

## Kongreßbericht

# Fourth International Symposium on Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences

11.–14. Mai 1982, Reichsuniversität Gent, Belgien

Das Symposium befaßte sich fast ausschließlich mit methodischen Fragen der quantitativen Massenspektrometrie. Eine große Anzahl von Hormonen, Metaboliten, und Pharmaka kann bereits mit diesen Methoden bestimmt werden. In den Vorträgen wurden die einzelnen Verfahren beschrieben, Fehlerquellen, Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Methoden mit anderen Verfahren wurden beschrieben.

### Pharmaka

Die quantitative Bestimmung der Plasmaspiegel von Pharmaka für die Therapieüberwachung oder für pharmakokinetische Studien ist ein wichtiges Anwendungsgebiet der Massenspektrometrie. Einige Methoden zur Bestimmung wichtiger Pharmaka wurden auf dem Symposium beschrieben.

*Verapamil* ist ein wichtiges *Antiarrhythmikum* mit Wirkung auf die Herzkranzgefäße. Nach oraler Medikation wird es sofort metabolisiert. Dabei entstehen hohe Plasmaspiegel N-dealkylierter Metabolite, wobei auch die Spiegel des Verapamil noch unterschiedlich hoch gemessen werden können. Taskinen und Mitarb. (Orion Pharmaceutical Co. Research Laboratories, Helsinki, Finnland) haben ein Verfahren entwickelt, in dem mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) Verapamil, seine Deuterium-beladenen Analoge und 3 N-dealkylierte Metabolite im menschlichen Serum gemessen werden können. Nach Ätherextraktion, Rückextraktion in HCl und Endextraktion mit Äther können Verapamil, N-demethyliertes Verapamil und Deuteriumbeladenen Analoge direkt, dealkylierte Metabolite nach Trifluoroacylation gemessen werden. Für jede Substanz wurde eine Empfindlichkeit im Subnanogrammbereich erreicht. Zur Erreichung einer guten Präzision war ein separater interner Standard (ein Deuterium-markiertes Analog) erforderlich.

Für die quantitative Bestimmung des *Antiasthmatikums Ketotifen* wurde eine GC-MS-Methode im SIM-Verfahren („selected ion monitoring“ = substanzspezifische Ionendetektion) entwickelt (Julien-Larose, Lavene und Kiechel, Centre de Recherches Pharmacocinétiques, Laboratoires Sandoz, Rueil-Malmaison, Frankreich). Nach Benzenextraktion wurde die quantitative Bestimmung mittels GC-MS durchgeführt. Nach Derivatisierung des Rückstands mit Heptafluorobuttersäureanhydrid wurden auch die N-demethylierten Metabolite

bestimmt. Mit der Methode konnten die therapeutischen Plasmaspiegel und das pharmakokinetische Verhalten des Ketotifen untersucht werden.

*Betaxolol*, ein neu entwickelter *beta-Blocker*, kann gaschromatographisch im ng-Bereich quantitativ bestimmt werden (Hermann, Fraisse-Andr, Thenot und Morselli, Paris). De Weerd, Beke, Verdriel und Barbier entwickelten eine GC/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von *Pinaverium-Bromid*. Es handelt sich um ein *quartäres Ammonium-Derivat mit Papaverin-ähnlicher Wirkung*. Serum wird mit Chloroform extrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Raney-Ni reduziert, mit Toluol rückextrahiert und auf einer Kieselgelsäule mit OV-101 analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Massenspektrometrie. Werte von 1 ng Pinaverium-Bromid und darüber konnten erfaßt werden.

### Metabolite und Substrate

Substrate und Metabolite verschiedenster Herkunft können durch die genannten Methoden hochempfindlich erfaßt werden. Verhalten und Stoffwechsel vieler Substanzen im Organismus können durch diese empfindlichen Methoden erst aufgeklärt werden. Bisher unbekannte Zwischenstufen bestimmter Stoffwechselketten werden entdeckt. Ein gutes Beispiel hierfür ist der Stoffwechsel der Prostaglandine. Gelpi (Instituto de Quimica Bio-Organica, Barcelona) berichtete über die methodische Entwicklung von Verfahren zur Messung der *Prostaglandine* und ihrer *Metabolite*, zunächst mit RIA-Methoden, später mit der GC-MS. Die Methoden ermöglichen auch einen Einblick in pharmakologische Wirkungen auf die PG-Synthetase und Lipoxigenase. Claeys, Coene und Van Hove (Antwerpen) untersuchten das Verhalten der Metabolite aus dem Abbau der ungesättigten Fettsäuren *Arachnidonsäure* und *Linolsäure* durch Lipoxigenase. GC-MS-Techniken wurden für die Strukturanalyse dieser Metabolite angewendet. Es zeigte sich, daß die Derivate der Arachnidonsäure in 11, 12 und 15-Position, die der Linolsäure in 9, 12 und 13-Position hydroxyliert werden. Fischer, Scherer und Weber konnten im Urin von Neugeborenen zwei Metabolite des Prostacyclin, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> und 6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF<sub>1α</sub> nachweisen. Sie verwendeten dazu die

GC-MS mit Deuterium als internem Standard. Die Werte der beiden Metabolite von Neugeborenen lagen um ein Vielfaches höher als die von Erwachsenen und fielen bis zum 5. Lebensstag mäßig ab. 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  war im Urin Erwachsener in niedrigen Konzentrationen, 6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  nur in Spuren nachweisbar. Eine Deutung dieser Befunde wurde von den Vortragenden nicht gegeben. Ein interessanter, wenig bekannter Metabolit ist die *Mandelsäure*. Im Harn Stoffwechselgesunder kommt sie in Mengen von 1–15  $\mu$ Mol pro Tag vor. Bei Phenylketonurie liegen die Werte bei 500–600  $\mu$ Mol. Eine gesteigerte Mandelsäureausscheidung findet sich außerdem bei Doping mit Pemolin, bei Vorkommen von Styrol am Arbeitsplatz, sowie bei Einnahme verschiedener Medikamente wie N-(phenyläthyl)-3,3-diphenylpropylamin und 2-(3-hydroxyphenyläthylamino)-pyridin. Die Autoren fanden bei der Phenylketonurie Blutspiegel von 5–8 ng Mandelsäure pro Analyse.

Wenig bekannte Stoffe, die im Serum, Harn und in der Galle vorkommen, sind die *Lignane*. Sie haben eine 2,3-Dibenzylbutan-Struktur. Früher wurden sie nur in Pflanzen nachgewiesen und fanden besonderes Interesse, da bestimmten Lignaneneine Hemmwirkung auf Tumorstadium zugeschrieben wurde. Die zwei wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind charakterisiert durch gc, gc-ms und Nuclear magnetic Resonanz als trans-2,3-bis(3-hydroxybenzyl)- $\gamma$ -butyrolacton (Enterolacton) und 2,3-bis(3-hydroxybenzyl)butan-1,4-diol (Enterodiol). Diese kommen in relativ großen Mengen in biologischen Flüssigkeiten vor (Ausscheidung bis zu 2 mg/Tag). Im Organismus durchlaufen sie einen enterohepatischen Kreislauf. Setchell und Mitarb. (Harrow, Middlesex; Hampstead, Großbritannien; Stockholm, Schweden) beschrieben eine Methode zum Nachweis dieser Stoffe mit GC-MS in biologischen Flüssigkeiten.

Eine weitere Domäne der GC-MS ist die Messung von Substraten und Metaboliten der klinischen Chemie als *definitive Methoden*. Solche Methoden werden vielfach als Basismethoden zur Prüfung der Zuverlässigkeit von analytischen Verfahren in der klinischen Chemie verwendet. Durch Vergleich zwischen definitiver Methode und Referenzmethode kann die Zuverlässigkeit einer Referenzmethode unter Beweis gestellt werden. Eine grundlegende Forderung ist, daß die Bias und Impräzision der definitiven Methode kleiner sein muß als die der Referenzmethode. Schaffer und Mitarb. (National Bureau of Standards, Washington) haben Isotopenverdünnungs/massenspektrometrische Methoden für *Cholesterin*, *Harnstoff* und *Harnsäure* ausgearbeitet. Sie erfüllen die Kriterien der hohen Präzision und eines fehlenden Bias, die von definitiven Methoden erwartet wird. Eine definitive Methode für Glucose mit der Isotopenverdünnungs-GC-MS wurde von Pelletier und Cadieux (Ottawa, Canada) erarbeitet. In dieser Methode werden die Methyloxim-trimethylsilyl-Derivate der Monosaccharide in einer SP-2100-Säule aufgetrennt. Vergleichsmessungen wurden mit der von der CDC (USA) vorgeschlagenen Referenzmethode für Glucose (Hexokinase-G6PDH-Methode) durchgeführt.

## Hormone und Metabolite des Hormonabbaus

Über bisher wenig bekannte *Metabolite des Stoffwechsels von Noradrenalin* berichteten Kuss, Deuringer und Schubert (Psychiatrische Klinik der Universität München und Finnigam

GmbH, Puchheim). Es ist bekannt, daß Noradrenalin im menschlichen Organismus durch die Enzyme Monoaminoxidase und Catechol-O-methyltransferase in 3-Methoxy-4-hydroxy phenylglycol (MHPG) umgewandelt wird. Dabei entsteht als Intermediärprodukt ein Vorläufer des MHPG, nämlich Dihydroxyphenyläthylenglycol (DOPEC). Die Messung der beiden Metabolite ergibt demnach ein indirektes Maß für das Noradrenalin-Turnover. Da sich die Konzentration des DOPEC schneller unter den Einflüssen des Stoffwechsels ändert als die des MHPG, ist diese Substanz als Maß des Noradrenalinstoffwechsels besonders geeignet. Da die DOPEC-Konzentration im Blut nur ein Viertel der des MHPG beträgt, ist eine sehr empfindliche Meßmethode erforderlich. Nach Reaktion mit Propionsäureanhydrid und Hexafluoroaceton entstehen stabile Derivate, die mittels der GC-MS gemessen werden können.

Auf dem Gebiet der Steroidhormone wurden ebenfalls neue Ergebnisse vorgetragen. Jonckheere und De Leenheer (Gent) haben eine definitive Methode für die Bestimmung des *Plasmacortisols* mit Hilfe der Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie ausgearbeitet. Das Prinzip ist folgendes: <sup>14</sup>C-Cortisol wird dem Serum zugesetzt und nach Einstellung des Gleichgewichts die Extraktion von Cortisol aus dem Serum und dem internen Standard durchgeführt. Nach Umwandlung in Methoxim-trimethylsilylderivate wird der Extrakt mit Hilfe der Gelchromatographie gereinigt. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe der kombinierten Kapillarschromatographie-Massenspektrometrie mit Hilfe des Verhältnisses der Peakhöhen bei m/z 605 und 607 für Probe und Standard.

Die statistische Auswertung ergab von Tag zu Tag einen VK von 0,38%, in der Serie einen solchen von 0,14%.

Zu der Gruppe der Steroidsulfate gehört das *Dehydroepiandrosteronsulfat*, (DHAS). Gaskell und Mitarb. (Altrincham, Ceshire) entwickelten ein Verfahren, das mit Hilfe der Atom-Bombardement-Massenspektrometrie die direkte Analyse der Steroidsulfate ohne vorherige Spaltung der Conjugatgruppe ermöglicht. Negative Ionenspektren von hoher Empfindlichkeit wurden erhalten. Die Proben müssen nicht mehr als 10 ng Steroidhormone enthalten. Zur Analyse des DHAS läßt sich durch Immunadsorption ein hoch gereinigter Extrakt herstellen. Das Verfahren ist wesentlich einfacher als die früher geübte Technik der Isolierung der Sulfatfraktion, Hydrolyse und Analyse der Steroide nach Derivatisierung. Siekmann und Mitarb. verwenden die GC-MS für die Messung von *Equilin* und *Östron* bei Frauen zur Therapiekontrolle. Die Steroide werden mit Äther extrahiert und durch Säulenchromatographie auf Sephadex getrennt. Derivate werden mit Heptafluorobuttersäureanhydrid gebildet. Die Esterderivate der beiden Steroide wurden auf eine Kapillarsäule, verbunden mit einem Massenspektrometer gebracht. Die Messung erfolgte mit der spezifischen Ionendetektion-Methode. Die Serumspiegel der beiden Steroide konnten mit dieser Methode genau und empfindlich verfolgt werden.

Es ist nicht möglich, in diesem Bericht auf die Einzelheiten der Methoden und auf jeden einzelnen Vortrag einzugehen. Auch dem, der nicht alle Vorträge besuchen konnte, hat das Symposium aber einen eindrucksvollen Einblick in die Fortschritte und Qualität dieser wichtigen Methoden ermöglicht.