

ÜBERSICHTSARBEIT

Massenspektrometrie in der Medizin – Stellenwert der molekularen Analytik

Michael Vogeser, Uwe Kobold, Dietrich Seidel

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Während konventionelle Verfahren wie die Fotometrie, Potenziometrie und Immunoassays aufgrund der Art der Detektion medizinisch relevante Stoffe oft ungenau erfassen, erlauben massenspektrometrische Verfahren eine höchst spezifische Stoffidentifikation auf der Ebene der jeweiligen molekularen Struktur. **Methoden:** Die Übersicht beruht auf den wissenschaftlichen und praktischen Erfahrungen der Autoren. **Ergebnisse:** Die Technik der Massenspektrometrie hat der Entwicklung der Medizin seit Jahrzehnten wesentliche Impulse gegeben, insbesondere der Arzneimittelentwicklung, der In-vitro-Diagnostik sowie der Ernährungs- und Umweltmedizin. In den vergangenen Jahren hat die medizinische Bedeutung dieser Technologie vor allem durch die Entwicklung sogenannter weicher Ionisierungstechniken und komplexer Ionenanalysen noch erheblich zugenommen. Diese sind für fast alle biologisch relevanten Moleküle anwendbar, besonders LC-Tandem-Massenspektrometrie und MALDI-TOF. **Diskussion:** Mit ihren vielfältigen Verfahren und Anwendungsfeldern stellt die Grundtechnik der Massenspektrometrie eine wesentliche Schlüsseltechnologie der biomedizinischen Forschung dar. In zahlreichen Bereichen der In-vitro-Diagnostik haben massenspektrometrische Verfahren bereits die Einführung innovativer Routineuntersuchungen ermöglicht.

Dtsch Arztebl 2007; 104(31–32): A 2194–200

Schlüsselwörter: Massenspektrometrie, Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS), Flüssigkeitschromatografie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), Proteom, Metabolom

SUMMARY

Mass Spectrometry in Medicine – the Role of Molecular Analyses

Introduction: While the accuracy of conventional analytical techniques such as photometry, potentiometry, and immunoassay in detecting clinically important substances is often limited, methods based on mass spectrometry allow highly specific detection of target compounds at the level of their respective molecular structure. **Methods:** Review based on the authors' scientific and practical experience. **Results:** Mass spectrometry has contributed significantly to the advance of medical science in recent decades, particularly in relation to drug development, in-vitro diagnostics, and nutritional and environmental medicine. Its role has widened significantly in recent years, thanks to the development of soft ionization techniques and complex ion analysis (in particular, LC-tandem mass spectrometry, and MALDI-TOF). **Discussion:** With its variety of methods and applications, the basic technology of mass spectrometry represents a key technology in biomedical research. In numerous fields of in-vitro diagnostics mass spectrometry based methods have already enabled the introduction of innovative routine analyses.

Dtsch Arztebl 2007; 104(31–32): A 2194–200

Key words: mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), proteome, metabolome

Die Massenspektrometrie ist eine physikalische Messtechnik, deren Grundlagen bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt wurden. Kontinuierliche Entwicklungen der Technologie haben seit den 1970er-Jahren und besonders innerhalb der letzten Jahre ganz wesentlich zum Fortschritt von Biochemie, Molekularbiologie und Medizin beigetragen. Einzelne Forschungsgebiete, wie zum Beispiel die Proteomanalyse (Proteomics), sind essenziell von der Massenspektrometrie abhängig. In der Medizin hat sich der Anwendungsbereich von der Forschung bis in die klinisch-chemische Routineanwendung ausgeweitet.

Massenspektrometrische Techniken erlauben Analysen von unterschiedlichsten Probenmaterialien auf dem Niveau der molekularen Struktur der jeweiligen Stoffe. Verglichen mit Messsystemen, die etwa auf der Photometrie oder auf immunometrischen Techniken beruhen, weisen massenspektrometrische Techniken damit ein besonders hohes Maß an Stoffspezifität auf.

Grundprinzipien der Massenspektrometrie

Mittlerweile finden viele unterschiedliche Analysetechniken Anwendungen, die auf massenspektrometrischen Prinzipien beruhen, und die je nach Fragestellung, Sub-

Klinikum der
Universität München,
Ludwig-Maximilians-
Universität,
Institut für Klinische
Chemie
Großhadern, München:
PD Dr. med. Vogeser,
Prof. Dr. med. Dr. h.c.
Seidel

Roche Diagnostics
GmbH, Penzberg:
Dr. rer. nat. Kobold

stanzklasse und Probenmatrix spezifische Anwendungsfelder haben. Gemeinsam sind diesen Analyseverfahren folgende Grundprozesse:

- Erzeugung von Ionen in der Gasphase (Ionenquelle)
- Trennung der Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse (m) zu Ladungszahl (z) (m/z) in elektromagnetischen Feldern (Massenanalysator; *Kasten 1*)
- Bestimmung der Teilchenzahl einzelner Ionenspezies (Ionen-Detektion).

Meist ist dem massenspektrometrischen Analysengerät eine chromatografische Probenaufbereitungseinheit vorgeschaltet (Gaschromatografie [GC] oder Flüssigchromatografie [LC]). Durch unterschiedliche Adsorption der einzelnen Komponenten eines Stoffgemischs an definierte Oberflächen wird dabei die Probe in Einzelfraktionen aufgetrennt.

Massenspektrometrische Techniken

GC-MS - „klassische“ massenspektrometrische Technik

Medizinisch relevante Anwendungen der Massenspektrometrie erlaubte seit den 1970er-Jahren erstmals die Technik der Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS). Bei dieser Technik wird ein speziell aufbereitetes Extrakt der zu untersuchenden Probe zunächst verdampft. Das entstehende Gasgemisch trennt man in einem Trägergasstrom von Helium in einer circa 30 m langen, gewickelten haarfeinen Quarzkapillare in seine Einzelkomponenten auf, die innerhalb von circa 30 min sequenziell als „Peak“ die Kapillare verlassen. Die so aufgetrennten Einzelstoffe werden in ein Hochvakuum eingeleitet und dort einem Elektronenstrahl ausgesetzt; hierbei werden die Analytmoleküle ionisiert und typischerweise in 5 bis 10 stofftypische Fragmentionen desintegriert (electron-impact-ionisation). Das so generierte Massenspektrum einer Substanz kann elektronisch mit Spektren-Bibliotheken verglichen werden (*Grafik 1*). Damit erlaubt die GC-MS die Identifikation auch von primär unbekanntem Stoffen, und unterscheidet sich damit grundlegend beispielsweise von immunometrischen Techniken.

Mit der GC-MS kann man sowohl Stoffe in biologischen Proben identifizieren als auch Stoffkonzentrationen messen.

Die GC-MS wird in der Medizin insbesondere für die Standardisierung klinisch-chemischer Analysen (als Referenzmethode für die Spezifizierung von Kalibrationsmaterialien), in der Toxikologie, in der Umwelt- und Arbeitsmedizin sowie in der Lebensmittelchemie angewandt. In der forensischen Medizin ist die GC-MS besonders wichtig, weil Analysenresultate aufgrund der hohen Spezifität juristisch verwertbar sind. Allerdings ist die Anwendung der GC-MS auf relativ wenige analytische Bereiche und Fragestellungen begrenzt geblieben. Dies beruht wesentlich darauf, dass die GC-MS nur für Stoffe anwendbar ist, die thermisch hochgradig stabil und verdampfbar sind; entsprechend sind Stoffe mit einem Molekülgewicht über 500 Da der GC-MS nicht mehr zugänglich. Außerdem erfordert die GC-MS meist eine aufwendige, mehrstufige Probenvorbereitung und die Systemhandhabung ist außerordentlich anspruchsvoll.

KASTEN 1

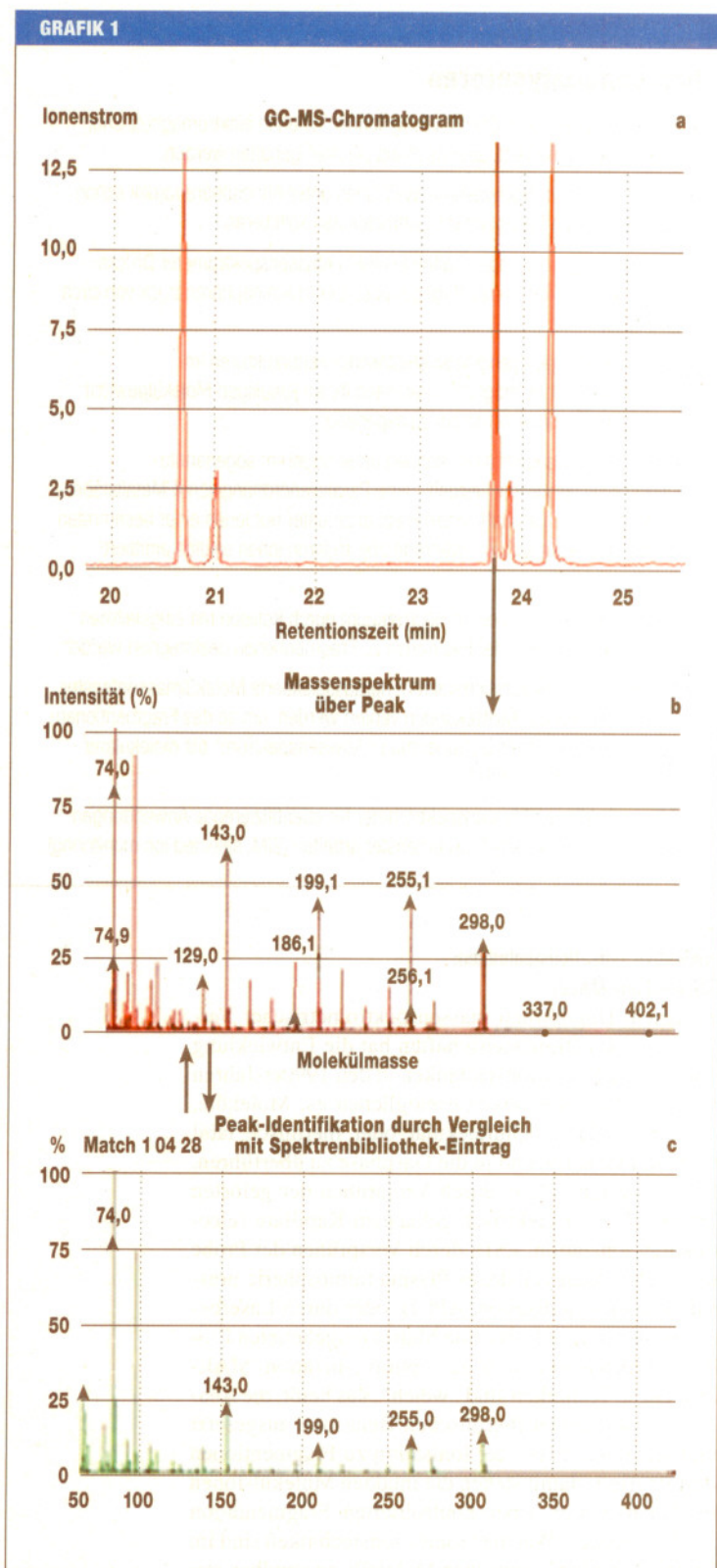
Massenanalyatoren

- Aufgrund ihrer elektrischen Ladung können Ionen in elektromagnetischen Feldern gezielt bewegt, aber auch als „Wolke“ gehalten werden.
- Dies erfordert ein Hochvakuum, weil Ionen unter Atmosphärendruck schon nach minimalen Distanzen mit Luftmolekülen kollidieren.
- Turbinen-Vakuumpumpen halten in einem Massenspektrometer Drucke von etwa 10^{-5} Torr aufrecht (gegenüber einem Atmosphärendruck von circa 740 Torr).
- Durch das Anlegen geeigneter elektrischer Feldstrukturen im Hochvakuum ist es möglich, Ionen nach ihrem jeweiligen Molekülgewicht aus einem Gesamtionenstrom zu separieren.
- Für diese „Massenfiltration“ können unter anderem sogenannte Quadrupole verwendet werden - eine Parallelanordnung von 4 Metallstäben, durch die bei einem definierten Frequenzmuster nur Ionen einer bestimmten Masse passieren können, während alle anderen Ionen seitlich emittiert werden.
- Außerdem können Ionen im Hochvakuum durch Kollision mit eingeleiteten Inertgas-Molekülen oder Elektronen zu Fragmentionen desintegriert werden.
- Das aus einem Gesamtionenstrom herausselektierte Molekülmassenfenster kann innerhalb von Millisekunden variiert werden, um so das Fragmentionenspektrum eines Stoffes aufzunehmen („Massenspektrum“ als molekularer „Fingerabdruck“; *Grafik 1*).
- Alternativ können Massenspektrometer für quantifizierende Anwendungen auch fixiert auf wenige Massenfenster arbeiten (SIM, selected ion monitoring).

Innovative Ionisationstechniken:

ESI, APCI und MALDI

Zu einem Durchbruch massenspektrometrischer Verfahren in den Biowissenschaften hat die Entwicklung innovativer Ionisationstechniken in den 1990er-Jahren geführt. Diese Techniken ermöglichen es, Moleküle, die stark polar, hochmolekular oder thermisch labil sind, zu ionisieren und in die Gasphase zu überführen. Die Ionisation erfolgt durch Versprühen der gelösten Probe aus einer elektrisch geladenen Kapillare (electrospray ionization, ESI), durch Versprühen der Probe in ein elektrisch geladenes Plasma (atmospheric pressure chemical ionization, APCI), oder durch Laserbeschuss der in eine kristalline Matrix eingebetteten Probe (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI). Diese Techniken sind „weich“, das heißt, die Analyte werden keiner thermischen Belastung ausgesetzt und nicht bereits bei der Ionisation zu Fragmentionen desintegriert; damit stehen die intakten Molekül-Ionen im Hochvakuum einer kontrollierten Fragmentation zur Verfügung. „Weiche“ Ionisationstechniken sind im Prinzip für alle biologischen Moleküle anwendbar, unabhängig von der jeweiligen Molekülmasse. Damit sind massenspektrometrische Verfahren für fast alle biologisch relevanten Stoffe anwendbar geworden, auch für makromolekulare Biopolymere (Peptide, Proteine, Nukleinsäuren). Sie können wichtige Strukturinformationen liefern, zum Beispiel Sequenzierung von



Prinzip der Stoffidentifikation bei der Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS). Im Peak eines GC-MS-Gesamtionen-Chromatograms (a) wird ein Massenspektrum (b) abgeleitet; mithilfe einer Spektrenbibliothek (c) kann der Peak bei einer Retentionszeit von 23,8 min als Octadecansäure-Methylester identifiziert werden.

Peptiden oder Oligonukleotiden, Bestimmung von Substitutionsmustern organischer Verbindungen und ermöglichen ebenso quantitative Analysen. Dieser enorme Fortschritt in der biomedizinischen Analytik wurde 2002 mit dem Chemie-Nobel-Preis gewürdigt (J. Fenn, K. Tanaka).

Innovative Techniken der Ionen-Analyse

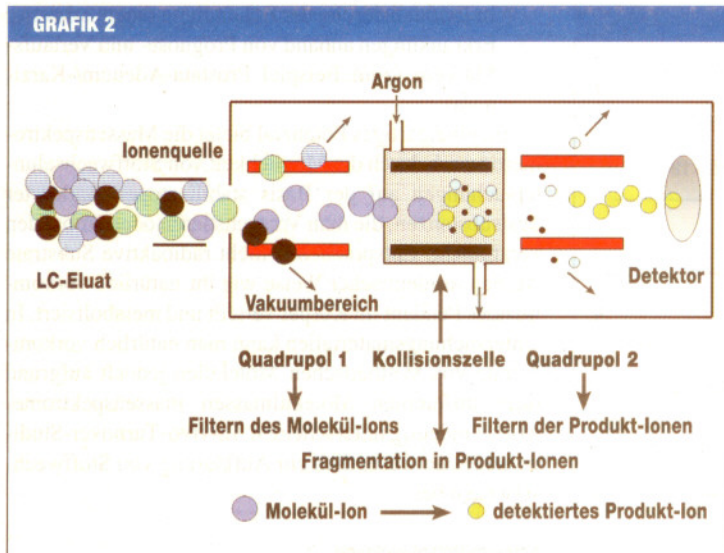
Nicht nur innovative Ionisationstechniken, sondern auch verbesserte Verfahren der Massentrennung haben die Anwendung der Massenspektrometrie seit den 1990er-Jahren revolutioniert.

Bei der sogenannten Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wird aus einem Ionenstrom zunächst mithilfe eines Quadrupol-Massenfilters das intakte Molekül-Ion eines Zielanalyten herausselektiert (Mutter-Ion). Diese Mutter-Ionen werden in die sogenannte Kollisionszelle geleitet, in die mit minimalem Fluss Argon einströmt. Die Übertragung von Stoßenergie auf den Zielanalyten bewirkt Bindungsbrüche, Umlagerungen und es entstehen Fragmente („Produkt-Ionen“). Der Produkt-Ionenstrom gelangt nun in einen zweiten, nachgeschalteten Quadrupol-Massenfilter, der ein definiertes Produkt-Ion selektiert und dem Ionendetektor zuführt. Auf diese Weise ist eine sehr spezifische Detektion möglich, die auf dem individuellen Fragmentationsverhalten einer Substanz beruht (Grafik 2). Dabei kann man die Masseselektionskriterien innerhalb von Sekundenbruchteilen ändern und eine Vielzahl von Stoffen simultan quantifizieren. Bis zu 300 Stoffe werden so zum Beispiel in Pestizid-Analysen in einem Analysenlauf erfasst. Die hohe Spezifität der Tandem-MS ermöglicht kurze analytische Laufzeiten, damit einen hohen Probendurchsatz sowie eine einfache Probenvorbereitung; hierin unterscheidet sich die LC-MS/MS wesentlich von der GC-MS. Voraussetzung für eine Quantifizierung mittels MS/MS ist die Homogenität der Zielanalyte hinsichtlich Molekülmasse und Tertiärstruktur, was zum Teil bei modifizierten Proteinen nicht gegeben ist. Davon abgesehen hat sich die LC-ESI-MS/MS in den vergangenen Jahren zu einer nahezu universellen, hochspezifischen und sensitiven Messmethodik im Molekülmassenbereich bis etwa 2 000 Da entwickelt. Hierfür wird oftmals ein sogenannter stabilisotopen-markierter „interner“ Standard verwendet. Diese Isotopen-Verdünnungstechnik erlaubt nahezu störungsfreie quantitative Analysen (Kasten 2, Grafik 3).

Bei der Time-of-Flight-Massenspektrometrie (TOF) analysiert man Ionen anhand ihrer massenabhängig unterschiedlichen Beschleunigung im elektrischen Feld. Diese Technik ist besonders für große Moleküle geeignet und wird oft gekoppelt mit der MALDI-Ionisation in der Protein-Analytik eingesetzt.

Anwendungsfelder innovativer massenspektrometrischer Techniken

Innovative massenspektrometrische Analyseverfahren mit weicher Ionisation und komplexer Prozessierung der gebildeten Analytionen (Grafik 4) finden in der Medizin vielfältige Anwendung.



Prinzip eines Tandem-Massenspektrometers (MS/MS)

Biomedizinische Forschung

Man strebt in der biomedizinischen Forschung zunehmend an, komplexe Systeme möglichst umfassend biochemisch zu charakterisieren („systems biology“). Die circa 25 000 Gene des menschlichen Genoms kodieren primäre Proteine in einer ähnlichen Vielfalt; aufgrund posttranslationaler Modifikationen liegt die Zahl unterscheidbarer Peptide und Proteine im Plasma vermutlich bei über 100 000. Dieses „Plasma-Proteom“ erstreckt sich über Konzentrationsbereiche von mindestens 10 Größenordnungen von klassischen Plasma-Proteinen (zum Beispiel Albumin im g/L-Bereich), über zelluläre „Leakage“-Proteine (zum Beispiel Troponin) bis zu Mediatoren im niedrigen ng/L-Bereich.

Die Zahl der niedermolekularen Substanzen im Plasma ist sehr viel kleiner als die der Proteine und liegt vermutlich bei etwa 1 000. Dieses „Metabolom“ stellt den funktionellen Endpunkt der genetischen Information dar, aber auch Umweltfaktoren determinieren es wesentlich. Das Metabolom zu beschreiben ist daher von besonderer medizinischer Bedeutung.

Moderne massenspektrometrische Techniken haben in den vergangenen Jahren die Perspektive eröffnet, das Proteom, das Peptidom und das Metabolom auch individueller Proben umfassend quantitativ zu beschreiben (1). Dies gilt für zelluläre und azelluläre Materialien, einschließlich Mikroorganismen.

Untersuchungen des Proteoms folgen dabei unterschiedlichen analytischen Ansätzen: direkte Proteinionisation (MALDI-TOF) beziehungsweise Enzymverdau der Proteine mit anschließender LC-MS-Analyse und Zuordnung „proteo-typischer“ Peptid-Sequenzen zu Proteinen anhand von Datenbanken.

Nach Gewinnung von Blutproben verändert sich das Serum-Proteom unter anderem durch den Gerinnungsprozess gravierend, was zu einer strikten Standardisierung der Präanalytik zwingt.

KASTEN 2

Isotopen-Verdünnungstechnik

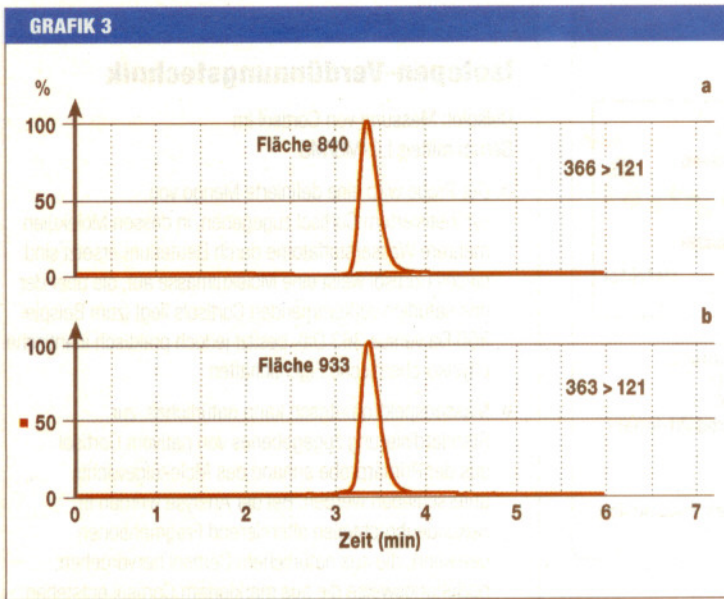
Beispiel: Messung von Cortisol im Serum mittels LC-MS/MS

- Der Probe wird eine definierte Menge von synthetisiertem Cortisol zugegeben, in dessen Molekülen mehrere Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt sind; dieses Cortisol weist eine Molekülmasse auf, die über der des natürlich vorkommenden Cortisols liegt (zum Beispiel 366 Da versus 363 Da), besitzt jedoch praktisch identische physiko-chemische Eigenschaften.
- Massenspektrometrisch kann natürliches, zur Standardisierung zugegebenes von nativem Cortisol aus der Primärprobe anhand des Molekulgewichts unterschieden werden. Bei der Analyse werden in Sekundenbruchteilen alternierend Fragmentationen detektiert, die aus natürlichem Cortisol hervorgehen, beziehungsweise die aus markiertem Cortisol entstehen.
- Die einzelnen Datenpunkte (Messströme) bilden 2 zeitlich überlagerte chromatografische Peaks, deren Flächen bestimmt werden (Grafik 3).
- Aus dem Peakflächen-Verhältnis kann nun von der bekannten Konzentration des zugegebenen markierten Cortisols auf die Konzentration von nativem Cortisol in der Probe rückgeschlossen werden.

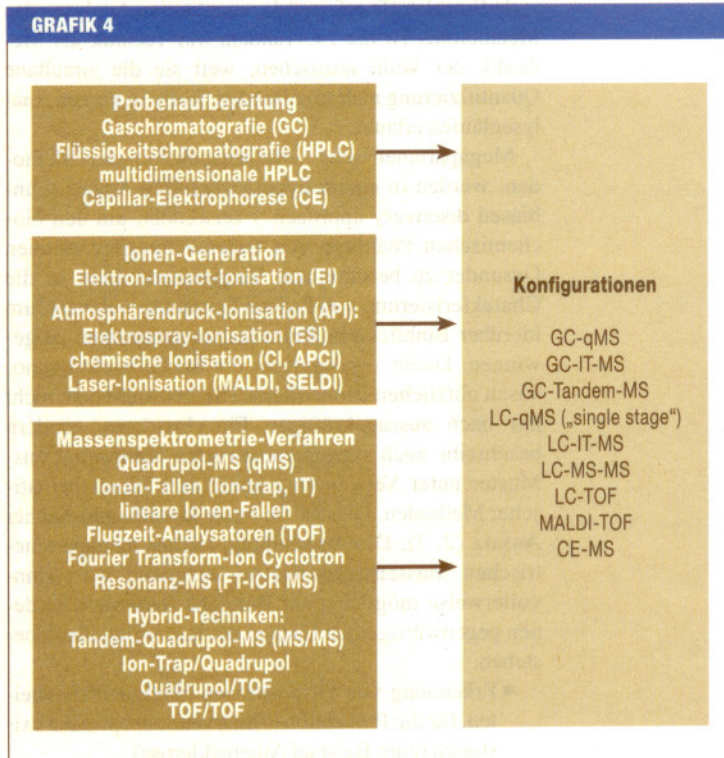
Für „multi- und megaparametrische“, das heißt sehr viele Einzelstoffe erfassende, quantitative Analysen des Metaboloms ist die LC-Tandem-MS-Technik als Methodik der Wahl anzusehen, weil sie die simultane Quantifizierung mehrerer hundert Stoffe in kurzen Analysenläufen erlaubt.

Megaparametrische Massenspektrometrie-Methoden werden in einem hypothesenfreien Ansatz („unbiased discovery approach“) verwendet, um den biochemischen Phänotyp von Untersuchungsmaterialien Gesunder zu beschreiben. Vergleichend dazu ist die Charakterisierung von Proben Erkrankter relevant, um hierüber Einblicke in Krankheitsmechanismen zu gewinnen. Damit verknüpft ist die Suche nach diagnostisch nützlichen Biomarkern. Hierbei sucht man nicht nur nach aussagekräftigen Einzelmarkern, sondern beschreibt auch megaparametrische Konzentrationsmuster unter Verwendung komplexer biomathematischer Methoden. Dies ist ein neuer labordiagnostischer Ansatz (2, 3). Die Anwendung solcher megaparametrischen Massenspektrometrie-Techniken wird sinnvollerweise möglichst auf Bereiche fokussiert, in denen gegenwärtig noch Lücken der Labordiagnostik bestehen:

- Erkennung von Dispositionen häufiger Krankheiten, für die Präventions-/Interventionsoptionen existieren (zum Beispiel Atherosklerose)
- Erkennung von noch asymptomatischen Frühstadien behandelbarer Krankheiten



Bestimmung von Cortisol mittels Isotopen-Verdünnungstechnik und LC-MS/MS, repräsentatives Chromatogramm. Aus dem Peakflächen-Verhältnis von natürlich vorkommendem Cortisol aus der Patientenprobe (oben, Molekülmasse 363 Da) zu zugegebenem synthetischen, deuterierten Cortisol (unten, Molekülmasse 366 Da) kann die Cortisol-Serum-Konzentration der Probe akkurat bestimmt werden (siehe auch Kasten 2, y-Achse jeweils auf 100 % normiert).



In der Medizin gegenwärtig verwendete massenspektrometrische Analysen-Geräte-Kombinationen

- Individualisierung der Behandlung diagnostizierter Erkrankungen anhand von Prognose- und Verlaufsmarkern (zum Beispiel Prostata-Adenom/-Karzinom).

Ein einzigartiges Potenzial bietet die Massenspektrometrie auch durch die Möglichkeit von Stoffwechseluntersuchungen auf der Basis stabilisotopen-markierter Testsubstanzen, die man Versuchstieren oder Probanden verabreicht. Entsprechende nicht radioaktive Substrate werden in identischer Weise wie ihr natürlich vorkommendes Pendant im Körper verteilt und metabolisiert. In Untersuchungsmaterialien kann man natürlich vorkommende von synthetischen Molekülen jedoch aufgrund ihrer differentiellen Molekülmassen massenspektrometrisch eindeutig unterscheiden. In-vivo-Turnover-Studien tragen so wesentlich zur Aufklärung von Stoffwechselwegen bei.

Arzneimittelentwicklung

Massenspektrometrische Methoden, inzwischen vornehmlich die LC-MS/MS-Technologie, spielen eine Schlüsselrolle in fast allen Stadien der Arzneimittelentwicklung (4). So beispielsweise bei der

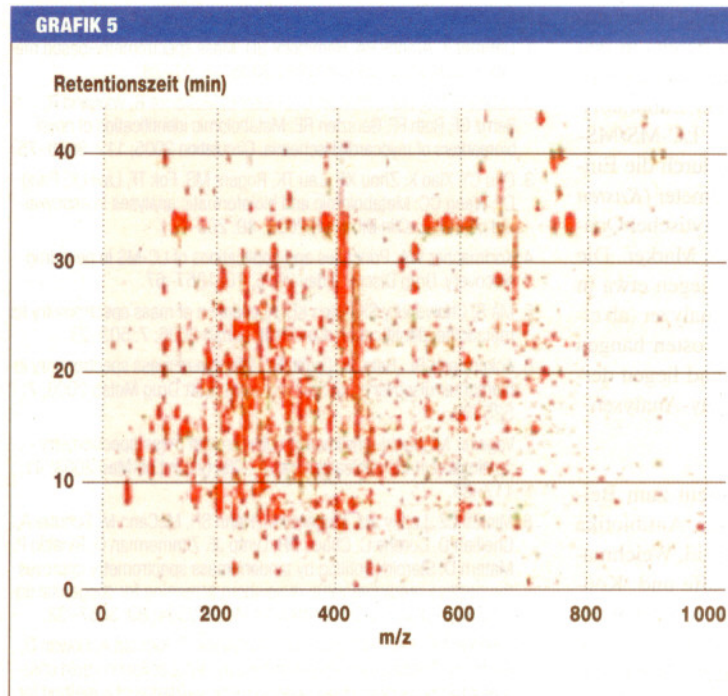
- Strukturaufklärung von pharmazeutischen Syntheseprodukten als „drug candidates“ (zum Beispiel Bestimmung der Summenformel über exakte Molekülmassebestimmung)
- Charakterisierung von Metaboliten eines Arzneistoffes, die in Zellkultur- oder Tiermodellen entstehen (5)
- Untersuchung der Pharmakokinetik neuer Arzneistoffe („ADME“: Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination); frühzeitig im Entwicklungsverlauf wird dabei vor allem getestet, ob eine Testsubstanz enteral resorbiert wird beziehungsweise zur Kumulation neigt.

Megaparametrische Untersuchungen des Proteoms und des Metaboloms werden in der Arzneimittelentwicklung häufig angewandt, um Wirkmechanismen aufzuklären, oft aber auch auf der Suche nach „Biomarkern“. Dabei kommen zum Teil Verfahren zum Einsatz, die primär lediglich Peak-Muster generieren, die man nicht unbedingt Einzelsubstanzen zuordnen kann. So wird über eine chromatografische Analyse von einigen Minuten Dauer die Ionen-Signalintensität über einen weiten Molekülmassenbereich aufgezeichnet, wodurch ein zweidimensionales Muster entsteht (Grafik 5). Durch biomathematische Verfahren der Mustererkennung („pattern recognition“) kann man ein solches „metabolic profile“ empirisch zum Beispiel hepatotoxischen oder nephrotoxischen Eigenschaften einer Testsubstanz zuordnen. Hierdurch versucht man, im Entwicklungsverlauf bereits früh aussichtsreiche von offensichtlich stark mit Nebenwirkungen behafteten „drug candidates“ zu unterscheiden (6).

In-vitro-Diagnostik

Auf Basis der Grundtechniken Fotometrie, Potentiometrie sowie Ligandenbindungsassays sind in den letzten Jahrzehnten sehr leistungsstarke Hochdurchsatz-

GRAFIK 5



Zweidimensionales Molekülmassen-Muster („Massen-Profiling“). Auf der Y-Achse ist die chromatografische Laufzeit aufgetragen, auf der X-Achse das Verhältnis von Masse zu Ladungszahl. Die Farbdichte im zweidimensionalen Raster gibt die jeweilige Ionenausbeute an.

Analysenautomaten entwickelt worden. Limitiert ist die Anwendung dieser Basistechnologien für viele Stoffe jedoch durch einen Mangel an analytischer Spezifität. Höchst spezifische Analysen erlaubt seit den 1970er-Jahren die GC-MS, die allerdings vor allem aufgrund der komplexen Handhabung nur in Nischenbereichen der Klinischen Chemie für Spezialanalysen angewendet wird. Mit der LC-MS/MS-Technik ist in den letzten Jahren erstmals eine routinewendbare massenspektrometrische Technik verfügbar geworden (7) (Kasten 3).

Die LC-MS/MS wird für Analyten eingesetzt, für die die begrenzte Spezifität von Immunoassays problematisch ist, wie zum Beispiel Androgene und 17-OH-Progesteron (8–10), Methylmalonsäure, asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) (11) und 8-OHdG als Marker der Nukleinsäure-Denaturierung (12). Während bei diesen Parametern derzeit häufig methodenabhängige Richtwerte berücksichtigt werden müssen, erlauben Isotopenverdünnungs-Analysen hier eine optimale Standardisierung (13). Außerdem unterliegt die Isotopenverdünnungs-LC-MS/MS nicht den potenziellen Störfaktoren von Immunoassays, wie heterophilen Antikörpern beziehungsweise Bindungs- oder Signalgenerations-Inhibitoren.

Obwohl bei einer Reihe von Arzneimitteln sehr gute Hinweise für den Nutzen einer spiegeladaptierten Therapieindividualisierung vorliegen, wird diese mangels entsprechender Immunoassays für das Therapeutische Drug Monitoring vielfach noch nicht durchgeführt. Auch aufgrund der Erkenntnisse der Pharmakogenetik besteht somit ein rasch wachsender Bedarf an neuen Verfahren des pharmakokinetischen Drug Monitorings.

KASTEN 3

Beispiele für massenspektrometrische Routineuntersuchungen

Gegenwärtige Verfahren:

- Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen (LC-MS/MS) (15)
- Therapeutisches Drug-Monitoring (LC-MS/MS) unter anderem Immunsuppressiva-Monitoring (v.a. Sirolimus), Messung von Antimykotika, Antiepileptika, antiviralen Pharmaka
- Androgen-Profil (LC-MS/MS)
- Carnitin-Analytik (LC-MS/MS) (16)
- Sulfonylharnstoff-Screening (GC-MS)
- Fettsäure-Analytik (Diagnostik M. Refsum, Adrenoleukodystrophie; GC-MS)
- Cannabinoid-Bestätigungstest (GC-MS)
- Methylmalonsäure in Urin oder Serum (Diagnostik des Vitamin B12-Mangels; GC-MS und LC-MS/MS)

Künftige mögliche Verfahren:

- Pharmakogenetische Phänotypisierung mittels Testsubstrat-Cocktails (LC-MS/MS) (17)
- Niedermolekulares Metaboliten-Profil (LC-MS/MS)
- Peptid- und Protein-Profil (MALDI-TOF) (18)
- Genotypisierungen mittels PCR-MS-Kombimethoden (19)

Während sich die Entwicklung von Immunoassays über Jahre erstreckt, kann eine LC-MS/MS-Methode oft innerhalb von Wochen etabliert werden.

So wurde die klinische Einführung des neuartigen Immunsuppressivums Sirolimus (Rapamycin) in die Transplantationsmedizin erst durch die Entwicklung von LC-MS/MS-Methoden für das therapeutische Drug Monitoring möglich. Bei den konventionellen Immunsuppressiva bietet die LC-MS/MS-Technik eine deutlich verbesserte analytische Leistungsfähigkeit gegenüber Immunoassays. Die enorme Flexibilität bei der Entwicklung neuer leistungsfähiger, routinetauglicher Analysemethoden hat die LC-MS/MS innerhalb kurzer Zeit zu einer zentralen Technik im Bereich des therapeutischen Drug Monitorings gemacht (14).

Durch die neuartigen Möglichkeiten megaparametrischer Analysen eröffnet die LC-MS/MS auch für die Routinediagnostik im medizinischen Labor völlig neue Perspektiven. Sie bietet das Potenzial, die metabolische Komplexität von Krankheitszuständen individuell zu charakterisieren anstatt wie bislang nur einzelne Markersubstanzen zu quantifizieren. Routinemäßig wird ein solches multiparametrisches Biomarker-Profiling auf Basis der LC-MS/MS bereits seit mehreren Jahren beim Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen durchgeführt (15). In Analysenläufen von etwa 2 min Dauer werden dabei über 30 Stoffe erfasst.

Neben der Phenylketonurie kann so eine Reihe seltener, behandelbarer Stoffwechselerkrankungen bereits in den ersten Lebenstagen diagnostiziert werden. Insgesamt ist anzunehmen, dass künftige Fortschritte der Laboratoriumsdiagnostik ganz wesentlich von der LC-MS/MS-Technologie bestimmt werden, einerseits durch die Einführung zahlreicher innovativer Laborparameter (Kasten 3), andererseits durch die Verbesserung analytischer Qualitätsstandards bei einer Reihe etablierter Marker. Die Gerätekosten von LC-MS/MS-Systemen liegen etwa in der Dimension klinisch-chemischer Großanalyser (ab etwa 200 000 €); die laufenden Analysen-Kosten hängen wesentlich von der Geräteauslastung ab und liegen derzeit noch über den Kosten von Immunoassay-Analysen.

Umwelt- und Ernährungsmedizin

Für die Untersuchung von Nahrungsmitteln zum Beispiel auf Pestizide, Herbizide, Mykotoxine, Antibiotika und andere Verunreinigungen wie Acrylamid, Weichmacher aus Verpackungsmaterialien, Farbstoffe und Konservierungsmittel, für die Untersuchung von Umweltproben (zum Beispiel Oberflächenwasser, Trinkwasser, Bodenproben, Raumluft) sowie für Schadstoffanalysen humaner Proben (zum Beispiel Biomonitoring auf Bisphenol A oder Phtalate) sind massenspektrometrische Methoden wegen ihrer Spezifität und Nachweisstärke im Femtogramm-Bereich unentbehrlich. Die konventionelle GC-MS ist hier eine Standardtechnik und ermöglicht die Detektion der allermeisten relevanten Schadstoffe, die überwiegend relativ hydrophob und niedermolekular sind. Da jedoch weltweit ein sehr rasch wachsender Bedarf an Nahrungs- und Umweltanalysen besteht, verdrängt die durchsatzstarke LC-MS/MS zunehmend die arbeitsintensiven GC-MS-Methoden und leistet damit einen wichtigen Beitrag zur Präventivmedizin.

Fazit

Massenspektrometrische Methoden bieten die einzigartige Möglichkeit molekulspezifischer Analysen. Die GC-MS-Technologie besitzt seit Längerem eine wesentliche Bedeutung für medizinische Spezialanalysen. Durch die Entwicklung innovativer Techniken, insbesondere der HPLC-MS/MS und der MALDI-Technologie, die mittlerweile für praktisch alle im Körper vorkommende Stoffe anwendbar sind, hat sich die Massenspektrometrie in den letzten 10 Jahren zu einer Schlüsseltechnik der biomedizinischen Forschung und vor allem auch der angewandten Laboratoriumsmedizin entwickelt. Für eine rasch zunehmende Zahl medizinisch relevanter Stoffe ermöglichen innovative massenspektrometrische Verfahren mittlerweile außerordentlich zuverlässige Routineanalysen. Insbesondere die Möglichkeit multi- und megaparametrischer Analysen eröffnet der In-vitro-Diagnostik völlig neue Horizonte.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des Internationalen Committee of Medical Journal Editors besteht.

Manuskriptdaten

eingereicht: 15. 1. 2007, revidierte Fassung angenommen: 20. 4. 2007

LITERATUR

1. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD: Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2006; 26: 51–78.
2. Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, Wiegand R, Berriz GF, Roth FP, Gerszten RE: Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation* 2005; 112: 3868–75.
3. Chu CY, Xiao X, Zhou XG, Lau TK, Rogers MS, Fok TF, Law LK, Pang CP, Wang CC: Metabolomic and bioinformatic analyses in asphyxiated neonates. *Clin Biochem* 2006; 39: 203–9.
4. Korfmacher WA: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1357–67.
5. Ma S, Chowdhury SK, Alton KB: Application of mass spectrometry for metabolite identification. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 503–23.
6. Ackermann BL, Hale JE, Duffin KL: The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 525–39.
7. Vogeser M: Liquid–chromatography tandem mass-spectrometry - application in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 117–26.
8. Minutti CZ, Lacey JM, Magera MJ, Hahn SH, McCann M, Schulze A, Cheillan D, Dorche C, Chace DH, Lymp JF, Zimmerman D, Rinaldo P, Matern D: Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3687–93.
9. Cawood ML, Field HP, Ford CG, Gillingwater S, Kicman A, Cowan D, Barth JH: Testosterone measurement by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: validation of a method for routine clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51: 1472–9.
10. Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ: Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 372: 76–82.
11. Martens-Lobenhoffer J, Krug O, Bode-Boger SM: Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. *J Mass Spectrom* 2004; 39: 1287–94.
12. Hu CW, Wang CJ, Chang LW, Chao MR: Clinical-scale high-throughput analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with online solid-phase extraction. *Clin Chem* 2006; 52: 1381–8.
13. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS: Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 534–43.
14. Vogeser M: Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie im Therapeutischen Drug Monitoring. *J Lab Med* 2005; 29: 278–86.
15. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K: Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003; 348: 2304–12.
16. Gempel K, Bauer MF, Gerbitz KD: Mitochondriale Erkrankungen. *Dtsch Arztebl* 1999; 96: A3035–42.
17. Yin OQ, Lam SS, Lo CM, Chow MS: Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18: 2921–33.
18. Haubitz M, Fliser D, Haller H: Proteomanalyse - eine neue Perspektive für die klinische Diagnostik. *Dtsch Arztebl* 2004; 21: A1514–7.
19. Blievernicht JK, Schaeffeler E, Klein K, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of CYP2B6 single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 2007; 53: 24–33.

Anschrift für die Verfasser

PD Dr. med. Michael Vogeser
 Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München
 Marchioninistraße 15, D-81377 München
 E-Mail: Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de

The English version of this article is available online: www.aerzteblatt.de/english