

Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin

Application of mass spectrometry in clinical chemistry and laboratory medicine

Georg Martin Fiedler*, Uta Ceglarek, Jan Lembcke, Sven Baumann, Alexander Leichtle and Joachim Thiery

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig
AöR, Liebigstrasse 27, 04103 Leipzig

Zusammenfassung

Die Anwendung massenspektrometrischer Analysemethoden gewinnt in der klinischen Labordiagnostik zunehmend an Bedeutung. In den vergangenen Jahren stieg die Anzahl von Applikationen in der Laboratoriumsmedizin, Pharmakologie und Toxikologie exponentiell an. Das Anwendungsspektrum reicht gegenwärtig von der Bestimmung einzelner klinisch-chemischer Analyte bis hin zur qualitativen und quantitativen Multiparameteranalyse. Die Kombination der Tandem-Massenspektrometrie mit Atmosphärendruck-Ionisationstechniken stellt heute infolge der hohen analytischen Sensitivität und Spezifität, der Robustheit, der geringen Analysekosten und insbesondere der Möglichkeit von Hochdurchsatzanalysen die Methode der Wahl für die Anwendung in der klinischen Labordiagnostik dar. Gegenwärtig wird diese Plattform bereits routinemäßig für das Neugeborenen-screening auf angeborene Stoffwechseldefekte, für das therapeutische Drugmonitoring sowie in der Hormondiagnostik eingesetzt. Darüber hinaus finden SELDI-TOF- oder MALDI-TOF-Verfahren Anwendung bei der Suche nach neuen Biomarkern im Rahmen der klinischen Proteomics.

Ziel dieser Übersicht ist es, eine kurze Darstellung zum technischen Entwicklungsstand der Massenspektrometrie und zu aktuellen Applikationen in der labormedizinischen Diagnostik zu geben.

*Korrespondenz: Dr. med. Georg Martin Fiedler, Universitätsklinikum Leipzig, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Liebigstraße 27, 04103 Leipzig
Tel.: 0341-972-2200
Fax.: 0341-972-2209
E-mail: martin.fiedler@medizin.uni-leipzig.de

Schlüsselwörter: Massenspektrometrie; Neugeborenen-screening; therapeutisches Drugmonitoring; Proteomics; Tumormarker; LC-MS/MS; MALDI-TOF.

Abstract

The use of mass spectrometry (MS) as an analytical tool becomes increasingly important in clinical laboratory diagnostics. In the last decade there has been an exponential growth in clinical laboratory, pharmacology, and toxicology applications. At present, the spectrum of MS applications ranges from the measurement of single analytes to qualitative and quantitative multiparametric analyses.

Combining tandem mass spectrometry with atmospheric pressure ionization techniques offers high analytic sensitivity and specificity, robustness, and the option for high throughput analyses at low running costs. Today, this analytical platform is already used in routine clinical laboratory to screen for inherited metabolic disorders in newborns, for therapeutic drug monitoring, and for hormone profiling. In addition, SELDI-TOF and MALDI-TOF techniques are used for clinical proteomic pattern diagnostics. This short review will give an overview of the current status of mass spectrometry techniques, established applications in clinical laboratory diagnostics, and the perspectives for future developments in laboratory medicine.

Keywords: mass spectrometry; newborn screening; therapeutical drug monitoring; proteomics; tumor markers; LC-MS/MS; MALDI-TOF.

Einleitung

In den vergangenen 10 Jahren kam es zu einer sprunghaften Entwicklung massenspektrometrischer Applikationen für die klinische Labordiagnostik. Dies ist vor allem auf die rasche methodische und apparative Weiterentwicklung sowie die sinkenden Anschaffungskosten zurückzuführen. Insbesondere die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) in Kombination mit neuartigen Techniken der Atmosphärendruckionisation ebneten den Weg

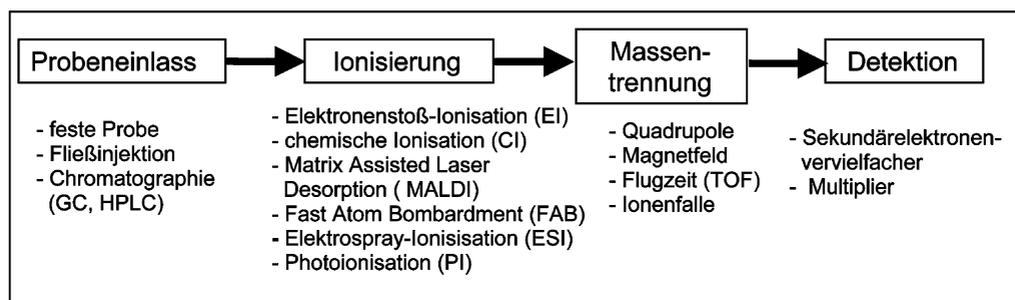


Abbildung 1 Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers.

in die labormedizinische Praxis [1]. Während beim Einsatz konventioneller Kopplungstechniken (z.B. Gaschromatographie-Massenspektrometrie, GC-MS) arbeitsintensive Probenvorbereitungsschritte und zeitaufwendige chromatographische Trennungen notwendig sind, ermöglicht die neue analytische Plattform (LC-MS/MS) eine simultane Bestimmung klinisch relevanter, nieder- und hochmolekularer Biomoleküle meist ohne aufwendige Probenvorbereitung. Sie erfüllt damit die Anforderungen an eine schnelle klinische Hochdurchsatzanalytik. Allerdings wird die Verbreitung der Massenspektrometrie im klinischen Routinelabor gegenwärtig durch die nach wie vor sehr aufwendige und technisch anspruchsvolle Bedienung und Wartung der sehr empfindlichen Analysengeräte limitiert. Kritisch für die Anwendung in klinischen Laboratorien ist zudem das Fehlen standardisierter Testkits, Kalibratoren und Kontrollen. Derzeit orientieren sich die klinischen Einsatzgebiete der Massenspektrometrie daher vor allem an folgenden Kriterien:

1. Klinisch notwendige Labordiagnostik, für die bisher keine oder nur sehr eingeschränkte Alternativen zur Tandem-MS Plattform bestehen (z.B. Sirolimus, Everolimus, Metanephine im Plasma, Cortisol).
2. Klinisch notwendige Labordiagnostik, für die aus Qualitätsgründen und zur Hebung der Wirtschaftlichkeit die Tandem-MS Plattform eine optimale Alternative bietet (z. B. Immunsuppressiva Ciclosporin A und Tacrolimus).
3. Hochdurchsatzdiagnostik von klinisch relevanten Analyten zur frühzeitigen Prävention von Stoffwechselerkrankungen, z. B. Aminosäuren- und Fettsäurenstoffwechseldefekte im Rahmen des neonatalen Screenings.

Massenspektrometrische Analyseverfahren in der klinischen Chemie

Die Anfänge der Massenspektrometrie gehen auf Thomson (1910) und Aston (1919) zurück, die diese Methode zum Nachweis isotoper Elemente nutzten. In den 50er Jahren fand die Massenspektrometrie weite Verbreitung für die Strukturaufklärung anorganischer Verbindungen.

Ab 1960 wurden Massenspektrometer für die Untersuchung kleiner organischer Moleküle eingesetzt. 1985 wurden erstmals Biopolymere untersucht. Heute steht eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Geräte für die verschiedensten analytischen Fragestellungen zur Verfügung. Haupteinsatzgebiete waren in der Vergangenheit die Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie die pharmazeutische Industrie, die die Massenspektrometrie seit mehr als 10 Jahren routinemäßig einsetzen.

Massenspektrometrische Trennprinzipien

Die Massenspektrometrie ist ein physikalisches Analyseverfahren zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Das Prinzip aller Massenanalytoren beruht auf der Auftrennung positiv oder negativ geladener Ionen proportional zu ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z). Das Massenspektrometer erfasst somit das "Gewicht" von ionisierten Molekülen und deren Fragmenten. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Massenspektrometers mit den derzeit kommerziell angebotenen technischen Varianten für die Ionisierung, Ionentrennung und den Nachweis der Analyte. Die Wahl des eingesetzten Mess-Systems orientiert sich an der Probenzusammensetzung, der Polarität und der Molekülgröße der Analyten.

Die durch den Ionisierungsprozess gebildeten Ionen werden im elektrischen Feld mit Hilfe einer Vielzahl verschiedener Trennsysteme nach ihrer Masse getrennt (siehe Abbildung 1). Für die klinische Applikation sind vor allem die **Quadrupoltechnik** und die **Flugzeit-Massenspektrometrie (Time of Flight, TOF)** von Bedeutung [1, 2].

Die erfassbaren Massenbereiche im Quadrupol-Analysator liegen bei maximal 4.000 Dalton. An vier gegenüberliegenden parallel angeordneten Stabelektroden wird eine Gleichspannung angelegt, die von einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird. Durch die Variation der Gleich- und Wechselspannung durchfliegen jeweils nur die Ionen einer bestimmten Masse den Quadrupol und gelangen zum Detektor. Alle anderen Ionen werden entladen und durch das Pumpsystem abgesaugt. Die Schaltung von zwei Quadrupol-Massenfiltern in Reihe wird als **Tandem-MS** bezeichnet. Hierbei werden im ersten Quadrupol durch das Masse/Ladung Verhältnis

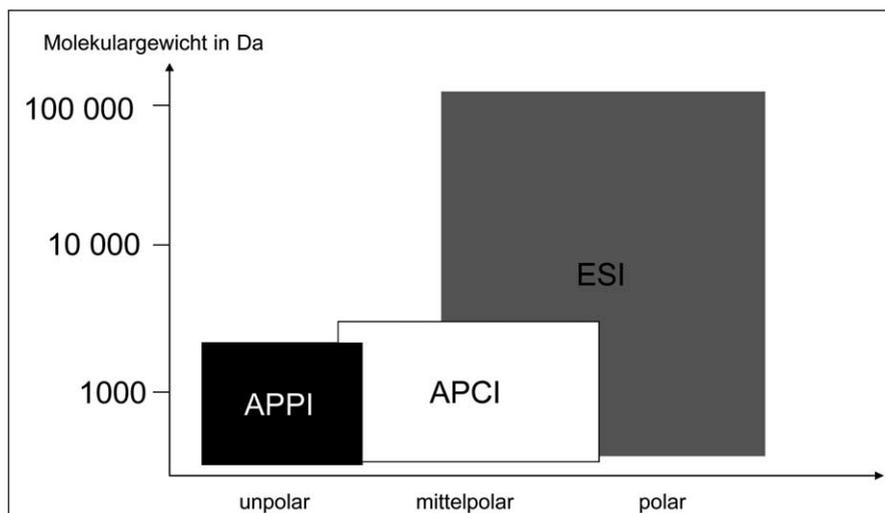


Abbildung 2 Anwendungsbereiche der Atmosphärendruckionisationstechniken Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI), Atmosphärendruck-chemische Ionisation, Elektrosprayionisation (ESI).

definierte Vorläuferionen (z. B. Molekülionen) erzeugt und detektiert. Durch die anschließende Kollision mit Stickstoff oder Argon werden diese Vorläuferionen fragmentiert. Die hierbei gebildeten substanzspezifischen Fragmente (Produktionen), die vergleichbar sind mit einem Fingerabdruck der einzelnen Analyte, werden im zweiten Quadrupol detektiert. Das Tandem-MS ermöglicht somit neben der genauen Quantifizierung des Analyten im 1. Quadrupol eine präzise Identifizierung des Analyten anhand seiner spezifischen Fragmente im 2. Quadrupol. Somit wird eine besonders hohe analytische Sensitivität und Spezifität erreicht. Will man nur einen bestimmten Analyten erfassen, so werden die beiden Massenfilter auf ein definiertes Masse/Ladungs-Verhältnis (Massenübergang) eingestellt (single reaction monitoring, SRM). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Massenfilter infolge der schnellen Scanzeiten eine Vielzahl von definierten Massenübergängen erfassen (multiple reaction monitoring, MRM). Auf diese Weise wird die gleichzeitige Messung verschiedener Analyte ermöglicht. So kann in der Praxis beispielsweise die Konzentration der Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus und Sirolimus gleichzeitig aus einer Patientenprobe bestimmt werden.

Bei der **Flugzeit-Massenspektrometrie (Time of Flight, TOF)** wird die massenabhängige Flugzeit von Ionen auf einer definierten Strecke gemessen. Der erfassbare Massenbereich liegt zwischen 100–100.000 Da. Damit sind TOF-Geräte hervorragend für die Analytik von hochmolekularen Biomolekülen wie Peptide, Proteine und Lipide geeignet und kommen vor allem bei der Analyse des Proteoms (Proteomics) zum Einsatz. Seit ca. 2 Jahren sind auch TOF-TOF Systeme sowie Kombinationen zwischen Quadrupol und TOF (so genannte Hybridsysteme) kommerziell erhältlich. In Kombination mit der MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

finden diese analytischen Plattformen ihre Anwendung auf dem Gebiet der DNA- und Proteinstrukturanalytik.

Ionisierungstechniken

Voraussetzung für die massenspektrometrische Trennung im Massenanalysator ist die Ionisierung der Analyten. Für die Analytik von Biomolekülen werden vor allem die "schonenden" Atmosphärendruckionisationstechniken (API) sowie die MALDI eingesetzt. Die API stellt die Basis für die Kopplung von Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) dar.

Man unterscheidet drei verschiedene technische Varianten, die Elektrosprayionisation (ESI), die Atmosphärendruck-chemische Ionisation (APCI) und die Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI). Die Verwendung der verschiedenen API Ionisationstechniken hängt, wie in Abbildung 2 dargestellt, hauptsächlich von der Molekülgröße und Polarität des Analyten ab [1, 2]. Das ursprüngliche Prinzip der API wurde bereits 1968 beschrieben [3].

ESI ist ein sehr niedrigenergetischer (1–10 eV) oder "weicher" Ionisationsprozess, der die Bildung intakter Quasimolekülionen (z.B. $[M+H]^+$) mit einer oder mehreren Ladungen ermöglicht. Bei der ESI wird das Eluentengemisch durch eine Kapillare kontinuierlich versprüht. Die Erzeugung der Ionen lässt sich vereinfacht in 3 Schritte unterteilen (Abbildung 3):

1. Erzeugung geladener Tröpfchen
2. Erhöhung der Ladungsdichte durch Lösungsmittelverdampfung
3. Freisetzung der Ionen durch Coulomb-Explosion.

Die gelösten Ionen werden durch elektrische Kräfte in die Gasphase transferiert, um danach in das Hochvakuum des Massenanalysators einzutreten. Die räumliche Entkopplung von Ionisierung und massenspektrome-

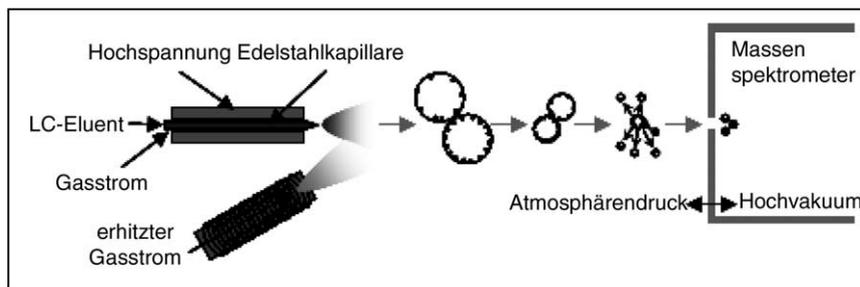


Abbildung 3 Prinzip der Elektrospray-Ionisation (Ionspray, Applied Biosystems).

1. Erzeugung geladener Tröpfchen. 2. Erhöhung der Ladungsdichte durch Lösungsmittelverdampfung. 3. Ionen emittieren durch Coulomb-Explosion.

trischer Detektion bietet gegenüber der Ionisierung im Vakuum für die Kombination mit der LC Vorteile. Außerdem sind aufgrund von Mehrfachladungen Analysen von Molekülen bis zu 40.000 Da möglich. In Abbildung 3 ist das ESI-Interface der Fa. MDS-SCIEX, welches die Bezeichnung Ionspray trägt, schematisch dargestellt. Das Nebulizer-Gas dient einer pneumatisch unterstützten Vernebelung des HPLC-Eluents. Die Art und Effektivität der Bildung von Ionen in der Gasphase werden von der Flussrate, der Zusammensetzung und vom pH-Wert des Eluents, von der Konzentration des Analyten in der Lösung und von den Matrixbestandteilen der Probe bestimmt.

APCI und APPI erlauben die Ionisierung semipolarer bzw. unpolare Analyte. Hierdurch wird die Palette massenspektrometrisch messbarer Analyte deutlich erweitert. Bei der APCI wird der Analyt zusammen mit dem Lösungsmittel durch eine beheizte Kapillare geführt (300–400°C), wobei es zur vollständigen Verdampfung des Gemisches kommt. Danach wird das verdampfte Lösungsmittel/Analyt-Gemisch über eine Corona-Entladungsnadel geführt. Durch elektrische Entladung wird unmittelbar vor dem Einlass zur Hochvakuumregion des MS ein Plasma mit Bildung von Primärionen wie N_2^+ , N_4^+ und H_3O^+ erzeugt, welche mit den Analyten reagieren.

Bei der APPI erfolgt ebenso wie bei der APCI die Verdampfung des Analytgemisches in einer beheizten Kapillare. Zusätzlich wird ein zweites Lösungsmittel (Dopand) zur Unterstützung der Ionisierung durch UV-Licht zugeführt. Zunächst werden geladene Dopand-Moleküle gebildet, die durch Protonen- bzw. Ladungstransfer indirekt den Analyten ionisieren.

Bei der **MALDI** trägt man ein Analyt-Matrix-Gemisch auf eine spezielle Metallplatte (Target) auf. Die Auswahl der Matrix erfolgt entsprechend der Größe der zu untersuchenden Analyt-Moleküle. Nach Kokristallisation wird das Analyt-Matrix-Gemisch in das Vakuum überführt. Durch gepulsten Laserbeschuss mit definierter Wellenlänge (UV-Laser, 3–15 ns) erfolgt die Absorption des Laserlichts durch die Matrix. Die Matrixsubstanz wird durch die Absorption der Laserenergie elektronisch angeregt. Photoionisierte radikalische Matrixmoleküle erzeugen anschließend durch Protonentransfer elektrisch geladene Analytmoleküle.

Alle Ionisationstechniken, vor allem die ESI, können durch Matrixeffekte beeinflusst werden. In der klinischen Anwendung können eine Vielzahl von Substanzen wie z.B. Heparin oder Weichmacher von Abnahmesystemen und Pipettenspitzen die Ionisation unterdrücken oder verstärken [4]. Darüber hinaus wird die Effektivität der Ionisation durch den Salzgehalt des Eluents bzw. der Probenmatrix stark beeinflusst, da Natrium- und Chloridionen mit der Ionisation des Analyten konkurrieren. Aus diesem Grund sollten nur salzfreie Eluatgemische eingesetzt werden.

Infolge der schonenden und fragmentarmen Ionisierung konnten mit ESI und MALDI erstmals große Biomoleküle wie Peptide und Proteine untersucht werden. Die Bedeutung von ESI und MALDI zeigt sich auch an der sprunghaften Zunahme an Publikationen zum Thema "Massenspektrometrie" nach ihrer Entwicklung und Einführung (Abbildung 4). Zudem erhielten ihre Entwickler Fenn (ESI) und Tanaka (MALDI) 2002 den Nobelpreis für Chemie.

MS-Applikationen in der klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Im Folgenden soll an ausgewählten Applikationen (Neugeborenencreening, Drug Monitoring und Endokrinologie) der routinemäßige Einsatz im klinischen Labor vorgestellt werden. Das Anwendungspotential der MALDI-TOF-Technologie soll am Beispiel der klinischen Proteomics demonstriert werden.

Neonatales Screening

Einer der großen Fortschritte in der Präventivmedizin wurde durch die Einführung des Neugeborenencreenings (NGS) in den 60er Jahren erzielt [5, 6]. Dies betrifft das Screening auf angeborene metabolische und endokrine Störungen aus Trockenblutproben von Neugeborenen. Bleiben diese Stoffwechseldefekte unerkannt und unbehandelt, können schwere geistige und motorische Störungen resultieren. Bei rechtzeitiger Diagnostik und Beginn der Therapie in den ersten Lebenstagen kann

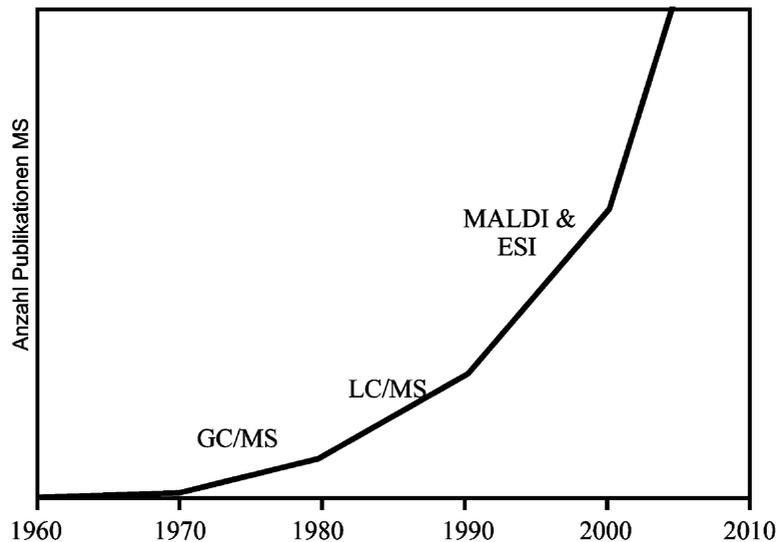


Abbildung 4 Publikationen mit Massenspektrometrie seit 1960.

dagegen eine altersgerechte Entwicklung der Kinder erreicht werden.

Seit Juli 2000 wird am Screeningzentrum der Universität Leipzig die ESI-MS/MS routinemäßig für das erweiterte Screening auf Stoffwechseldefekte mit einem derzeitigen Probenaufkommen von ca. 100.000 Proben/Jahr eingesetzt [7]. Automatisierbarkeit, kurze Analysenzeiten (1,5 Minuten) und die daraus resultierende hohe Probenkapazität bei geringen Analysekosten prädesti-

nieren dieses Messverfahren für die Durchführung von Screeninguntersuchungen aus Trockenblutproben.

In Abbildung 5 ist das Chromatogramm einer unauffälligen Trockenblutprobe mit charakteristischen MS-Spektren der Aminosäuren (Neutral Loss $m/z = 102$ sowie MRM) und Acylcarnitinen (Precursor Ion $m/z = 85+$) dargestellt. Mittels Multiparameteranalyse (16 Aminosäuren, Carnitin und 27 Acylcarnitine sowie 30 Ratios) wird in einem Untersuchungsgang entsprechend den Richtlinien

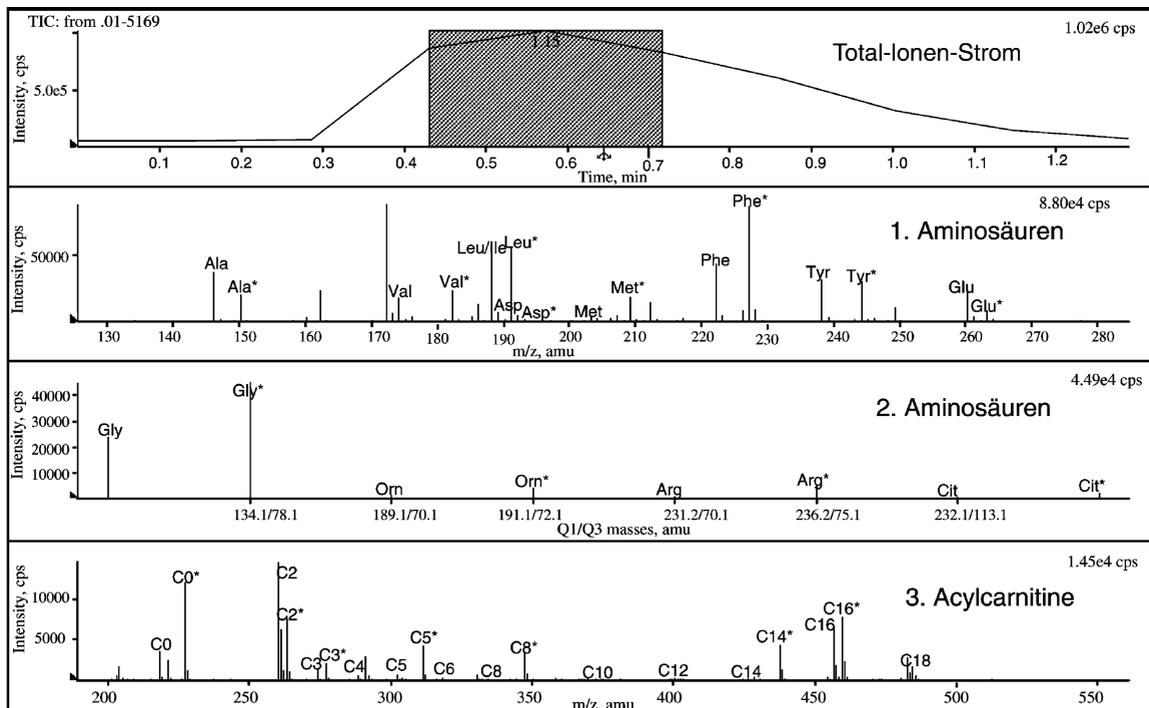


Abbildung 5 Chromatogramm einer ESI-MS/MS Analyse von Trockenblutspots auf angeborene Stoffwechselerkrankungen im Rahmen des Neugeborenen Screenings.

*deuterierter Standard.

Tabelle 1 Empfohlene Zielkrankheiten des Neugeborenen-Screenings in Deutschland.

Angeborene Erkrankungen	Screening mit Tandem-MS
Phenylketonurie	ja
Hypothyreose	nein
Androgenitales Syndrom	nein
Biotinidase-Mangel	nein
Klassische Galaktosämie	nein
Ahornsirupkrankheit	ja
Fettsäureoxidationsdefekte	ja
Karnitinzyklusdefekte	ja
Glutarazidurie	ja
Isovalerianazidurie	ja

der Screeningkommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin nach den in Tabelle 1 zusammengefassten Stoffwechseldefekten bei Neugeborenen gesucht. Darüber hinaus können prinzipiell über 20 weitere Stoffwechseldefekte nachgewiesen werden, für die die Effizienz eines Screenings bislang allerdings noch nicht nachgewiesen werden konnte. Mit der ESI-MS/MS Plattform wurde darüber hinaus erstmals die Diagnostik von angeborenen Störungen der Fettsäureoxidation und des Carnitinzyklus möglich [8]. Diese Erkrankungen können zu schweren Stoffwechselkrisen mit irreversiblen neurologischen Schädigungen führen und wurden als eine mögliche Ursache des plötzlichen Kindstodes erkannt. Die Möglichkeit der präsymptomatischen Diagnostik bei solchen Patienten unterstreicht

den präventiven Charakter dieser Untersuchungsmethode. Dabei konnte mit einer Vorverlegung des Probenentnahmezeitpunktes ohne Beeinflussung der diagnostischen Sicherheit auch dem Trend zur immer kürzeren stationären Verweildauer der Neugeborenen entsprochen werden [9]. In Tabelle 2 sind alle seit Beginn des erweiterten NGS mit ESI-MS/MS am Screeningzentrum Leipzig entdeckten Stoffwechseldefekte und die Recallraten zusammengefasst (189.456 Untersuchungen). Insgesamt ergibt sich eine Häufigkeit der gefundenen Stoffwechseldefekte von 1:2272, zusammen mit den im konventionellen Screening erfassten Zielkrankheiten (Hypothyreose, adrenogenitales Syndrom, klassische Galaktosämie und Biotinidasemangel) liegt die Häufigkeit der behandelbaren angeborenen Endokrinopathien und metabolischen Störungen bei 1:1824 [10].

Therapeutisches Drug Monitoring

Beim Einsatz von Medikamenten mit einem geringen therapeutischen Index, bei denen eine schlechte Dosis-Wirkungsbeziehung besteht, ist ein therapeutisches Drug Monitoring sinnvoll. Insbesondere bei organtransplantierten Patienten ist eine individuelle Einstellung der immun-suppressiven Therapie infolge der hohen intra- und interindividuellen pharmakokinetischen Variabilität notwendig [11]. Ziel hierbei ist es, eine Überdosierung und damit die Gefahr toxischer Nebenwirkungen der Immunsuppressiva bzw. eine Unterdosierung mit dem

Tabelle 2 Ergebnisse des Neugeborenen-Screenings mit TMS am Screeningzentrum des Universitätsklinikums Leipzig (189.456 Untersuchungen im Zeitraum 2000 bis 2003).

Stoffwechselstörung	Recall-Rate (%)	Patienten	diagnostische Parameter bzw. Konzentrationsverhältnisse
Hyperphenylalaninämie	0,05	36	Phe ↑, Phe/Tyr ↑
Homozystinurie	0,08	3	Met ↑, Met/Phe ↑
Mittelkettiger Azyl-CoA-Dehydrogenasen-Mangel (MCAD)	0,03	25	C8 ↑, C8/C10 ↑, C8/C12 ↑
Überlangkettiger Azyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (VLCAD)	0,04	1	C14 ↑, C14:1 ↑, C16 ↑, C16:1 ↑
Propionazidämie	0,1	6	C0 ↓, C3 ↑, C3/C0 ↑, C3/C16 ↑
Isovalerianazidurie	0,03	3	C0 ↓, C5 ↑, C5/C8 ↑
Karnitintransporter-Defekt	0,02	1	C0 ↓, AC ↓
3-Methyl-Krotonyl-Carboxylase-Mangel (3-MCC)	0,04	22	C5OH ↑

Abkürzungen:

Phe = Phenylalanin	C10 = Dekanoylkarnitin
Tyr = Tyrosin	C12 = Dodekanoylkarnitin
Met = Methionin	C14 = Tetradecanoylkarnitin
AC = Azylkarnitine (gesamt)	C14:1 = Tetradecenoylkarnitin
C0 = freies Karnitin	C16 = Hexadecanoylkarnitin
C3 = Propionylkarnitin	C16:1 = Hexadecenoylkarnitin
C5 = Isovalerylkarnitin	↑ = Parameter überschreitet oberen Grenzbereich (<i>cut-off</i>)
C5OH = Hydroxy-Isovalerylkarnitin	↓ = Parameter unterschreitet unteren Grenzbereich
c8 = Oktanoylkarnitin	

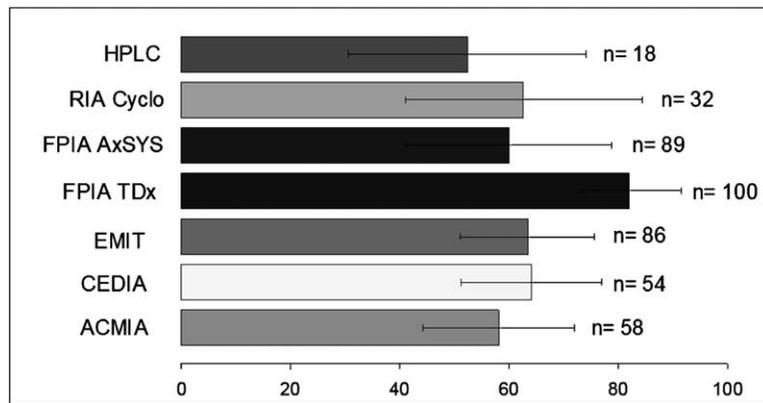


Abbildung 6 Vergleich der Messergebnisse einer EDTA Blutprobe nach NTx zwischen der HPLC-Methodik (inkl. LC-MS/MS) und Immunoassays mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern für das therapeutische Drugmonitoring von CsA.

Risiko der Transplantatabstoßung zu vermeiden. Im Klinikalltag werden für die Routinemessungen von **Ciclosporin A (CsA)** und **Tacrolimus (FK506)** hauptsächlich Immunoassays mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern eingesetzt, die eine unterschiedliche analytische Spezifität aufweisen. Daher ist insbesondere bei der Beurteilung der CsA-Spiegel zu beachten, dass in Abhängigkeit vom verwendeten Immunoassay kreuzreagierende Metabolite des CsA unterschiedlich erfasst werden. Dies kann bei den CsA-Spiegeln im Vergleich zur HPLC-Referenzmethode zu Differenzen von bis zu 50% führen (Abbildung 6). Ein Vergleich von CsA-Spiegeln verschiedener Labore darf daher, vor allem bei Verlaufskontrollen, nur in Kenntnis der verwendeten analytischen Methode erfolgen. In den letzten Jahren wurde durch Kombination der **Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)** eine sehr präzise neue analytische Plattform für das TDM entwickelt, die zudem die simultane Quantifizierung der Immunsuppressiva CsA, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus unter Hochdurchsatzbedingungen ermöglicht und somit den in der Transplantationsmedizin zunehmend verwendeten Multi-Drug-Regimen gerecht wird [12]. Die hohe analytische Sensitivität und Spezifität erlauben eine exakte Bestimmung der Immunsuppressiva. Kreuzreagierende Metabolite haben bei Anwendung dieser analytischen Plattform keinen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse. Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm einer simultanen Bestimmung der Immunsuppressiva CsA, FK 506 und Sirolimus mittels on-line Solid Phase Extraction (SPE)-LC-ESI-MS/MS. In einer Gesamtanalysenzeit von 3 Minuten erfolgen die on-line Matrixabtrennung, die chromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion. An unserem Institut wird diese Technik seit September 2002 wochentäglich routinemäßig für Tacrolimus und Rapamycin eingesetzt. Die Befundrücklaufzeit beträgt maximal 3 Stunden, wodurch eine effiziente Betreuung auch der ambulanten Patienten sichergestellt wird. Inzwischen wurde nach einer um-

fangreichen Evaluation auch die CsA-Analytik auf die massenspektrometrische Plattform umgestellt.

Neben der Analyse von Immunsuppressiva besteht inzwischen auch die Möglichkeit einer Bestimmung von Antidepressiva, Neuroleptika, Hypnotika (Flunitrazepam), oraler Antikoagulation, HIV-Protease-Inhibitoren, Amiodaron, Finasterid und anderer Medikamente im Plasma sowie die simultane Quantifizierung von Opioiden, Kokain und deren Metabolite im Urin [13–19].

Die bisherige Entwicklung massenspektrometrischer Analysemethoden zum Drug Monitoring lässt erwarten, dass in Zukunft eine Vielzahl weiterer Applikationen für Medikamente folgen wird. Interessant ist die methodische Plattform vor allem auch für Medikamente, die im Rahmen einer Kombinationstherapie verwendet werden.

Endokrinologische Parameter

Ein klassischer Anwendungsbereich chromatographischer Trennmethode im klinischen Labor ist die Bestimmung von Katecholaminen und deren Metaboliten in Plasma und Urin im Rahmen der Phäochromozytomdiagnostik [20]. Die Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin sowie den Metaboliten Metanephrin, Normetanephrin und Vanillinmandelsäure erfolgt durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Kombination mit elektrochemischer Detektion (HPLC-ECD). Diese Methoden erfordern eine aufwendige Probenvorbereitung und lange chromatographische Analysenzeiten. Um eine diagnostische Spezifität und Sensitivität von über 95% zu erzielen, ist es notwendig, sowohl Adrenalin und Noradrenalin als auch deren Metabolite Metanephrin und Normetanephrin sowohl im Urin als auch im Plasma zu bestimmen [21]. Während für die Bestimmung der Katecholamine im Plasma und Urin sowie für Metanephrin und Normetanephrin im Urin kommerzielle Testkits erhältlich sind, ist die Bestimmung von Metanephrin und Normetanephrin in Plasma infolge der sehr geringen Konzentrationen äußerst aufwändig und störanfällig [22]. Die Anwendung der Kopplung von LC mit der ESI-MS/

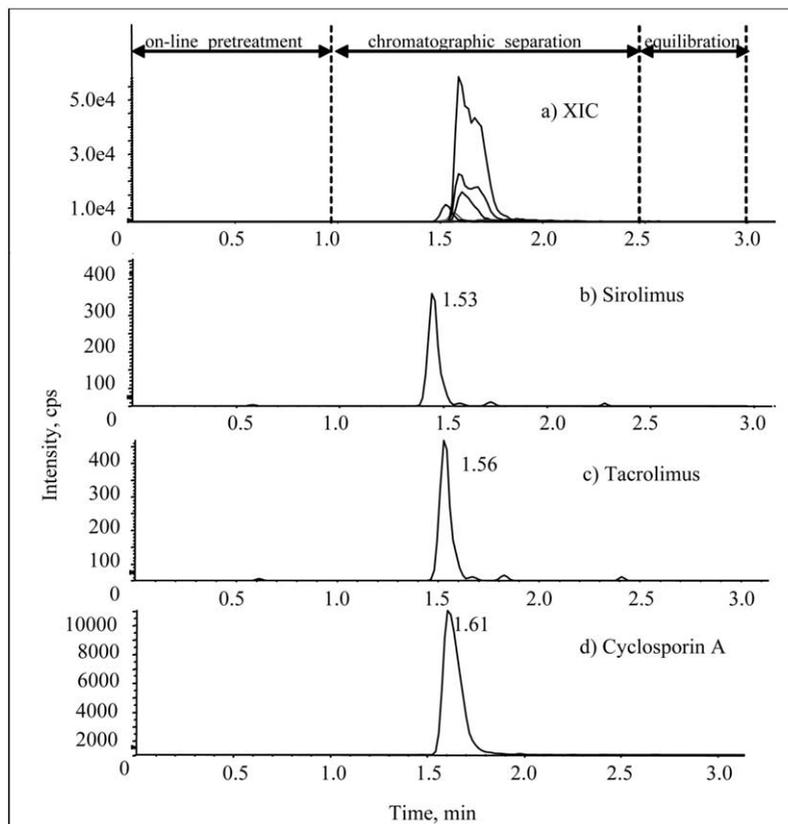


Abbildung 7 On-line SPE-LC-ESI-MS/MS Analyse einer EDTA-Vollblutprobe nach Hämolyse und Proteinpräzipitation.

MS wurde 2002 für die Bestimmung von Methanephrin und Normethanephrin im Urin beschrieben [23]. Im vergangenen Jahr folgte eine Applikation zur Bestimmung von Vanillinmandelsäure [24]. Aktuell wurde eine Methode beruhend auf einer Kopplung von LC mit APCI-MS/MS vorgestellt, die als Alternative zur HPLC eine präzise, schnelle und spezifische Bestimmung von freiem Metanephrin und Normethanephrin im Plasma ermöglicht [25].

Neben der massenspektrometrischen Analyse von Katecholaminen und ihren Metaboliten, wurden aktuell LC-MS/MS Applikationen publiziert, die eine schnelle und simultane Analyse von Östradiol und Östron im Plasma bzw. die Bestimmung von Kortisol und Kortison im Urin erlauben [26, 27]. Diese Entwicklung lässt einen deutlichen Zuwachs an weiteren Applikation mit zunehmender Ablösung der immunologischen Verfahren in der klinischen Labordiagnostik erwarten.

Klinische Proteomics

Nach Abschluss des humanen Genom-Projekts richtet sich der Fokus des wissenschaftlichen Interesses zunehmend auf die funktionellen Produkte der Genexpression [28]. Vor allem die Analyse der Protein-/Peptidzusammensetzung von Zellen, Geweben und des Blutes ermöglicht eine präzisere Aufklärung von physiologischen

und pathophysiologischen Zellfunktionen sowie ein besseres Verständnis der Entwicklungsprozesse von Erkrankungen. Damit verbunden ist die Hoffnung, neue diagnostische Biomarker zu entdecken. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei das Proteom. Das **Proteom** wird definiert als das zu einem bestimmten Zeitpunkt unter exakt definierten Bedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster des Organismus, welches den aktuellen Stoffwechsellzustand reflektiert, der durch vielfältige Faktoren, Wechselwirkungen und Umgebungsparameter beeinflusst wird [29]. Die Analyse des Proteoms bezeichnet man als **Proteomics**. Im Gegensatz zu genetischen Untersuchungen, die nur das statische Genom (30.000–40.000 Gene) erfassen, ermöglicht Proteomics die Untersuchung des ausgesprochen dynamischen Proteomprofils des Organismus. Hierbei werden insbesondere auch die funktionell sehr wichtigen post-translationalen Protein- und Peptidmodifikationen erfasst. Besondere methodische Probleme ergeben sich gegenwärtig bei der Proteomanalyse vor allem aus der sehr großen Anzahl von Peptiden/Proteinen, die von zahlreichen Einflussgrößen und Störfaktoren beeinflusst werden. Dies stellt besondere Anforderungen an die analytische Plattform und die Bioinformatik. Während die Proteomanalyse in der Pharmaforschung bereits breite Anwendung gefunden hat, hält sie in der klinischen Labordiagnostik erst seit ca. 3 Jahren Einzug, wobei sie

sich gegenwärtig noch ausschließlich in der wissenschaftlichen Entwicklung befindet. Hauptsächlich verantwortlich für die zunehmende Bedeutung der Proteomics sind die rasanten Entwicklungen im Bereich der präanalytischen Protein-/Peptidfraktionierung, der Massenanalytik und der Bioinformatik. Diese ermöglichen es trotz aller Einschränkungen, dass heute bereits eine sehr präzise Analyse von komplexen Proteommustern im Plasma/Serum, Urin und Liquor von Patienten durchgeführt werden kann. Von besonderem klinischen Interesse ist hierbei insbesondere die Identifizierung einzelner Proteine oder Proteinmuster, die als potentielle Biomarker mit der Ursache, dem Beginn, der Progression oder dem therapeutischen Ansprechen einer Erkrankung assoziiert sind [30–33].

Als analytische Plattform der klinischen Proteomics dienen gegenwärtig vor allem die SELDI-TOF und MALDI-TOF Technologie. Sie sind hervorragend geeignet, um eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine und Peptide zu identifizieren. Wesentliche Voraussetzung für die massenspektrometrische Proteomanalyse von Plasma-/Serumproben sind jedoch schnell durchführbare und automatisierbare Methoden zur Protein-/Peptidfraktionierung und Probenreinigung, die eine Reduktion der Protein-/Peptidkomplexität und eine Vermeidung von Kontaminationen ermöglichen. Zu diesem Zweck hat die Fa. Ciphergen eine auf Chiptechnologie basierende analytische Plattform entwickelt. Die Probenvorbereitung kann auch mit Hilfe einer von der Fa. Bruker neu entwickelten Technologie durchgeführt werden, bei der magnetische Mikropartikel zum Einsatz kommen. Das Prinzip besteht in beiden Fällen darauf, dass entweder Chips oder magnetische Mikropartikel mit unterschiedlichen chemischen (z.B. hydrophilen, hydrophoben, anionischen, kationischen oder Metallionen-) oder biologischen Bindungseigenschaften eine gezielte Gewinnung von definierten Peptid-/Proteinfraktionen aus der Plasma-/Serumprobe ermöglichen. Da die Probenvorbereitung in beiden Fällen voll automatisiert durchgeführt werden kann und nur wenig Zeit in Anspruch nimmt, ermöglicht sie die Analyse einer großen Probenzahl in kurzer Zeit und damit den Einsatz in der klinisch-chemischen Labordiagnostik.

Petricoin et al. konnten bereits am Beispiel des Ovarialkarzinoms zeigen, dass die Proteomanalyse möglicherweise eine frühzeitige serologische Tumordiagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglicht [34]. Inzwischen wurden diesbezüglich auch andere Tumorentitäten untersucht. Diese ersten klinischen Ergebnisse weisen trotz aller Einschränkungen darauf hin, dass die klinische Proteomanalyse in der modernen klinisch-chemischen Diagnostik zur Krankheitsfrüherkennung schon bald einen besonderen Stellenwert einnehmen könnte, insbesondere bei häufigen, bisher nur schwierig oder unzureichend zu erfassenden Gefäßerkrankungen, Tumoren und Stoffwechselerkrankungen.

Literatur

1. Dooley KC. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clin Biochem* 2003;36:471–81.
2. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003;337:11–21.
3. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *J Chem Phys* 1968;2240–9.
4. Mei H, Hsieh Y, Nardo C, Xu X, Wang S, Ng K, Korfmacher WA. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:97–103.
5. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003;49:1797–817.
6. Zabransky S. Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen. Wien (Österreich): Springer Verlag 2001:404pp.
7. Müller P, Ceglarek U, Stach B, Kiess QW, Bührdel P, Pfäffle R, J. T. Tandem-Massenspektrometrie (Tandem-MS) in der pädiatrischen Stoffwechsellanalytik mit einheitlichen Richtlinien für das Neugeborenen-screening in Deutschland. *Kinder und Jugendmedizin* 2003;6:38–41.
8. Vianey-Saban C, Guffon N, Delolne F, Guibaud P, Mathieu M, Divry P. Diagnosis of inborn errors of metabolism by acylcarnitine profiling in blood using tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 1997;20:411–4.
9. Ceglarek U, Muller P, Stach B, Bührdel P, Thiery J, Kiess W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:693–7.
10. Ceglarek U, Stoppsack M, Stach B, Müller P, Näke A, Hübner A, et al. Ergebnisse des sächsischen Neugeborenen-screenings 2001. *Ärztblatt Sachsen* 2003;1:12–5.
11. Armstrong VW. Principles and Practice of Monitoring Immunosuppressive Drugs. *J Lab Med* 2002;26:27–36.
12. Ceglarek U, Lembcke J, Fiedler GM, Werner M, Witzigmann H, Hauss JP, Thiery J. Rapid Simultaneous Quantification of Immunosuppressants in Transplant Patients by Turbulent Flow Chromatography combined with Tandem Mass Spectrometry (TFC-LC-MS/MS). *Clin Chim Acta* 2004 in press.
13. Gutteck U, Rentsch KM. Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1571–9.
14. Darius J, Banditt P. Validated method for the therapeutic drug monitoring of flunitrazepam in human serum using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;738:437–41.
15. Kollroser M, Schober C. Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *Clin Chem* 2002;48:84–91.
16. Crommentuyn KM, Rosing H, Nan-Offeringa LG, Hillebrand MJ, Huitema AD, Beijnen JH. Rapid quantification of HIV protease inhibitors in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electros-

- pray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003;38:157–66.
17. Kollroser M, Schober C. Determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:219–26.
 18. de Menezes FG, Ribeiro W, Ifa DR, de Moraes ME, de Moraes MO, De Nucci G. Bioequivalence study of finasteride. Determination in human plasma by high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Arzneimittelforschung* 2001;51:145–50.
 19. Dams R, Murphy CM, Lambert WE, Huestis MA. Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1665–70.
 20. Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 2004;41:17–38.
 21. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ, Young WFJ. A comparison of biochemical tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:553–8.
 22. Weise M, Merke DP, Pacak K, Walther MM, Eisenhofer G. Utility of plasma free metanephrines for detecting childhood pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1955–60.
 23. Taylor RL, Singh RJ. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. *Clin Chem* 2002;48:533–9.
 24. Magera MJ, Thompson AL, Matern D, Rinaldo P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of vanillylmandelic acid in urine. *Clin Chem* 2003;49:825–6.
 25. Lagerstedt SA, DJ OK, Singh RJ. Measurement of Plasma Free Metanephrine and Normetanephrine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Diagnosis of Pheochromocytoma. *Clin Chem* 2004;50:603–11.
 26. Nelson RE, Grebe SK, DJ OK, Singh RJ. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma. *Clin Chem* 2004;50:373–84.
 27. Taylor RL, Machacek D, Singh RJ. Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem* 2002;48:1511–9.
 28. Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003;422:226–32.
 29. Lottspeich F. Proteom analysis: a pathway to functional analysis of proteins. *Angew Chemistry International* 1999;38.
 30. Fels LM, Buschmann T, Meuer J, Reymond MA, Lamer S, Rocken C, Ebert MP. Proteome analysis for the identification of tumor-associated biomarkers in gastrointestinal cancer. *Dig Dis* 2003;21:292–8.
 31. Petricoin EF, Liotta LA. Clinical applications of proteomics. *J Nutr* 2003;133:2476S–84S.
 32. Rosenblatt KP, Bryant-Greenwood P, Killian JK, Mehta A, Geho D, Espina V, et al. Serum Proteomics in Cancer Diagnosis and Management. *Annu Rev Med* 2004;55:97–112.
 33. Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:267–75.
 34. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572–7.