der Methodik und der zugehörigen Technologie im Wesentlichen auf drei Pfeilern basiert, die sich nicht nur weitgehend unabhängig voneinander, sondern auch auf verschiedenen Zeitachsen entwickelt haben (Abbildung 1).

Es kann daher auch nicht überraschen, dass die Entwicklungen der jeweiligen Pfeiler nicht sonderlich viel „gegenseitige Befruchtung“ erfahren haben. Zum Beispiel wurde auf dem Gebiet der präparativen und Prozesschromatographie der Neustart nach der Ruhephase zwischen 1930 und der Mitte der 1960er Jahre nicht durch die parallele Entstehung der HPLC ausgelöst. Vielmehr waren es Ingenieure auf der Suche nach effektiveren Reinigungstechniken in der petrochemischen und Lebensmittelproduktion, die kontinuierliche Gegenstromkonzepte, z. B. eine Trenntechnologie, bei der die Bewegung des Packungsbettes durch Ventilschaltungen simuliert wird (Simulated Moving Bed, SMB), entwickelten.^[8,9]

Während die präparative wie auch die analytische LC in hohem Maße auf Geräteentwicklung, Ingenieurtechnik und die physikalischen Aspekte ihrer Systemelemente für die Weiterentwicklung ihrer Disziplinen zurückgriffen, fußte der Pfeiler der Bioseparation (rechts in Abbildung 1) auf einem anderen Schlüsselaspekt chromatographischer Trennung,

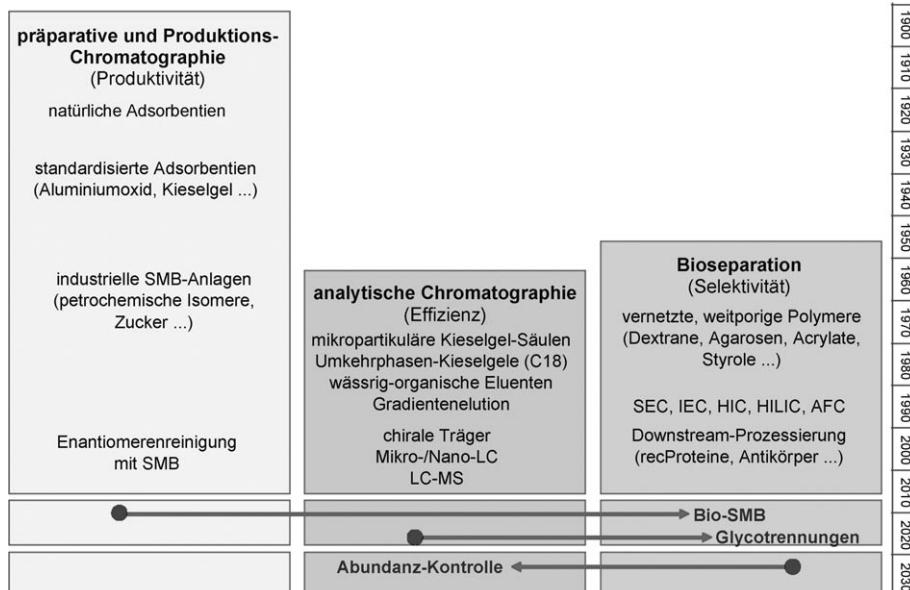


Abbildung 1. Die drei Säulen der Flüssigkeitschromatographie. Historische Entwicklung, Potenziale und gegenseitige Beeinflussung.

nämlich der Selektivität der Trennmaterialien. Diese ermöglichte die Handhabung von empfindlichen Biopolymeren, z.B. von rekombinanten Proteinen, unter Erhaltung ihrer Bioaktivität. Der geringe Fokus auf ingenieurtechnischen Aspekten der Prozesse führte zu dem interessanten Phänomen, dass großtechnische Produktionskonzepte für Proteine um die mechanische Instabilität der eingesetzten Gele herum entwickelt wurden.^[3]

2.1. Präparative und Produktions-Flüssigkeitschromatographie

Die Auslegung der kontinuierlichen Prozesschromatographie, z.B. in Form der Technologie des simulierten Gegenstroms, führte in Kombination mit speziell für die jeweilige Trennaufgabe entwickelten Trennmaterialien zu sehr effizienten großtechnischen Prozessen in der petrochemischen und der Lebensmittelindustrie. Pionier dieser Entwicklung



Abbildung 2. Produktions-SMB-Anlage. Wiedergabe mit Genehmigung von R. M. Nicoud (Novasep, Vandœuvre-les-Nancy, Frankreich).

war das Unternehmen Union Oil Products (UOP).^[8,9] Das Konzept der SMB-Chromatographie wurde in den 1990er Jahren angepasst und verkleinert, um die Technologie für die Herstellung von Pharmazeutika nutzen zu können.^[10,11] Während der 1980er Jahre waren verschiedene Arten hoch selektiver Adsorbentien für die Auftrennung von Racematen in ihre Enantiomere entwickelt worden, die nahezu ausschließlich in der analytischen HPLC eingesetzt wurden.^[12-14] Die Verfügbarkeit enantioselektiver Packungsmaterialien in Volumenmengen ermöglichte die Packung in große Stahlsäulen unter dynamisch-axialer Kompression (Dynamic Axial Compression, DAC)^[15,16] und damit die Herstellung von reinen Enantiomeren im Mehrtonnenmaßstab mithilfe der SMB-Technologie.

In den folgenden Jahren konnten Produktivitäten von mehr als 10 kg reinem Enantiomer pro Kilogramm Packungsmaterial und Tag erreicht werden (Abbildung 2).

2.2 Analytische HPLC

Am Anfang war die Entwicklung der analytischen HPLC stark von der Gaschromatographie beeinflusst und wurde zur Analyse pharmazeutischer und synthetischer Produkte eingesetzt. Die wichtigsten Errungenschaften in den 1970er Jahren waren die Herstellung mikropartikulärer sphärischer Kieselgel-Adsorbentien mit enger Partikelgrößenverteilung und Partikelgrößen $< 10 \mu\text{m}$, ihre Umsetzung zu *n*-Octadecyl- und *n*-Octyl-modifizierten chemisch gebundenen Phasen (Umkehrphasen- oder Reversed-Phase(RP)-Kieselgele) sowie das reproduzierbare und effiziente Packen derselben in Edelstahlsäulen.^[7,17] Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde der Partikeldurchmesser der Packungsmaterialien kontinuierlich von 5 über 3–4 und schließlich auf $< 2 \mu\text{m}$ reduziert, um die Säuleneffizienz zu erhöhen, schnelle Analysenzeiten zu erreichen und die Empfindlichkeit zu steigern.^[18] In jüngster Zeit wurden HPLC-Systeme für Säulen mit Ethyl-verbrückten Sub-2- μm -Hybridkieselgelpartikeln entwickelt, die bei Betriebsdrücken bis 1.500 bar betrieben werden und als Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography-(UPLC)-Systeme bezeichnet werden.^[18,19]

In Forschungsanwendungen wurde der Säuleninnen-durchmesser in der Folge von den traditionell üblichen 4.6–4.0 mm auf 2.0 und 1.0 mm reduziert; das Ziel war, die Detektionsempfindlichkeit durch die geringere Verdünnung der Analysensubstanzen zu erhöhen. Diese so genannten Micro-Bore-Säulen können noch mit konventionellen HPLC-Geräten bei Flüssen zwischen 0.1 und 5 mL min^{-1} betrieben werden.

Der wirkliche Durchbruch im Bereich der Miniaturisierung fand etwa 1980 mit der Einführung der Quarzkapillarsäulen statt, die durch eine Außenbeschichtung mit Polyethylenimin mechanisch handhabbar wurden.^[20,21] Der Säuleninnendurchmesser variierte zwischen 300 und 20 µm, und der Gebrauch dieser Säulen erforderte spezielle Mikro- und Nano-LC-Instrumente, die in der Lage waren, in reproduzierbarer Weise Flüsse im µL- und nL-Bereich zu erzeugen.^[22] Die Kapillaren wurden mit mikropartikulären Kieselgelen gepackt und erreichten Bodenzahlen jenseits der 100 000 Böden m⁻¹.^[23] Quarzkapillaren wurden auch mit kontinuierlichen Betten (so genannten monolithischen Säulen) aus Kieselgel und Polymeren hergestellt und bei der Gradientenelution mit RP-Phasen eingesetzt.^[24]

Obwohl LC-Systeme mit hoher Reproduzierbarkeit schon seit langem am Markt angeboten werden, sind entsprechende Mikro- und Nano-LC-Instrumente erst in den letzten Jahren verfügbar geworden. Sie haben dazu beigetragen, dass die miniaturisierte LC eine analytische Routinemethode in der biochemischen Forschung geworden ist. Diese Systeme haben die folgenden Vorteile: Es werden geringe Probenmengen benötigt, der Eluensverbrauch ist äußerst gering, und es wird eine höhere Empfindlichkeit durch minimale Probendurchmischung erreicht. Allerdings ist zu beachten, dass die Handhabung und die Bedienung solcher Systeme deutlich komplexer sind als bei konventionellen LC-Systemen und spezielles Wissen und Fertigkeiten des Betreibers erfordern.

Ein Meilenstein in der Weiterentwicklung der HPLC war ihre Kopplung mit der Massenspektrometrie als Detektor und als weitere Trenndimension während der 1990er Jahre.^[25]

Ähnlich wie bei der Flüssigkeitschromatographie datieren die ersten Studien zur Massenspektrometrie zurück in das Jahr 1912.^[25] Seitdem wurde diese Technologie kontinuierlich verbessert. Zuerst wurde die Massenspektrometrie mit der Gaschromatographie gekoppelt. Dies hat die Analyse leicht verdampfbarer Produkte in verschiedenen Bereichen erheblich erleichtert. Ein signifikanter Fortschritt war die Anwendung der Massenspektrometrie auf nichtflüchtige Stoffe wie Peptide, Oligosaccharide, Phospholipide oder Gallensäuren.

Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung der Massenspektrometrie war ihre Anwendung zur Analyse hochmolekularer Verbindungen, z.B. synthetischer Polymere, Proteine, Glycane und Polynukleotide, mithilfe der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisierung (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). Anwendungsgebiete der LC-MS-Kopplung finden sich in der Umweltanalytik, Lebensmittelüberwachung und klinischen Analytik. Weitere Errungenschaften sind die erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung kleiner Massen selbst bei niedriger Auflösung, Verbesserungen bei der Empfindlichkeit, niedrigere Detektionsgrenzen und effizientere Tandem-Massenspektrometrie auch für hochmolekulare Substanzen. Es bleibt festzuhalten, dass die Entwicklung der LC-MS-Methodik noch nicht abgeschlossen ist.

Mikro- und Nano-LC-Systeme eignen sich wegen ihrer niedrigen Flussgeschwindigkeiten ideal für die Kopplung mit MS-Systemen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, den Kapillarausgang direkt in der Ionenquelle des MS-Systems zu positionieren. Um die Verbindung zu erleichtern und eine

höhere Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurden Mikrochips entwickelt (Abbildung 3).^[26]

Zwischen 1990 und 1995 ermöglichten Materialentwicklungen in der Kieselgelchemie unter Einsatz von Templaten

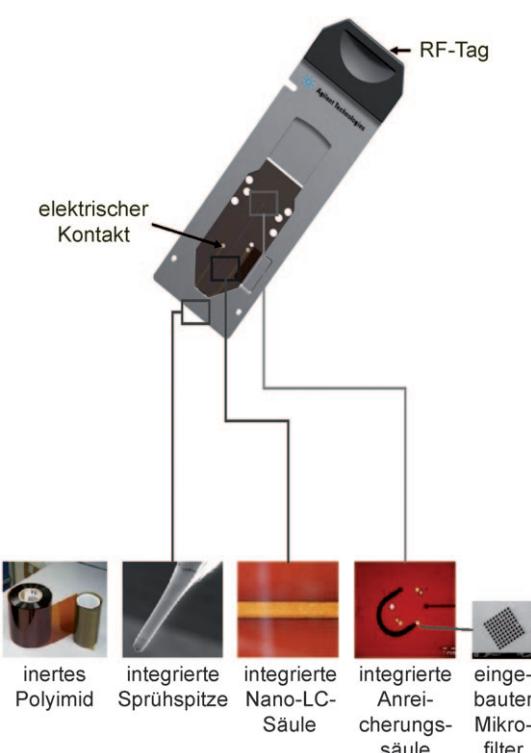


Abbildung 3. Aufbau (schematisch) eines HPLC-Chips; RF-Tag = Radiofrequenz-Sensor. Wiedergabe mit Genehmigung von G. Rozing (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn).

die Synthese von Kieselgelkörpern mit definierten Poren und vorgegebener Geometrie, beispielsweise in Zylinderform.^[27] Tanaka et al. wendeten solche kontinuierlichen Betten als Säulen in der HPLC an.^[24] Diese so genannten monolithischen Kieselgelsäulen wurden als Alternative zu mit Partikeln gepackten Säulen eingeführt.^[7] Das primäre Ziel bestand darin, eine hohe Säuleneffizienz bei niedrigen Säulenrückdrücken zu erreichen. Monolithische Chromatographiesäulen haben ein druckstables kontinuierliches Bett mit einer bimodalen Porenverteilung aus 2 µm großen Transportporen und 12 nm großen Diffusionsporen. Zur Herstellung einer in konventionellen HPLC-Geräten verwendbaren Säule wird der Monolith mit einer leckagedichten Polymerschicht aus PEEK (Polyetheretherketon) überzogen. Die ersten Produkte zeigten Bodenhöhen, die partikulären Säulen mit 3–4 µm Teilchendurchmesser entsprechen, aber nur einen Druckabfall entsprechend einer mit 13 µm großen Partikeln gepackten Säule erzeugen. Die Synthese von monolithischem Kieselgel eröffnet einige einzigartige Optionen für die Einstellung von Porengröße und Porosität: Gegenüber der metastabilen Zwischenkornporosität hoch effizienter partikulärer Säulen ist die durch die Transportporen bereitgestellte Porosität von Monolithen sehr viel größer und gleichzeitig

stabiler. Darüber hinaus kann die Größe der Transportporen durch die Synthese gezielt angepasst werden und bleibt natürlich über die Lebensdauer der Säule konstant.

Die Porenstruktur kann beispielsweise durch das Porennetzwerkmodell (Pore Network Modelling, PNM) simuliert werden, um eine optimale Massentransportkinetik für Analyten definierter Größe zu erreichen, indem die Porenstruktur-eigenschaften mit den chromatographischen Leistungsparametern verknüpft werden.^[28] Auf diesem Weg ist es möglich, Säulen für spezifische Anwendungen maßzuschneidern.

In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass kontinuierliche Säulen mit organischen Polymeren wesentlich früher eingeführt wurden als monolithisches Kieselgel. Pioniere in diesem Feld waren Hjertén,^[29] Sveč und Tennikova.^[30] Organische Polymermonolithen werden als Scheiben, Zylinder und Membranen hergestellt und weisen eine breite Porengrößenverteilung (Makro- bis Mesoporen) auf. Bevorzugtes Anwendungsgebiet ist die Analyse, Isolierung und Reinigung von Biopolymeren.^[30]

In letzter Zeit ist das in den 1970er Jahren propagierte Konzept der „oberflächenporösen Teilchen“ durch die Synthese von ca. 3 µm großen Teilchen aus einem festen Kern und einer darauf abgeschiedenen, porösen Kieselgelschicht in modifizierter Form wiederbelebt worden. Diese Partikel sind ebenso effizient wie mit Sub-2-µm-Partikeln gepackte Säulen, zeigen aber einen niedrigeren Druckabfall sowie geringere Massenkapazität.^[31]

Es ist festzuhalten, dass analytische Chromatographie außer vielen Varianten effizienter Umkehrphasen auf Kieselg basis auch Phasen für affine und sog. Mixed-Mode-Trennungen anbietet. Dies sind leistungsfähige Hilfsmittel sowohl für die pharmazeutische Analytik (einschließlich Forschung und Entwicklung) wie auch für biowissenschaftliche Anwendungen.

2.3. Bioseparation – Trennung von Biopolymeren

Die Trennung von Proteinen und anderen Biopolymeren zeigt einige Besonderheiten im Vergleich zur Trennung niedermolekularer Substanzgemische aus synthetischen Produkten. Biopolymere haben eine Molekülmasse von mehreren Tausend bis zu einigen Millionen Dalton. Proteine bestehen aus Ketten von Aminosäuren als Grundbausteinen, die jeweils über eine Peptidbindung verknüpft sind, und weisen in Abhängigkeit vom pH-Wert eine negative oder positive Ladung auf. Am isoelektrischen Punkt kompensieren sich beide Ladungen. Eine Besonderheit der Proteine ist ihre Fähigkeit zur Faltung (Konformation), d. h., sie ändern ihre räumliche Struktur, die letztlich ihre biologische Wirkung wesentlich mitbestimmt.

Biopolymere werden in wässrigen gepufferten Eluenten üblicherweise bei pH 4–9 getrennt, und zwar unter Bedingungen, bei denen ihre biologische Wirksamkeit erhalten bleibt. Es gibt auch Trennvarianten, bei denen Proteine völlig entfaltet (denaturiert) getrennt werden, beispielsweise nach Zusatz von Detergentien.

Wegen ihrer hohen Molekülmassen sind ihre Diffusionskoeffizienten in wässrigen Eluenten wesentlich geringer (um

einen Faktor von 100 und mehr) als jene von gelösten niedermolekularen Substanzen. Da die chromatographische Trennung möglichst unter gleichgewichtsnahen Bedingungen erfolgen soll, müssen Proteine genügend Zeit haben, in die Poren des Packungsmaterials der Säule hinein und aus ihnen wieder heraus zu diffundieren. Um dies zu erreichen, muss die lineare Flussgeschwindigkeit des Eluenten um denselben Faktor 100 verringert werden. Das allerdings führt dazu, dass sich die Analysenzeit um denselben Faktor verlängert. Dies gilt konkret bei Trennung mit konstanter Fließmittelstärke (isokratische Bedingungen), z. B. bei der Größenausschlusschromatographie. Biopolymere werden jedoch vorzugsweise mit Gradientenelution getrennt, bei der diese Bedingungen nicht mehr erfüllt sind.

Zur Wechselwirkung der gelösten Biopolymere mit der Gesamtoberfläche der stationären Phase muss diese über genügend große Poren zugänglich sein. Während für die Trennung von niedermolekularen Substanzen üblicherweise Adsorbentien mit mittleren Poredurchmessern von 6 bis 10 nm verwendet werden, erfordert die Trennung von Peptiden Poredurchmesser von etwa 30 nm und für Proteine Poredurchmesser von 50 nm und größer.

Die ersten Trennungen von Proteinen wurden 1950 von Forschern der Universität Uppsala durchgeführt, und zwar an vernetzten Dextrans. Diese Gele waren nicht druckstabil; sie wiesen im Unterschied zum Kieselgel eine Quellungsporosität auf und sie wurden deshalb als weiche Gele bezeichnet. Es wurden Versuche unternommen, diese Quellung durch eine Vernetzung der Gele zu verringern. Weitauß wichtiger war aber die Tatsache, dass sich durch Einführen funktioneller Gruppen selektive Adsorbentien herstellen ließen, die den weit verbreiteten Einsatz dieser Materialien zur Proteintrennung ermöglichten. In der Folgezeit wurden vernetzte und funktionalisierte Agarosegele weiter verbessert, z. B. durch die Herstellung kleiner, kugelförmiger Partikel mit besserer Druckstabilität und optimaler Porenstruktur im Hinblick auf die Proteintrennung.

Um 1980 wurden Versuche unternommen, mikropartikuläre, großporige Kieselgele zu funktionalisieren, um sie als alternative Adsorbentien für Proteintrennungen zu verwenden und vor allem schnellere Trennungen zu erreichen.^[34] Ein weiterer Versuch, geeignete Packungsmaterialien für die schnelle Trennung von Proteinen zu synthetisieren, war die Synthese von „Perfusionsadsorbentien“. Dabei handelt es sich um poröse Materialien mit ausreichend großen Makroporen, die von einem konvektiven Fluss durchströmt werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit des Massentransports der zu trennenden Proteine zwischen mobiler und stationärer Phase und zu schärferen Elutionsprofilen.^[35]

Eine weitere Möglichkeit, die verminderte Diffusionsgeschwindigkeit großer Moleküle in Packungsmaterialien für die LC zu umgehen, ist der Einsatz kleiner, unporöser Adsorbentien. 1995 wurden 1–2 µm große, unporöse Kieselgel- und Polymerpartikel hergestellt und funktionalisiert. In der Tat war es möglich, an kurzen Säulen bei akzeptablen Säulenrückdrücken schnelle Trennungen von Proteingemischen im Bereich von Minuten und weniger zu erreichen.^[36] Trotz all dieser Forschungserfolge dominieren in der Prozesschromatographie von Proteinen weiterhin vernetzte Agarose, Dex-

trane sowie Materialien auf Polyacrylamid- und Polymethacrylatbasis.

Als Analysenmethode erreichte die Umkehrphasen-HPLC eine große Bedeutung bei der Produktentwicklung und -kontrolle biopharmazeutischer Produkte.^[37,38] Für die Isolierung und Reinigung solcher Pharmaka im Produktionsmaßstab ist die Umkehrphasen-HPLC jedoch aus zwei Gründen ungeeignet: Erstens führen Säulen mit mikropartikulären RP-Kieselgelträgern zu hohen Säulenrückdrücken, und zweitens führt die Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Eluenten häufig zu Denaturierungseffekten der zu trennenden Proteine. Der einzige Prozess, bei dem Umkehrphasen-HPLC-Säulen eingesetzt werden, ist die Aufreinigung und Produktion von humanem Insulin bei Eli Lilly.^[39]

Seit Ende der 1960er Jahre wurden Adsorbentien auf der Basis hydrophiler, hydrophober und funktionalisierter Polymergele hergestellt, die eine optimierte Porenstruktur, Teilchengröße und Teilchenmorphologie für den Einsatz bei Produktionsprozessen aufwiesen.

Seit dem Jahr 2000 steht die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern durch Affinitätschromatographie im Vordergrund. Die verwendeten Protein-A-Säulen haben jedoch eine Reihe von Nachteilen bei der Aufarbeitung, besonders was ihre Stabilität und Lebensdauer betrifft. Die Aufgabe besteht heute darin, aus kleinen Bioreaktoren mit Hilfe von schnellen Reinigungsprozessen Mengen von Tonnen pro Jahr aufzureinigen. Erwünscht ist eine Verweilzeit von 2–6 Minuten bei linearen Flussgeschwindigkeiten von über 700 cm h^{-1} und Säulenkapazitäten von ungefähr 100 g pro Liter Packungsmaterial.^[40–43] Prozesschromatographie wird in Zukunft eine zentrale und entscheidende Rolle bei Aufreinigungsprozessen von rekombinanten Proteinen spielen. Hier besteht ein bisher nicht ausgeschöpftes Potenzial für Verbesserungen, die letztlich zu wesentlich effektiveren und robusteren Prozessen und damit zu einer deutlichen Kostenreduzierung führen würden.^[43] Der Einsatz monolithischer Säulen bei der Produktaufreinigung ist durch ihre niedrige Kapazität limitiert. In einigen Fällen hat sich die Verwendung von Membranen als sehr effizient erwiesen. Nach wie vor stehen selektive Affinitätsräger im Vordergrund des Interesses, die alkalistabile synthetische Liganden tragen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Prozessintensivierung. Ein Beispiel ist die Implementierung von kontinuierlichen Multi-Säulen-Gegenstromgradientenmethoden (continuous multi-column counter current solvent gradient purification processes), deren Wirksamkeit bereits bei der Aufreinigung mit Ionenaustauschern demonstriert wurde.^[44]

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Trennung und Isolierung von Proteinen vornehmlich an Säulen mit vernetzten Dextranen, Agarosen, Polymethacrylaten usw. durchgeführt wird. Notwendig dazu sind Säulen, die eine spezifische Selektivität aufweisen, die durch Wahl geeigneter Fließmittel und durch die Operationsbedingungen variiert und optimiert werden kann.^[45] Zu diesen Varianten gehören die Chromatographie auf Basis hydrophober Wechselwirkungen (HIC), die Chromatographie auf Basis hydrophiler Wechselwirkungen (HILIC), die Ionenaustausch-Chromatographie an Kationen- und Anionenaustauschern (IEC) und

die zahlreichen Varianten der Affinitätschromatographie (AC).^[46–48] Die aufgezählten Varianten werden im Gradientenmodus betrieben. Dazu kommt noch die Größenausschlusschromatographie (SEC), bei der Biopolymere nach Molekülgröße und -gestalt in isokratischer Arbeitsweise getrennt werden.^[46–48] Die Umkehrphasenchromatographie ist die Methode der Wahl für die Trennung von Peptidgemischen und niedermolekularen Substanzgemischen.^[46–48]

3. Die LC in der Zeit nach dem Humangenomprojekt

Ein Jahrhundertereignis in den Lebenswissenschaften war die Aufklärung des menschlichen Genoms Ende der 1990er Jahre. Venter und Mitarbeiter gelang dies mithilfe mehrerer hundert Sequencer innerhalb weniger Monate.^[49] Die Tatsache, dass das Ziel durch den Einsatz multiparalleler Kapillarelektrophoresegeräte (betrieben im Elutionsmodus) erreicht wurde, hat nicht zu den logischen Schlussfolgerungen in der weiteren Entwicklung der Trennprozesse auf diesem Gebiet geführt. Während das Genomprojekt auf der Analyse eines statischen Systems mit vier Grundbausteinen beruht, wies das darauffolgende Proteomprojekt eine wesentlich höhere Komplexität auf: Die Grundbausteine der Proteine sind ca. 20 Aminosäuren. Von den Proteinen sind etwa 100 Strukturvariationen, sog. posttranskriptionale Modifikationen, bekannt. Die Konzentrationsverhältnisse (Abundanz) umfassen einen Bereich von acht bis neun Zehnerpotenzen. Aus heutiger Sicht gesehen, wurden diese Faktoren bei der Bearbeitung des Proteoms nicht klar erkannt.

Die wichtigsten Gesichtspunkte im Bereich des Proteomprojekts lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die chemischen Bestandteile weisen eine große Strukturbandbreite auf: von Kohlenhydraten, Nucleotiden, Nucleosiden, Polynucleotiden, RNA und DNA über Aminosäuren, Peptide und Proteine bis hin zu Glycoproteinen.
- Es handelt sich um eine extrem hohe Zahl solcher Bestandteile (> 1 Million).
- Die Konzentrationsverhältnisse (Abundanz) umfassen einen Bereich von $1:10^9$.
- Der Bereich der Molekülmassen reicht von hundert bis zu mehreren Millionen Dalton.
- Es liegen Bestandteile mit sehr geringen Strukturunterschieden und in sehr geringen Konzentrationen vor, beispielsweise glycosylierte und phosphorylierte Derivate, die jedoch eine hohe biologische Relevanz aufweisen.
- Die Zahl der detektierbaren Substanzen steigt exponentiell bei gleichzeitig abnehmender Konzentration.

Wenn man diese Tatsachen auf die anstehenden Trennprobleme projiziert, wäre der Einsatz automatischer LC-Systeme die logische Konsequenz – stattdessen wurde die zweidimensionale Gelektrophorese auf Gelpatten verwendet. Die getrennten Bestandteile wurden anschließend mit hoch empfindlichen Farbstoffen angefärbt und die Spots (oder Punkte) mithilfe von Robotern entnommen und in ein Massenspektrometer überführt. Diese Methode wurde im Laufe der Jahre derart perfektioniert, dass sie heute zu den

meistangewendeten in der Proteomforschung zählt.^[50] Bemerkenswerte Fortschritte gab es insbesondere bei der Herstellung der Gele, bei den Anfärbemethoden und der Probennahme mit Robotern sowie beim Verdau der Protein-Spots und der Extraktion entstandener Peptidgemische. Diese Gemische wurden im Anschluss mithilfe von Nano-LC an mit mikropartikulären Umkehrphasen gepackten Quarzkapillaren oder an monolithischen Quarzsäulen getrennt, und die Bestandteile wurde massenspektrometrisch detektiert. Die Datenanalyse der MS-Spektren erfolgte mit Mascot-Suchmaschinen unter Verwendung primärer Proteindatenbanken. Die Treffer mit solchen Suchmaschinen sind gewöhnlich hoch und ein Maß für statistische Sicherheit für die berechneten Peptidsequenzen. Diese Vorgehensweise weist jedoch eine Reihe von Nachteilen auf:

- Es ist keine Detektion von kleinen Proteinen und Peptiden möglich.
- Die Massenbeladbarkeit der zweidimensionalen (2D-) Gele ist sehr eingeschränkt.
- Die Detektion niedrig abundanten Proteine ist durch die begrenzte Beladbarkeit limitiert.
- Die Trennkapazität, charakterisiert durch die Zahl der getrennten Komponenten, beträgt ungefähr 50000.
- Verschiedene posttranskriptionale Modifikationen eines Proteins erscheinen an verschiedenen Stellen des Gels. Dies führt zur Verringerung der Empfindlichkeit der Methode und erhöht die Komplexität.
- Die beschriebene Vorgehensweise ist äußerst zeitaufwändig und erfordert entsprechend geschultes Personal. Eine automatische Analyse ist nicht möglich.

Bei kritischer Betrachtung dieser Einschränkungen verspricht die LC in den Bereichen, in denen die 2D-Gelelektrophorese ihre Grenzen hat, ein großes Anwendungspotenzial. Dies gilt uneingeschränkt für die Umkehrphasen-LC nach dem Verdau der Spots.

Grundsätzlich ermöglicht die LC eine hohe Flexibilität der Trennung bei gleichzeitig vollautomatischer Durchführung. Dies wird an erster Stelle durch die Verfügbarkeit einer breiten Selektivitätspalette von Säulen erreicht.

Ein weiterer, wesentlicher Gesichtspunkt ist die Möglichkeit, über die Säulendimensionen die Beladbarkeit des Trennsystems zu steuern. Dies ist bei der 2D-Gelelektrophorese nicht möglich. Die quantitative Bestimmung ist bei komplexen Proben oft problematisch. Auch bei der LC ist die Handhabung von Proben mit hoher Abundanz schwierig und erfordert große Erfahrung. Die Schlüsseltechnologie ist eine Kombination von automatischem Probentransfer, der Auswahl geeigneter Säulen und dem Einsatz optimaler Elutionsbedingungen, die den komplexen Proben angepasst ist. Kurzum bedeutet dies ein

intelligentes und effizientes multidimensionales LC-System mit integrierter Probenaufbereitung.^[51]

In der Folge sollen die Strategien zur Abreicherung und Anreicherung von Analyten in Systemen mit hoher Abundanz diskutiert werden. Die meisten flüssigen biologischen Proben enthalten große Mengen bekannter Proteine wie Albumin und Immunglobuline, die die Effektivität des Trennsystems beeinträchtigen und die Detektion von niedrig abundanten Analyten nahezu unmöglich machen. Es gibt eine Reihe von Maßnahmen, diese hoch abundanten Proteine mithilfe von Affinitätschromatographie im Rahmen der Probenaufbereitung selektiv zu entfernen oder abzureichern.^[52] Während Affinitätsäulen mit biospezifischen Liganden in verdünnten Lösungen üblicherweise äußerst selektiv gegen Analyten sind, vermindert sich diese Selektivität in konzentrierten Lösungen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Affinitätsäulen mit Antikörpern oder synthetischen Farbstoffen als Liganden entwickelt, um Albumin aus humanem Serum möglichst quantitativ abzureichern. Diese Methoden erwiesen sich als sehr effektiv, besonders in Bezug auf eine hohe Bindungskapazität für Albumin und im Hinblick auf eine lange Lebensdauer der Säulen, allerdings auf Kosten der Selektivität.^[53] Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige der handelsüblichen Kits zur Albuminabreicherung. Die Daten zeigen, dass Albumin in der Tat in hohem Maße abgereichert wird. Inwieweit dabei niedrig abundant Proteine mit entfernt werden, wurde bisher nicht berichtet.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Detektion von niedrig abundanten Peptiden und Proteinen durch die Gegenwart von hoch abundanten Proteinen wie Albumin und IgG beeinträchtigt wird. Eine Abreicherung mithilfe selektiver Affinitätsäulen zeigt zum Teil gute Ergebnisse, allerdings lässt die Reproduzierbarkeit zu wünschen übrig, wenn in niedriger Konzentration vorliegende Spezies quantitativ bestimmt werden sollen. In der Praxis erfolgt die Probenaufbereitung häufig manuell durch Festphasenextraktion.

Das Verfahren ist damit äußerst zeitaufwändig und wenig reproduzierbar. Dementsprechend hat es nicht an Versuchen gefehlt, die Probenaufbereitung zu automatisieren. Ein Beispiel dafür sind die so genannten Restricted-Access-Mate-

Tabelle 1: Gehalt [%] von Serumproteinen in der ungebundenen Proteinfaktion und Gehalt von Albumin nach der Abreicherung von hoch abundanten Proteinen.^[54]

Hersteller	Anteil von Proteinen nach der Abreicherung [%]	CV [%]	minimale Abreicherung von Albumin [%]
Aurum Serum Protein Kit (Bio-Rad)	15.4	26.7	96.3
ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit (Merck Biosciences)	31.2	7.7	97.4
Multiple Affinity Removal Column (Agilent Technologies)	12.8	8.4	99.4
POROS Affinity Depletion Cartridges (Applied Biosystems)	19.0	9.9	96.0
Albumin and IgG Removal Kit (Amersham Biosciences)	66.5	6.2	99.5

rialien (RAM, Materialien mit eingeschränkter Zugänglichkeit). Bei diesen handelt es sich um poröse Kieselgele mit eingestelltem mittlerem Poredurchmesser (beispielsweise 6 nm) und einer Partikelgröße von ca. 25 µm. Die Partikel sind so hergestellt, dass sie eine duale Oberflächenfunktionalisierung aufweisen: Die äußere Oberfläche enthält chemisch gebundene, elektroneutrale Diolgruppen, die innere Oberfläche in den Poren weist hydrophobe Liganden auf, z. B. C₁₈-, C₈- oder C₄-Alkylgruppen. Die Partikel vereinen zwei Trennmechanismen der LC in einem Korn, nämlich den Größenausschluss von großen (Protein-)Molekülen in wässrigen, gepufferten Lösungen und die Umkehrphasen-LC von kleinen Peptiden und Proteinen, die wegen ihrer geringeren Größe in das poröse Korn mit den hydrophoben Liganden hineindiffundieren können. Es gibt mehrere Bauprinzipien und Konzepte, solche Materialien herzustellen.^[55] Das Konzept wurde erfolgreich auf die Probenaufbereitung von Peptiden und Proteinen erweitert.^[56] Dabei wurden statt der hydrophoben Liganden Kationen- oder Anionen-Austauschergruppen an der inneren Oberfläche gebunden.^[56] Im Falle eines sulfonsauren Kationenaustauschers (abgekürzt RAM-XDS; Abbildung 4) mit einem mittleren Poredurchmesser von 6 nm werden globuläre Proteine mit 15 000 Da ausge-

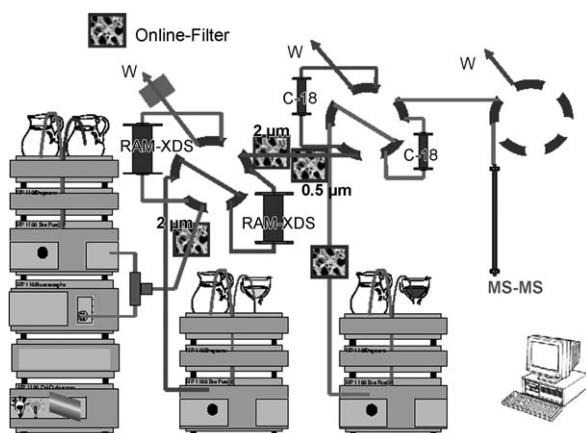


Abbildung 4. Automatisches zweidimensionales LC-System mit integrierter Probenaufbereitung für die Profilanalyse endogener Peptide aus Körperflüssigkeiten.^[51]

schlossen. Kleinere, positiv geladene Peptide und Proteine werden an der inneren Oberfläche adsorbiert und angereichert, Peptide mit negativer Ladung hingegen ausgeschlossen. Die RAM-XDS-Säulen werden beladen, gewaschen und dann mit Eluenten abgestufter Ionenstärke in Fraktionen eluiert (desorbiert). Mithilfe einer Säulenschaltung werden die Fraktionen auf eine Umkehrphasensäule, die als Auffangsäule dient, deponiert und anschließend mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten eluiert, während die RAM-XDS-Säule wieder regeneriert wird. Die Fraktionen aus der Umkehrphasensäule (Abbildung 4) werden schließlich entweder online dem Massenspektrometer zugeführt oder offline auf einer Probenträgerplatte eines Massenspektrometers deponiert und später analysiert.

Die Abmessungen der RAM-XDS-Säule können der Menge der zu analysierenden Probe angepasst werden. Die Handhabung der RAM-XDS-Säule erfolgt automatisch in der Sequenz: Beladen, Waschen, Eluieren mit linearem Salzgradienten oder einem Stufengradienten, Regenerieren, Waschen. Im Aufbau gemäß Abbildung 4 werden zwei RAM-XDS-Säulen parallel betrieben. Dies gilt ebenso für die beiden nachgeschalteten Umkehrphasenauffangssäulen. Alle Säulen sind durch den Einbau von Filtern mit einem Poredurchmesser von 2 µm gegen Verstopfung und Verunreinigungen geschützt.

Das in Abbildung 4 gezeigte zweidimensionale LC-System arbeitet automatisch und wurde für die Analyse von endogenen Peptiden aus Körperflüssigkeiten wie Urin, Serum und Plasma eingesetzt.^[51] Es wurden bis zu 1500 Peptide im Molekülmassenbereich von 500–4000 Da in sechs Stunden analysiert.

Fassen wir die Potenziale der LC in der Proteomforschung zusammen:

- Selektive Probenaufbereitung durch Festphasenextraktion. Diese kann im automatischen Modus quantitativ durchgeführt werden.
- Verfügbarkeit einer hohen Zahl von selektiven Varianten (RP, IEX, HIC, HILIC, SEC, AC).
- Integration der Varianten in ein multidimensionales System, das besonders geeignet ist, hohe Abundanzen zu kontrollieren.
- Quantitative Messungen bei automatisierter Arbeitsweise

4. Flüssigkeitschromatographie im Jahr 2010 – wo stehen wir heute?

4.1. Pharmazeutische Analytik

Pharmazeutische Analytik in Forschung und Entwicklung, Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle ist nach wie vor der größte Sektor für flüssigkeitschromatographische Anwendungen. Angestrebt werden hohe Trennleistung, schnelle Analysenzeiten und hohe Empfindlichkeit. Die Komplexität der Gemische ist deutlich niedriger als bei der Analyse von Biofluiden, z. B. in Proteomik-Anwendungen. So liegt das Konzentrationsverhältnis etwa bei 1:1000, und damit können in der Regel Umkehrphasensäulen eine ausreichende Selektivität und Kapazität bereitstellen. Massenspektrometrie spielt hier eine wesentliche Rolle und hilft, enorme Empfindlichkeiten zu erreichen. Flüssigkeitschromatographie wurde geraume Zeit nur als Probenaufreinigungsschritt für die Massenspektrometrie betrachtet. Zwar dominieren Umkehrphasenkieselgelsäulen, allerdings finden bisweilen auch Säulen mit Diol- oder Cyanmodifikationen Anwendung.^[57]

4.2. Metabolomik/Metabonomik

Metabolomik/Metabonomik ist die umfassende qualitative und quantitative Untersuchung aller kleinen Moleküle in biochemischen Prozessen, deren Ergebnisse über den Status

und die Wirkungsweise in lebenden Systemen informieren. Metabolomik stellt die umfassende und quantitative Analyse aller Metaboliten dar;^[58] Metabonomik betrachtet Veränderungen von biologischen Prozessen in humanen und Säugertiersystemen.^[58] Derzeit wird Metabolomik in vielen Wissenschaftsbereichen, von der Botanik bis zur Medizin, betrieben. Konservative Schätzungen gehen von ca. 200 000 metabolischen Substanzen bei Pflanzen aus, was ein weites Feld für die Suche nach neuen und verbesserten Produkten im medizinischen und Nahrungsmittelbereich darstellt.^[59] Außerdem könnte eine vergleichende Metabolomanalyse beim Menschen eine verbesserte Diagnostik und individualisierte Behandlung von Krankheiten ermöglichen.^[59]

GC-MS-Kopplung ist die analytische Plattform für flüchtige Analyten bei metabolischen Analysen.^[60] Hohe Abundanzen und Unterschiede in den funktionellen Gruppen hingegen erfordern viele unterschiedliche Selektivitäten, wie sie von der Flüssigkeitschromatographie bereitgestellt werden.

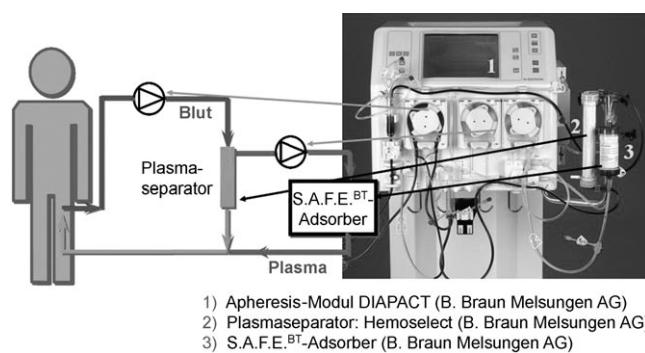
4.3. LC in klinisch-chemischer Analytik sowie bei der Therapie akuter und chronischer Erkrankungen

Nahezu unbemerkt hat die LC Anwendung in der klinisch-chemischen Analytik gefunden; man hat wandlungsfähige und effiziente Plattformen entwickelt, die zur In-vivo-Überwachung der Therapie akuter und chronischer Erkrankungen angewendet werden.

Ziel der klinischen Analytik ist die Extraktion, selektive Anreicherung und Analyse von Zielsubstanzen in Blut, Plasma, Urin und anderen Körperflüssigkeiten. In der Therapie hingegen wird die gezielte Abreicherung von Pathogenen und Toxinen angestrebt. Hierfür eingesetzte Adsorbentien sind biokompatibel mit großen Partikeldurchmessern unter Ausschluss von hochmolekularen Bestandteilen (z. B. Plasmaproteinen) und haben maßgeschneiderte Oberflächenfunktionalitäten, die selektiv Zielkomponenten anreichern. Ein Beispiel ist die Verwendung von „Materialien mit eingeschränkter Zugänglichkeit“, so genannten RAM-Phasen, die bereits in Abschnitt 3 erwähnt wurden. Vorteile von kleinvolumigen RAM-Festphasenextraktionssäulen mit Abmessungen von 20×2 mm sind 1) die direkte Injektion von Biofluiden wie Serum und Urin, 2) die direkte Kopplung mit LC-Systemen und insbesondere 3) die Möglichkeit zum Aufbau von automatisierten, gekoppelten Säulensystemen mit Beladungs-, Wasch-, Desorptions- und Regenerations schritten.

Während chromatographische Träger breite Anwendung für analytische und präparative Zwecke gefunden haben, befindet sich ihr Einsatz als medizinisches Produkt zur selektiven extrakorporalen Entfernung pathogener Substanzen im Blut oder zur selektiven intestinalen Adsorption und Ausschleusung unerwünschter Lebensmittelinhaltstoffe noch in einem frühen Entwicklungsstadium. Bei der Technik der Hämoperfusion oder Plasmapherese wird das Patientenblut oder Plasma extrakorporal über eine Chromatographiesäule zirkuliert, die endogene und/oder exogene Giftstoffe selektiv bindet und extrahiert. Das Konzept der Online-

Apherese ist vergleichsweise einfach, seine Anforderungen an die porösen Adsorbentien sind jedoch hoch. Parameter wie Spezifität, Kapazität, Partikelgröße, Flussgeometrie, Toxizität, Sterilität, Pyrogenfreiheit und Ligandenstabilität müssen evaluiert und optimiert werden, um eine sichere und effektive klinische Anwendung zu gewährleisten. Darüber hinaus müssen die Oberflächencharakteristika, die Bio- und Hämokompatibilität bestimmen, optimiert werden, sodass zelluläre und humorale Reaktionen auf den chromatographischen Trägern minimiert sind und keine signifikante Aktivierung der Fibrinolyse, des Komplementsystems und des Gerinnungssystems während der akuten oder chronischen extrakorporalen Behandlung auftreten (Abbildung 5).



- 1) Apheresis-Modul DIAPACT (B. Braun Melsungen AG)
- 2) Plasmaseparator: Hemoselect (B. Braun Melsungen AG)
- 3) S.A.F.E.-BT-Adsorber (B. Braun Melsungen AG)

Abbildung 5. Geräteaufbau extrakorporaler Behandlungssysteme. Wiedergabe mit Genehmigung von K.-S. Boos (Laboratorium für BioSeparation, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München).^[60]

Mit Blick auf eine perorale Applikation sollten solche Materialien eine hohe pH-Stabilität, eine hohe Bindungskapazität sowie einen neutralen Geschmack aufweisen und nicht im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden.

Wie in Tabelle 2 dargestellt, deckt die Behandlung mit hilfe selektiver chromatographischer Adsorbentien ein weites Spektrum von Krankheiten ab und beruht auf umfassenden klinischen Studien. Diese Verfahren werden zwar derzeit nur in wenigen Kliniken von Wissenschaftlern entwickelt, die in gleicher Weise in den medizinischen wie auch Trennwissenschaften erfahren sind, zeigen aber deutlich das Potenzial von LC-Technologien in der Therapie auf.

4.4. Proteomik

Die LC hat in der Proteomik vornehmlich in der Probenaufbereitung und dann bei der Auf trennung der Peptidgemische an Umkerphasen-Quarzkapillaren (vor der MS-Detektion) Anwendung gefunden (sog. Front-End-Technik). Bisher haben keine anderen LC-Formen, und noch weniger Kombinationen davon, Aufnahme in das Repertoire der „-omik“-Strategien gefunden, vielleicht mit Ausnahme der Glycomik-Anwendungen. Man darf daher sagen, dass die Potenziale der HPLC in diesem Bereich nicht ausgeschöpft sind. Linear-sequenzielle Ansätze der Probenhandhabung

Tabelle 2: Methoden zur Therapie akuter und chronischer Erkrankungen auf Basis chromatographischer Adsorbentien.^[a]

Erkrankung	selektive Entfernung	System	Entwicklungsstadium
Hypercholesterolemie	LDL (Low-Density-Lipoprotein)	H.E.L.P. (Heparin-basierte Eliminierung von Low-Density-Lipoproteinen)	zugelassen
Sepsis und septischer Schock	Lipopolysaccharide (LPSs), Toxine von Gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäuren (LTAs), Toxine von Gram-positiven Bakterien	S.A.F.E. ^{BT} (selektiver Adsorber für die Eliminierung von bakteriellen Toxinen; Abbildung 5)	Phase II
akutes Leberversagen	Bilirubin, Gallensäuren, aromatische Aminosäuren, bakterielle Toxine,	PROMETHEUS (fraktionierte Plasmatrennung und Adsorptionsapherese) MARS (molekulares Adsorbentien-Rezirkulierungssystem) M.I.D.A.S. (multiselektives Inline-Detoxifizierungs-Adsorptions-System)	Pilotphase Pilotphase Präklinik
Hyperphosphatämie (Dialysepatienten)	Phosphate (Gastrointestinaltrakt)	Renagel SBR 759	zugelassen Phase III

[a] Wiedergabe mit Genehmigung von K.-S. Boos (Laboratorium für BioSeparation, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München).^[60]

wie der MudPit-Ansatz werden immer noch genutzt, obwohl sie keine reproduzierbaren und quantifizierbaren Ergebnisse liefern.^[61]

Wenngleich eine Reihe von Probenaufarbeitungsmethoden entwickelt und teilweise sogar auf Basis der mehrdimensionalen LC (MD-LC) validiert wurde, ist kein wesentlicher Durchbruch in der Anwendung zu beobachten.

Verdau-basierte Ansätze (offline und online) über Trypsin und Pepsin dominieren gegenüber einer Direktanalyse von Proteinen (Abbildung 6a,b). Die Direktstrategie gemäß Abbildung 6c ist auf die Extraktion endogener Peptide ausgerichtet. Außer wenigen auf dem Affinitäts- oder RAM-Prinzip beruhenden Säulen können alle derzeitigen Chromatographiesäulen keine Mehrfach-Direktinjektionen von Bioflüssigkeiten handhaben.

Insgesamt haben die LC-Anwendungen der akademischen „-omik“-Forschung nur marginalen Eingang in die

„industrielle“ Forschung, d. h. in die Praxis diagnostischer und pharmazeutischer Firmen, gefunden. Gründe hierfür mögen die immer noch zu hohe Komplexität des Themas sowie die Notwendigkeit der intensiven Abstimmung zwischen Instrument und Materialchemie sein.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Entwicklung der LC während des letzten Jahrhunderts zeigt die enorme Breite der Methodik. Allerdings wird die Bearbeitung grundlegender Fragen, die den drei Pfeilern gemeinsam sind, nur fragmentarisch betrieben.

Die konventionelle HPLC kleiner Moleküle in der pharmazeutischen Analytik und Metabolomik hat einen hohen Reifegrad erreicht, und die Standardanwendungen können auf einer Routinebasis gehandhabt werden.

Chromatographische Trennungen im präparativen und Produktionsmaßstab finden Anwendung in Form der SMB-Technologie zur Isomerentrennung, z. B. von *m*- und *p*-Xylol als Baustein der PET-Kunststoffherstellung (PET = Polyethylenterephthalat) und der Enantiomerentrennung von Wirkstoffen ebenso wie in Form komplexer Mehrstufen-Reinigungsprozesse bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern oder rekombinanten Proteinen usw. Hier muss an der Verringerung der Kosten bei gleichzeitiger Erhöhung der Kapazitäten gearbeitet werden, was höher integrierte und effizientere Ansätze erforderlich macht.

Das größte Gebiet mit Stimulationsbedarf ist dasjenige der Lebenswissenschaften, wo die Auseinandersetzung mit instabilen und sich verändernden Zielmolekülen die verfügbaren Technologien an ihre Grenzen bringt. Will man dieses Gebiet vorantreiben, sind zwingend erhebliche Fortschritte in Material- und Systemdesign notwendig. Entsprechende Forschungen werden jedoch weitgehend nutzlos bleiben, wenn sie nicht mit einer viel stärker interdisziplinären Ausbildung in Hochschule und Industrie einhergehen.

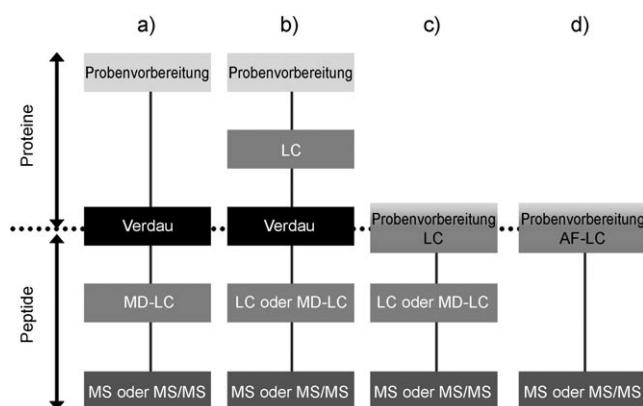


Abbildung 6: Abläufe in Proteomik-LC-Anwendungen.^[51] a) Bottom-up-Ansatz; b) Top-down-Ansatz; c) selektive Probenaufbereitung, direkt kombiniert mit chromatographischer Trennung (Verdau-freie Strategie); d) Probenaufbereitung mit Affinitätssäulen, direkt gekoppelt mit MS.

Es wurde demonstriert, dass sich die multidimensionale LC (MD-LC) für Hochabundanz-Szenarien in der Analytik eignet, wenn sie automatisiert und optimiert betrieben wird. MD-LC könnte sich als unverzichtbar für die Umsetzung quantifizierbarer und validierbarer Proteomik-Konzepte, z. B. im Biomarker-Bereich, erweisen.

Ein anderer Technologietrend ist hinsichtlich der Evaluierung kontinuierlicher Prozessoptionen für die Downstream-Prozessierung von Antikörpern, die so genannte Bio-SMB, zu beobachten. Hier treffen Entwicklungsaktivitäten einer Reihe von Systemanbietern mit wachsendem Interesse vonseiten der biopharmazeutischen Industrie an diesem Thema zusammen.

Interessanterweise ist dies eines der wenigen positiven Beispiele für eine Querbeziehung zwischen den drei Säulen der Chromatographie (siehe Abbildung 1). Die Ingenieurgetriebene Suche in den 1960er Jahren nach effektiveren Trennprozessen für petrochemische Produkte führte zur Entwicklung der SMB-Technologie, die anschließend sehr schnell auch für die Prozessierung von Lebensmitteln eingesetzt wurde. Die Entwicklung chiraler stationärer Phasen zur enantioselektiven Trennung von optischen Isomeren mithilfe analytischer HPLC in den 1980er Jahren, kombiniert mit einer verkleinerten Version der SMB-Anlagen in den 1990er Jahren, lieferte eine kosteneffiziente Produktionstechnologie für die Herstellung enantiomerenreiner Pharmazeutika. Nun wird die Adaption des gleichen SMB-Konzepts für die Isolierung von Antikörpern aus komplexen Fermentationsbrühen wahrscheinlich eine kosteneffizientere Aufarbeitung von Biopharmazeutika ermöglichen.

Ein ähnlicher Weg könnte sich auch für die Bewältigung des „Glyco-Problems“ auftun: Im Wissen um die Bedeutung des Glycosylierungsmusters für die Wirksamkeit von Biopharmazeutika könnten die analytischen Ansätze, die auf Mixed-Mode-Mechanismen beruhen, mittelfristig auf den Prozessmaßstab übertragen werden.

Die Validierung von Methoden und Assays wird ein Kernpunkt in der Diskussion um verbesserte Ansätze für künftige diagnostische und therapeutische Konzepte sein. Besonders für die Entwicklung der auf Biomarkern basierenden Stratifizierung (Bildung von Patientengruppen mit besserer Behandlungseffizienz und geringeren Nebenwirkungen) ist eine Validierung unabdingbar.

Dies passt zur bereits vor Jahren gestarteten Process-Analytical-Technology(PAT)-Initiative der Food & Drug Administration (FDA), die ein besseres Prozessverständnis fordert. Unter anderem bedarf es dazu eines viel tieferen Einblicks in die grundlegenden Wechselwirkungen, unter anderem mithilfe modellbasierter Ansätze, die schlussendlich „vorhersagbare“ Prozessdesign- und Überwachungsstrategien ermöglichen sollen, um die Prozessrobustheit und -sicherheit zu verbessern.

Abkürzungen

AC	Affinitätschromatographie
Bio-SMB	Simulated-Moving-Bed-Technologie, angewendet auf die Reinigung biotherapeuti-

C ₁₈	scher Produkte
CV	chemisch gebundene <i>n</i> -Octadecylgruppe
Da	Variationskoeffizient
DAC	Dalton
DNA	dynamisch-axiale Kompression
ESI	Desoxyribonucleinsäure
GC	Elektronenspray-Ionisierung
H.E.L.P.	Gaschromatographie
HIC	Heparin-Mediated Elimination of Low Density Lipoproteins
HILIC	Hydrophobic-Interaction-Chromatographie
HPLC	Hydrophilic-Interaction-Chromatographie
IEC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IgG	Ionenaustauschchromatographie
LC	Immunglobulin
LDL	Flüssigkeitschromatographie
LPS	Low-Density-Lipoprotein
LTA	Lipopolysaccharid
Mab	Lipoteichonsäure
MALDI	Monoklonaler Antikörper
MARS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung
MD-LC	Molecular Adsorbent Recirculation System
M.I.D.A.S.	Multidimensionale Flüssigkeitschromatographie
MS	Multiselective In-line Detoxifying Adsorption System
MudPiT	Massenspektrometrie
PAT	Multidimensional Protein Identification Technology
PEEK	Process Analytical Technology
PROMET	Polyetheretherketon
HEUS	Fractionated Plasma Separation and Adsorption Apheresis
PTM	posttranslational Modifikation
RAM	Restricted Access Material, Material mit eingeschränkter Zugänglichkeit
RAM-XDS	RAM-Ionenaustauscher
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase
RP-LC	Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie
SAFE ^{BT}	Selective Adsorber For Elimination of Bacterial Toxins
SEC	Größenausschlusschromatographie
SMB	Simulierte, sich bewegendes Bett
SPE	Festphasenextraktion
UPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Wir danken den Kollegen und Freunden, die uns beim Verfassen des Manuskripts unterstützt und Bildmaterial zur Verfügung gestellt haben: Prof. K. S. Boos (München) für den Abschnitt 4.3 über LC in der klinisch-chemischen Analytik und in der akuten und chronischen Therapie, Dr. R.-M. Nicoud (Novasep, Frankreich) und Dr. G. Rozing (Agilent Technologies, Waldbronn) für die Überlassung der Abbildungen 2 bzw. 3 sowie Prof. A. I. Liapis (Universität Missouri-Rolla,

US), Prof. J. C. Janson (Uppsala, Schweden) und Dr. J. Alvarez (Madrid, Spanien) für anregende Diskussionen.

Eingegangen am 11. Dezember 2009

- [1] U. Wintermeyer in *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques* (Hrsg.: K. K. Unger), Marcel Dekker, New York, **1990**, S. 1–42.
- [2] L. S. Ettre, *Chapters in the evolution of chromatography*, Imperial College Press, London, **2005**.
- [3] J. C. Janson, J.-A. Jönsson in *Protein Purification* (Hrsg.: J. C. Janson), VCH, Weinheim, **2010**, im Druck.
- [4] R. Kuhn, *Naturwissenschaften* **1931**, *19*, 306–310.
- [5] L. S. Ettre, *LC GC Europe* **2001**, *14*, 72–74.
- [6] J. F. K. Huber, *Ber. Bunsen-Ges.* **1973**, *77*, 179–184.
- [7] K. K. Unger, R. Skudas, M. M. Schulte, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 393–415.
- [8] Sorbex Technology Services, UOP LLC, 25 East Algonquin Road, Des Plaines, IL 60017-5017, USA, E-Mail: info@uop.com.
- [9] J. A. Johnson, R. A. Oroskar in *Zeolites as Catalysts, Sorbents and Detergent Builders* (Hrsg.: H. G. Karge, J. Weitkamp), Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, **1989**, S. 451–467.
- [10] R. M. Nicoud, *Simulated Moving Bed: Basics and Applications*, Institute National Polytechnique de Lorraine, Frankreich, **1993**.
- [11] M. Schulte, K. Wekenborg, W. Wewers in *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents* (Hrsg.: H. Schmidt-Traub), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 173–214.
- [12] S. G. Allenmark, *Chromatographic enantioseparation: methods and applications*, Wiley, New York, **1992**.
- [13] Y. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6971–6973.
- [14] Y. Okamoto, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1072–1095; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1020–1043.
- [15] J. Dingenen, K. K. Unger in *Handbuch der HPLC, Teil 2, Präparative Säulenflüssig-Chromatographie* (Hrsg.: K. K. Unger), GIT Verlag, Darmstadt, **1994**, S. 11–78.
- [16] K. K. Unger in *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents* (Hrsg.: H. Schmidt-Traub), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 93–95.
- [17] U. D. Neue, *HPLC columns – Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, New York, **1997**, S. 235–250.
- [18] J. R. Mazzeo, U. D. Neue, M. Kele, R. S. Plumb, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 460–465 A.
- [19] P. D. McDonald, U. D. Neue, *The quest for ultra high performance in liquid chromatography*, Waters Corporation, Milford, USA, **2009**.
- [20] R. D. Dandeneau, E. H. Zerenner, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1979**, *2*, 351–356.
- [21] W. Jennings, J. Pesek, *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 913–914.
- [22] E. Rapp, U. Tallarek, *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 453–470.
- [23] a) J. Mayer-Rosenkranz, J. P. Kutter, U. D. Neue, E. S. Grumbach, M. Kele, J. R. Mazzeo, D. Sievers in *Miniaturization in HPLC made to measure: A practical handbook for optimization* (Hrsg.: S. Kromidas), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 467–505; b) *Nano chromatography and nano capillary electrophoresis: pharmaceutical and environmental analysis* (Hrsg.: I. Ali, Y. H. Y. Abdoul-Enein, V. K. Gupta), Wiley, Hoboken, NJ, **2009**.
- [24] a) N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **2002**, *960*, 85–96; b) K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Nunez, C. Yang, T. Kawabe, T. Igekami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8741–8750.
- [25] *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3. Aufl. (Hrsg.: W. M. A. Niessen), Taylor and Francis Group, LLC, **2006**, S. 600.
- [26] S. Ehlert, K. Kraiczek, J.-A. Mora, M. Dittmann, G. Rozing, U. Tallarek, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5945–5950.
- [27] a) K. Nakanishi, S. Motowaki, N. Soga, *Bull. Inst. Chem. Res.* **1992**, *70*, 144–151; b) K. Nakanishi, *J. Porous Mater.* **1997**, *4*, 67–112.
- [28] R. Skudas, B. A. Grimes, M. Thömmes, D. Lubda, K. K. Unger, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1191*, 57–66.
- [29] S. Hjertén, J. L. Liao, R. Zhang, *J. Chromatogr. A* **1989**, *473*, 273–275.
- [30] a) *Monolithic Materials: preparation, properties and applications* (Hrsg.: F. Sveč, T. B. Tennikova, Z. Deyl), Elsevier, Amsterdam, **2003**; b) G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 101–168.
- [31] Halo-columns made by Advanced Material Technologies, Wilmington, DE, US.
- [32] S. Hjertén in *A century of separation science* (Hrsg.: H. J. Isaaq), Marcel Dekker, New York, **2002**, S. 421–452.
- [33] J. Porath, P. Flodin, *Nature* **1959**, *183*, 1657–1659.
- [34] F. E. Regnier in *A century of separation science* (Hrsg.: H. J. Isaaq), Marcel Dekker, New York, **2002**, S. 265–276.
- [35] a) A. I. Liapis, M. A. McCoy, *J. Chromatogr.* **1992**, *599*, 87–104; b) A. I. Liapis, M. A. McCoy, *J. Chromatogr.* **1994**, *660*, 85–96; c) A. I. Liapis, Y. Xu, O. K. Grosser, A. Tongta, *J. Chromatogr.* **1995**, *702*, 45–47.
- [36] a) K. K. Unger, G. Jilge, R. Janzen, H. Giesche, J. N. Kinkel, *Chromatographia* **1986**, *22*, 379–380; b) K. K. Unger, G. Jilge, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* **1986**, *359*, 61–72; c) G. Jilge, R. Janzen, H. Giesche, K. K. Unger, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 71–80; d) R. Janzen, K. K. Unger, H. Giesche, J. N. Kinkel, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 91–97.
- [37] J. Curling, U. Gottschalk, *BioPharm Int.* **2007**, *20*, 10–19.
- [38] W. S. Hancock, *High Performance Liquid Chromatography in biotechnology*, Wiley, New York, **1990**, S. 2.
- [39] J. C. Janson, P. Hedman, *Adv. Biochem. Eng.* **1982**, *25*, 43–99.
- [40] F. M. Wurm, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1393–1398.
- [41] E. Langer, J. Ranck, *BioProcess Int.* **2006**, *4*, 14–18.
- [42] G. K. Sofer, L. C. Chirica, *BioPharm Int.* **2006**, *19*, 48–55.
- [43] T. M. Przybycien, N. S. Pujar, L. M. Steele, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 469–478.
- [44] L. Aumann, M. Morbidelli, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 1043–1054.
- [45] A. Jungbauer, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1065*, 3–12.
- [46] M. T. W. Hearn, *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides – Contemporary topics and applications*, VCH Publishers, New York, **1991**.
- [47] C. T. Mant, R. S. Hodges, *High performance liquid chromatography of peptides and proteins – separation, analysis and conformation*, CRC, Boca Raton, **1991**.
- [48] F. E. Regnier, K. Gooding, *HPLC of biological macromolecules*, Marcel Dekker, New York, **2002**.
- [49] C. Venter et al., *Science* **2001**, *291*, 1304–1351.
- [50] A. Schrattenholz, *Methoden der Proteomforschung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- [51] E. Machtejevas, K. K. Unger, R. Ditz in *Proteomics in drug research* (Hrsg.: M. Hamacher, K. Marcus, K. Stühler, A. van Hall, B. Warscheid, H. E. Meyer), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 89–111.
- [52] a) Y. Y. Wang, P. Cheng, D. W. Chan, *Proteomics* **2003**, *3*, 243–248; b) N. I. Govorukhina, A. Keizer-Gunnink, A. G. J. van der Zee, S. de Jong, H. W. A. de Bruijn, R. Bischoff, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1009*, 171–178.
- [53] S. Andrecht, J. Anders, R. Hendriks, E. Machtejevas, K. K. Unger, *Laborwelt* **2004**, *5/2*, 4–7.
- [54] K. Björhall, T. Miliotis, P. Davidsson, *Proteomics* **2005**, *5*, 307–317.
- [55] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. B* **2004**, *801*, 141–156.

- [56] a) K. S. Boos, C. H. Grimm, *TrAC Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 175–180; b) K. Georgi, K. S. Boos, *Chromatographia* **2006**, *63*, 523–531.
- [57] M. Kagan, M. Chlenov, S. Melnikov, O. McConnell, A. C. Bach, G. Carter, A. Failli, T. J. Caggiano, J. S. Shumsky, D. Lubda, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 704–719.
- [58] a) Handbook of Metabolomics and Metabonomics (Hrsg.: J. C. Linden, J. K. Nicolson, E. Holmes), Elsevier, Amsterdam, **2007**; b) *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling* (Hrsg.: L. W. J. Griffiths), The Royal Society of Chemistry, Oxford, **2008**.
- [59] a) W. B. Dunn, D. I. Ellis, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285–294; b) R. J. Bino, R. D. Hall, O. Fiehn, J. Kopka, K. Saito, J. Draper, B. J. Nikolau, P. Mendes, U. Roessner-Tunali, M. H. Beale, R. N. Trethewey, B. M. Lange, E. S. Wurtele, L. W. Sumner, *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 418–425.
- [60] a) N. M. Cassiano, V. V. Lima, R. V. Oliveira, A. C. de Pietro, Q. B. Cass, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1462–1469; b) P. Schuff-Werner, D. Seidel, *Jpn. J. Apheresis* **1997**, *16*, 149–153; c) S. Bengsch, K.-S. Boos, D. Nagel, D. Seidel, D. Inthorn, *Shock* **2005**, *23*, 494–500; d) A. Santoro, S. Faenza, E. Manchini, *Transplant. Proc.* **2006**, *38*, 1078–1082; e) J. Stange, T. Hassanein, R. Mehta, S. Mitzner, R. H. Bartlett, *Artif. Organs* **2002**, *26*, 103–110.
- [61] a) D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates III, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5683–5690; b) M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates III, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 241–247.