Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Chemie

The use of HPLC-tandem mass spectrometry in clinical chemistry

Michael Vogeser*

University Hospital, Institute for Clinical Chemistry,
University of Munich, Munich, Germany

Zusammenfassung

Die Technik der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie eröffnet der klinisch-chemischen Routineanalytik die Perspektive eines weitaus umfangreicheren Einsatzes hochspezifischer massenspektrometrischer Meßverfahren als dies mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie zu realisieren war. Nach den ersten Jahren der routinemäßigen Anwendung der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie in einer wachsenden Zahl von Laboratorien zeichnet sich ab, daß diese Technik einen wesentlichen Stellenwert in der Methodenpalette der Labormedizin gewinnen wird. Dies beruht vor allem auf dem sehr weiten Analytenspektrum ohne Limitierungen hinsichtlich der Molekülmasse der Zielanalyten, an der einfachen Probenvorbereitung ohne Derivatisierungsreaktionen sowie an der wartungsarmen und robusten Gerätetechnik. Die vorliegende Übersicht soll ein Abriß über die technischen Grundlagen der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie geben, Prinzipien der Methodenentwicklung beschrieben, Stärken und Limitierungen der Technik diskutiert, derzeit etablierte Anwendungen in der Routineanalytik beschrieben sowie die Entwicklungsperspektiven der Technik aufzeigen.

Schlüsselwörter: Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-Tandem-MS); Atmosphärendruck-Ionisation; klinisch-chemische Routineanwendungen.

Abstract

The technology of liquid chromatography-tandem mass spectrometry opens the perspective of a more widespread use of highly specific mass spectrometric assays

in a routine clinical laboratory setting as compared to gas chromatography-mass spectrometry. After the first years of routine application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a growing number of laboratories, it has become evident that this technique will become a substantial part of the methodological spectrum of laboratory medicine. This is due to the very wide range of potential analytes to be measured with no limitation by molecular mass, the straightforward sample preparation not requiring chemical derivatization and due to the rugged instrumentation with limited maintenance requirements. This review gives a survey of the technical principles of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, describes the basics of method development and typical routine applications, discusses strengths and limitations of the technique, and highlights the perspectives for future developments of the technology.

Keywords: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-Tandem-MS); atmospheric pressure ionization; clinical chemistry routine applications.

Im Vergleich zu photometrischen und immunometrischen Techniken finden chromatographische und massenspektrometrische Verfahren in der laboratoriumsmedizinischen Routineanalytik bislang insgesamt nur eng begrenzte Anwendungsfelder. Dies liegt vor allem an der arbeitsaufwändigen und sehr komplexen Handhabung entsprechender Methoden. Sie finden insbesondere für Analyten Anwendung, für die immunometrische Methoden keine hinreichende Spezifität gewährleisten, oder für selten indizierte Analysen, für die sich die Entwicklung von Immunoassays für die Diagnostika-Industrie nicht lohnt bzw. deren Tests hohe Reagenzienkosten aufweisen. Aus der Vielzahl chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden werden in der medizinischen Diagnostik vorwiegend die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-VIS-, fluorimetrischer oder elektrochemischer Detektion sowie die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) verwendet. Typische Einsatzgebiete der HPLC sind die Messung biogener Amine im Urin und teilweise auch im Plasma (Katecholamine und Metaboliten zur Phäochromozytom-Diagnostik, Serotonin und Metaboliten zur Car-

*Korrespondenz: PD Dr. med. Michael Vogeser, Klinikum der Universität München, Institut für Klinische Chemie, Marchioninistr. 15, 81377 München, Germany
Tel. +49-89-7095-3221
E-mail: Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de

cinoid-Diagnostik), die Messung von Vitaminen und Porphyrinen, die Diagnostik von Hämoglobin-Varianten sowie das Monitoring einiger Pharmaka wie Amiodaron oder verschiedener Antiepileptika.

Die GC-MS ist aufgrund ihrer hohen Spezifität und Empfindlichkeit über Jahrzehnte zu einer zentralen Technik im Bereich der Toxikologie, Gerichts-, Arbeits- und Umweltmedizin geworden. In der Klinischen Chemie im engeren Sinne wird die GC-MS vorwiegend als Referenztechnik vor allem zur Spezifizierung von Kontroll-, Kalibrations- und Ringversuchsmaterialien verwendet, ausserdem in wenigen Labors für die Messung sehr spezieller Analyten wie der Phytansäure zur Diagnostik des M. Refsum, der Oxalsäure zur Diagnostik der primären Oxalosen oder zur differenzierten Steroid-Analytik im Urin. Die GC-MS ist nur für thermostabile Stoffe mit einem Molekulgewicht unter etwa 800 anwendbar, die entweder per se volatil sind oder durch eine chemische Derivatisierung volatilisiert werden können. Auch HPLC-Methoden sind keineswegs universell für alle relevanten biologischen Analyten einsetzbar, da sie zur Detektion spezifische molekulare Charakteristika der jeweiligen Analyten wie z. B. eine ausreichende UV-Absorption oder Fluoreszenz-Aktivität erfordern. Fast alle chromatographischen Analysen aus biologischen Proben erfordern eine aufwändige, mehrstufige Probenvorbereitung, besonders im Falle der GC-MS häufig mit chemischer Derivatisierung. Die Gerätehandhabung sowohl von HPLC- wie auch von GC-MS-Systemen erfordert weitaus mehr manuelles Geschick und Aufmerksamkeit als für klinisch-chemische bzw. immunometrische Autoanalyser erforderlich, die Bindung hochqualifizierten Personals pro analysierter Probe ist ungleich höher.

Seit kurzer Zeit hat sich das klinisch-chemische Methodenspektrum durch die Einführung der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-Tandem-MS, syn. LC-MS/MS, LC-Triple stage-MS) entscheidend erweitert, da hiermit die wesentlichen grundlegenden Limitierungen bislang verfügbarer chromatographischer bzw. massenspektrometrischer Methoden – das enge Analytenspektrum sowie die arbeitsaufwändige Handhabung – überwunden werden können. Die vorliegende Übersicht soll einen Abriss über Technik und Anwendungscharakteristika der LC-Tandem-MS in der Klinischen Chemie geben und Stärken und Limitierungen dieser Technik diskutieren.

Technik der LC-Tandem-MS

Die beiden grundlegenden Prozesse der Massenspektrometrie sind die Ionen-Erzeugung und die Ionen-Analyse. Die Ionisation der Analyten erlaubt es, Moleküle im Raum gezielt zu transportieren, zu filtern und schließlich zu detektieren. Sowohl Ionen-Erzeugung wie auch -Analyse unterscheiden sich zwischen der LC-Tandem-MS und der seit Jahrzehnten etablierten GC-MS wesentlich.

Electrospray-Ionisation (ESI)

Die Kopplung der Trenntechnik der HPLC mit einem massenspektrometrischen Detektionsverfahren – analog zur GC-MS – war für lange Zeit eine ungelöste technische Herausforderung. Ein Transfer des HPLC-Eluates direkt in ein Hochvakuum wie bei der GC-MS ist unmöglich, da die Evaporation der mobilen Phase enorme Gasmengen erzeugen würde, die mit dem für die Massenspektrometrie essentiell notwendigen Höchstvakuum inkompatibel wären. Erst die Entwicklung sogenannter atmospheric pressure Ionisations-Verfahren (API) in den 80er- und 90er-Jahren ermöglichte die Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie-Systemen. Die am meisten genutzte Technik stellt die Electrospray-Ionisation (ESI) dar. Der Erstbeschreiber dieser Technik, J. Fenn, wurde hierfür 2002 mit dem Nobel-Preis für Chemie geehrt. Bei API-Verfahren erfolgt die Ionisation der Zielanalyte außerhalb des Vakuumbereichs des Massenspektrometers. Hierbei wird die mobile Phase der HPLC durch eine feine Kapillare – unterstützt durch einen Stickstoff-Strom ("Nebulizer Gas") – aerosolisiert. Auf der Spray-Kapillare liegt bei der ESI-Technik eine Spannung von ca. 3 kV, wodurch eine elektrische Ladung auf die Tröpfchen des Aerosols übertragen wird. In das Aerosol wird ein sehr hoher Strom heissen Stickstoffs gelenkt (ca. 600 l/min bei über 200°C, "Desolvation Gas"), um damit das Eluat rasch zu verdampfen. Die entstehende Verdunstungskälte verhindert dabei jede thermische Belastung der Analyten. Der Durchmesser der Tröpfchen nimmt schnell ab, die elektrostatische Abstoßung in den Tröpfchen übersteigt die Oberflächenspannung, was zum Zerplatzen derselben in immer kleinere Tröpfchen-Generationen führt (Coulomb-Explosion). Schließlich wird elektrische Ladung auf einzelne Moleküle in den Tropfen übertragen und es kommt zur sogenannten "ion emission" von Einzelionen aus den Tröpfchen (Abbildung 1). Die Ionisation erfolgt in einem Bereich von ca. 2 cm am Ende der Spraykapillare. Es wird überwiegend im positiven Ladungs-Modus gearbeitet, wobei meist ein Proton auf die Analyten übertragen wird. Es kann jedoch auch zur Bildung von Cluster-Ionen mit Bestandteilen der mobilen Phase kommen (z. B. Ammonium-, Formiat- oder Natrium-Addukte der Analyten). Der durch die ESI erzeugte Gesamt-Ionenstrom wird durch eine Gegenspannung bezüglich der Kapillare auf die feine, meist orthogonal zum Spray angeordnete Eintrittsöffnung des Massenspektrometers gelenkt. Durch Ionen-Optiken wird der Ionen-Strom durch einen Bereich eines relativ geringen Vakuums (ca. 10^{-3} Torr) schließlich in den Hochvakuum-Bereich des Massenspektrometers (ca. 10^{-6} Torr) geleitet, der durch Turbinenpumpen evakuiert wird. Bei der ESI kommt es im Gegensatz zur Electron-Impact Ionisation der GC-MS im Allgemeinen nicht zur Desintegration der Moleküle; als "weiche Ionisation" ist die Technik auch für Makromoleküle wie Proteine und DNA anwendbar.

Abbildung 1 Prinzip der Electrospray Ionisation (ESI, A für Analyt).

Eine alternative Technik der Ionisation bei Atmosphärendruck stellt die sogenannte Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) dar. Hierbei liegt auf der Spray-Kapillare der Ionenquelle keine Spannung. Im Bereich des Sprays befindet sich eine Nadel, die eine sehr hohe Ladung trägt. Um diesen "Pin" bildet sich eine sichtbare Corona aus, in der kleine Moleküle der mobilen Phase wie z. B. Wasser ionisiert werden. Diese Moleküle können ihre Ladung auf die Zielanalyten übertragen. Die APCI kann vor allem bei wenig polaren Molekülen z. T. bessere Ionenausbeuten liefern als die ESI. Bei allen verfügbaren LC-Tandem-MS-Systemen können ESI und APCI-Quellen innerhalb weniger Minuten gegeneinander ausgetauscht werden. Eine erst seit kurzem verfügbare weitere Ionisationstechnik ist die Atmospheric Pressure

Photo-Ionisation (APPI), bei der hochenergetisches Licht zur Ionisation verwendet wird.

Zur Selektion einzelner Ionen aus dem Gesamtionenstrom werden zumeist sogenannte Quadrupol-Massenfilter verwendet. Hierbei sind vier Metallstäbe parallel angeordnet (Abbildung 2). An diese Stäbe werden Radiofrequenzen angelegt. Bei einer bestimmten Radiofrequenz werden Ionen einer einzigen Ladungs-zu-Masse-Ratio durch das Quadrupol transportiert, während alle anderen Ionen auf eine Spiralbahn geraten und seitlich aus dem Quadrupol emittiert werden. Die an ein Quadrupol angelegte Radiofrequenz kann sehr schnell variiert werden, so daß es – neben einem statischen Betrieb – möglich ist, im Sekundentakt (oder schneller) einen weiten Massen-zu-Ladungsbereich zu "scannen". Die

Abbildung 2 Prinzipieller Aufbau eines Quadrupol-Massenfilters.

Abbildung 3 Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie.

Quadrupol-Technik findet in der GC-MS seit Jahrzehnten Anwendung.

Ionen, die ein Quadrupol passieren, erreichen schließlich einen Ionendetektor. Hier schlagen die Ionen Elektronen aus einem Aluminium-Block frei. Ein sog. Sekundär-Elektronen-Vervielfacher amplifiziert das Signal, bevor die Ionen auf einer Phosphor-Membran ein Lichtsignal generieren. Ein Photomultiplier verstärkt dieses Lichtsignal wiederum, um schließlich einen Meßstrom zu erzeugen.

Die Kopplung der Electrospray-Ionisation mit einem Quadrupol-Massenfilter und einem Ionen-Detektor stellt ein sog. Single-Stage-LC-MS-System dar, das auch als massenspezifischer Detektor (MSD) bezeichnet werden kann. Der Vorteil solcher Systeme gegenüber konventionellen HPLC-Detektoren besteht darin, daß die meisten biologisch relevanten Stoffe ein Signal erzeugen, unabhängig z. B. davon, ob die Stoffe aufgrund ihrer jeweiligen Molekülstruktur eine relevante UV-Absorption zeigen oder nicht. Da jedoch die Trennleistung der HPLC – verglichen mit der GC – recht begrenzt ist und in biologischen Proben viele tausend unterschiedliche Moleküle vorkommen, die wiederum ein- oder mehrfach ionisiert sein können, ist die Spezifität von Single-Stage-Systemen für biomedizinische Anwendungen meist unzureichend. Erforderlich sind im Falle der Anwendung für diese Zwecke – wie für konventionelle HPLC-Verfahren auch – aufwendige Probenvorbereitungsverfahren sowie optimierte und zeitintensive Trennprogramme. Da die Systempreise von Single-Stage-Systemen nicht wesentlich unter denen von (im folgenden Absatz beschriebenen) Tandem-MS-Systemen liegen, wird ihre Anwendung in der Labormedizin kaum eine Rolle spielen. Brauchbar sind Single-Stage-Systeme z. B. für pharmazeutische Analysen auf Gehalt und Reinheit nicht-biologischer Proben. Bei der GC-MS ist zum einen die Trennleistung der Gaschromatographie sehr hoch, zum anderen wird bereits bei der sogenannten Electron-

Impact-Ionisation ein weitgehend stoffspezifisches Fragmentmassen-Spektrum generiert, so daß ein singulärer Quadrupol-Massenfilter höchst spezifische Analysen ermöglicht. Um die Limitierungen der HPLC hinsichtlich der Trennleistung zu kompensieren, erfolgt bei der LC-MS im medizinischen Bereich überwiegend die Kopplung mit einem sogenannten Tandem-Massenspektrometer.

Tandem-Massenspektrometrie

Ein Tandem-Massenspektrometer stellt die Kopplung zweier Quadrupol-Massenfilter mit interponierter Kollisionszelle dar. Durch diese Anordnung und die Möglichkeit von unabhängigen Scans beider Quadrupole sind mehrere Arbeitsmodi der Tandem-MS möglich (z. B. Parent- und Daughter-Ion-Scan), wobei die dominierende Technik zur quantitativen Analytik das sogenannte Multiple Reaction Monitoring (MRM) darstellt. Hierbei erfolgt kein Scan, vielmehr sind beide Quadrupole zu einem bestimmten Zeitpunkt für jeweils nur zwei unterschiedliche, konstante Masse-zu-Ladungs-Ratios durchgängig. Auf diese Weise wird das intakte Molekülion eines Zielanalyten ("Mutterion") vom ersten Quadrupol aus dem Gesamtionenstrom herausgefiltert und gelangt so in die Kollisionszelle, in die mit einem äußerst geringen Fluß ein Inertgas wie Argon strömt. Die beschleunigten Analyt-Ionen kollidieren hier mit den Argon-Atomen und werden zu thermodynamisch begünstigten Fragmentionen ("Tochter-Ionen") desintegriert. Der Fragmentionenstrom wird nun in das zweite Quadrupol geleitet, wo ein einzelnes, definiertes Fragmention des Zielanalyten herausgefiltert wird und so schließlich den Ionendetektor erreicht. Im MRM-Modus ist somit ein kontrolliert herbeigeführter physiko-chemischer Zerfallsprozess Grundlage einer hochspezifischen Stoffdetektion (Abbildung 3). Tandem-MS-Systeme können in Zeittakten von deutlich weniger als einer Sekunde zwischen über 20 spezifischen Massenübergängen von Mutter- auf Tochter-

ionen alternieren, was die simultane Quantifizierung zahlreicher Stoffe ermöglicht. Die Tandem-MS stellt damit nicht – wie die single-stage-MS – lediglich einen HPLC-Detektor dar, sondern repräsentiert ein eigenes analytisches Separations-Prinzip.

Aufgrund der hohen Detektionsspezifität der Tandem-Massenspektrometrie werden zum einen Background-Signale weitgehend unterdrückt, was eine gute Empfindlichkeit gewährleistet. Zum anderen wird die Bedeutung der Probenvorbereitung und der chromatographischen Trennung gegenüber konventionellen HPLC-Detektionsverfahren minimiert, da die simultane Elution mehrerer Stoffe kein Problem darstellt, im Falle des jeweils obligaten internen Standards eines Zielanalyten sogar wünschenswert ist. Nach Entfernung der Probenmatrix im Rahmen einer Probenvorbereitung ist eine chromatographische Vortrennung der Probe im Allgemeinen jedoch sinnvoll, u. a. um zu erreichen, daß verbliebene Matrix-Reste vor den Zielanalyten eluieren, da es andernfalls zur Beeinträchtigung der Ionisation kommen kann ("Ion suppression").

Alternativ zur Tandem-MS-Technologie findet die sogenannte Ion-Trap-Technik Verwendung. Hierbei werden die mittels API gebildeten Ionen in einem Radiofrequenzfeld gesammelt und diskontinuierlich desintegriert. Die generierten Fragmentationen werden in einer zeitlichen Sequenz aus der "Ionen-Falle" durch Variation einer Radiofrequenz emittiert und dann detektiert. Die Ion-Trap-Technik erlaubt eine "MS-MS in time" gegenüber der "MS-MS in space" bei der Quadrupol-Tandem-Massenspektrometrie. Dabei ist nicht nur eine "MS²", sondern sogar eine "MS³" möglich, das heißt die Erzeugung eines weiteren Fragmentations aus einem ersten Fragmentation, verbunden mit einem möglichen weiteren Spezifitätsgewinn. Andererseits werden bei der Ion-Trap-Technik konzentrationsabhängig weniger Datenpunkte über einem chromatographischen Peak generiert, wodurch die Quantifizierung teilweise weniger gut reproduzierbar ist als bei der Tandem-MS. Daher ist die Ion-Trap-Technik in der Labormedizin bislang wenig verbreitet.

Gerätecharakteristika

LC-Tandem-MS-Systeme werden momentan von vier Herstellern angeboten (Applied Biosystems, Thermo-Finnigan, Varian, Waters-Micromass). Dabei handelt es sich um Auf Tischgeräte von ca. 1.5×1 m Grundfläche. Neben der Ionenquellen-Einheit und dem Hochvakuum-Komplex, in dem sich die Quadrupole befinden, stellen die Turbomolekular-Pumpen zur Erzeugung des Hochvakuums sowie die Radiofrequenzgeneratoren und Elektronik-Platinen wesentliche Baugruppen der Systeme dar. Eine oder zwei Drehschieber-Vorvakuumpumpen sowie ein z. T. erforderlicher Wasserkühler werden meist unter dem Gerätetisch positioniert. Die Installation eines LC-Tandem-MS-Systems setzt eine leistungsfähige Druckluft- bzw. Stickstoffversorgung sowie eine gute

Raumkühlung voraus. Systempreise inklusive HPLC-System liegen etwa zwischen EUR 200.000 und 400.000. Analog zur GC-MS-Technik ist damit zu rechnen, daß das Preisniveau in den kommenden Jahren in gewissem Umfang sinkt.

Entwicklung von LC-Tandem-MS-Methoden

Zur Entwicklung einer LC-Tandem-MS-Methode wird zunächst eine Reinlösung des Zielanalyten über eine Spritzenpumpe kontinuierlich in das TMS-System infundiert. Im sogenannten full-scan Modus von Quadrupol 1 kann die Ionen-Ausbeute bei der erwarteten Molekülmasse direkt als Massenpeak visualisiert werden. Hierdurch können eine Reihe von Einstellungsparametern der Ionenquelle direkt "on-line" optimiert werden. Nach Öffnen des Argon-Flusses kann ein Desintegrationsspektrum des jeweiligen Analyten aufgezeichnet werden (Quadrupol 1 fix auf der Masse des Parent-Ions, Quadrupol 2 im Scan-Betrieb). Aus diesem Spektrum, d. h. der Darstellung der Signal-Intensität auf der Y-Achse über der Massenskala auf der X-Achse (Abbildung 4), wird ein intensives Fragmentation für die Quantifizierung im MRM-Modus selektiert. Es folgt – ausgehend von einfachen Standardbedingungen – die Ausarbeitung der chromatographischen Bedingungen, wobei eine Retentionszeit von ca. 3–5 min. angestrebt wird. Die mobilen Phasen dürfen keine kristallinen Puffer enthalten, eine typische Mischung enthält z. B. ca. 80% Acetonitril und 20% 0.1%-ige Ameisensäure. Häufig findet auch Ammonium-Acetat als flüchtiger Puffer Verwendung. Abbildung 5 zeigt ein beispielhaftes MRM-Ionenchromatogramm.

Auch bei der Probenvorbereitung können meist Standardmethoden genutzt werden. Die automatisierte Festphasen-Extraktion mit vorgeschalteter manueller Proteinfällung, Säulenschaltung und direkter Kopplung über eine kurze analytische Säule zum MS-System stellt eine bewährte Lösung dar [1]. Auch separate Pipettierautomaten können genutzt werden. Diese können z. B. Probe und internen Standard quantitativ pipettieren, Festphasen-Extraktionen mit Einwegmaterialien durchführen und Mikrotiterplatten beladen, die schließlich dem MS-System manuell zugeführt werden.

Wesentlich für die Entwicklung einer leistungsfähigen LC-Tandem-MS-Methode ist die Verfügbarkeit einer geeigneten Internen Standard-Substanz. Dabei handelt es sich um Stoffe, die eine dem Zielanalyten möglichst ähnliche Molekülstruktur aufweisen, sich jedoch im Molekulargewicht unterscheiden. Die Lösung des Internen Standards wird Kalibrations- und Patientenproben in identischer Menge zugegeben, die eigentliche Meßgröße ist das Peak-Flächen-Verhältnis des MRM-Chromatogramms von Zielanalyt bzw. Internem Standard. Ideale Interne Standard-Substanzen stellen stabilisotopen-markierte Moleküle der Zielsubstanz dar. In diesen synthetisierten Molekülen sind meist mehrere Wasserstoff-Atome durch Deuterium ersetzt, bzw. Kohlenstoff 12 ist durch Kohlenstoff 13 ersetzt. Die physiko-chemischen Eigen-

Abbildung 4 Kollisions-induziertes Desintegrationspektrum des Antimykotikums Itraconazol. X-Achse: m/z für Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, Y-Achse: relative Signalintensität. Das Fragmentation mit 392 m/z wird zur Quantifizierung genutzt (siehe Abbildung 5).

schaften und insbesondere die Ionisierbarkeit dieser Moleküle entsprechen weitgehend denen der natürlich vorkommenden Zielanalyten, durch die höhere Molekülmasse kann jedoch eindeutig zwischen Zielanalyt und Internem Standard unterschieden werden. Durch dieses auch als Isotopen-Verdünnung bezeichnete Prinzip werden Varianzen in der Probenextraktion und der Ionisation voll kompensiert und es können Methoden von höchster analytischer Richtigkeit entwickelt werden [2]. Für einen Großteil der medizinisch relevanten Stoffe – vor allem Pharmaka – stehen Stabilisotopen-Standards nicht zur Verfügung, so daß Moleküle mit ähnlicher Struktur verwendet werden müssen („Homologe“, z. B. Desmethoxy-Rapamycin für die Messung von Rapamycin). Schon relativ geringfügige Unterschiede zwischen Zielanalyt und Internem Standard – wie das Vorhandensein funktioneller Gruppen – können sich auf die Ionisierbarkeit auswirken, wobei sich die ständig auftretenden Schwankungen in der Ionisierungsausbeute der Quelle differentiell auswirken können. Aus diesem Grund erreichen Assays mit entsprechenden Homologen als Interne Standards meist nicht die Präzision von Methoden, die Stabilisotopen-Standards verwenden. Eine Reihe von Unternehmen bieten die Auftragssynthese stabilisotopen-markierter Standards an, wobei die Kosten hierfür sehr hoch liegen.

Stärken der LC-Tandem-MS

Die LC-Tandem-MS eignet sich vor allem zur höchst akkuraten Quantifizierung endogener und exogener niedermolekularer Analyten in biologischen Proben. Die Messungen weisen im allgemeinen eine hohe Spezifität und Richtigkeit bei guter Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit auf.

Analytenspektrum: Die LC-Tandem-MS zeichnet sich – gegenüber allen anderen chromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren – durch ein sehr weites Analyten-Spektrum aus. Während die GC-MS nur für eine sehr begrenzte Zahl medizinisch relevanter Analyten anwendbar ist (thermostabile, volatile bzw. volatilisierte Stoffe mit einem Molekulargewicht unter 800), ermöglicht die „weiche“ Electrospray-Ionisation, gekoppelt mit der Tandem-MS, die hochspezifische, massenfragmentographische Analyse praktisch aller im Körper vorkommender Stoffe ohne Limitierung hinsichtlich der Molekülmasse. Moleküle oberhalb eines Molekulargewichts von 2000 können bei der ESI mehrfach-ionisiert werden. Da Massenspektrometer primär anhand der jeweiligen Ratio von Masse zu Ladung (m/z) in einem Bereich bis 2000 arbeiten, können mit Hilfe einer sog. Dekonvolutions-Software beliebig große Moleküle massenspektrometrisch analysiert werden (ein 10fach gela-

Abbildung 5 Multiple-reaction-monitoring (MRM)-Chromatogramm (simultane Analyse von Itraconazol (705 < 392) und Hydroxyitraconazol (721 < 408) mit einer homologen Substanz als interner Standard (733 < 460).

denes Molekül der Masse 15.000 z. B. hat ein m/z von 1.500).

Flexibilität: Die Entwicklung neuer Routinemethoden ist für ein versiertes Labor meist kurzfristig und vor allem unabhängig von der Diagnostika-Industrie möglich. Dies steht im prinzipiellen Gegensatz zur Immunoassay-Technologie, da die Produktion von Testantikörpern für medizinische Routine-Laboratorien nicht – oder nur in absoluten Ausnahmefällen – realisierbar ist.

Multi-Analyt-Quantifizierungen: Die LC-Tandem-MS ermöglicht die Entwicklung umfangreicher Multimethoden, die die simultane Quantifizierung von über 20 Stoffen erlauben; dies ist besonders im Falle des erweiterten

Neonatal-Screenings auf angeborene Stoffwechselstörungen von essentieller Bedeutung. Im Bereich des Therapeutischen Drug Monitorings wird die Möglichkeit eröffnet, typischerweise in Kombination verabreichte Medikamente simultan zu quantifizieren, einschließlich relevanter Metaboliten dieser Stoffe [3].

Praktikabilität: Die LC-Tandem-MS zeichnet sich durch hohe Robustheit aus. Eine angemessene Probenaufbereitung vorausgesetzt, sind Reinigungsarbeiten an der Ionenquelle sehr selten notwendig und in kurzer Zeit ohne Belüften des Systems durchführbar. Die ESI erfolgt außerhalb des schwer zugänglichen MS-Vakuumbereichs, nur ein "sauberer" Ionenstrom gelangt in diese

Gerätezone. Im Gegensatz dazu gelangt bei der GC-MS das gesamte GC-Eluat in den dort schwer zugänglichen Quellenbereich, der durch nicht-ionisierte Matrixreste verschmutzt wird. Aus diesem Grund ist der Aufwand für Geräterwartung und Probenaufreinigung bei der LC-Tandem-MS ungleich geringer als bei der GC-MS. Ein Ölwechsel der Vorvakuum-Pumpen ist etwa halbjährlich erforderlich, die Turbomolekularpumpen sind wartungsfrei. Routinemäßige Wartungen sind bei Tandem-MS-Systemen nicht zwingend erforderlich, da ein regelmäßiger Austausch von Verschleißteilen nötig ist.

Probendurchsatz: Die hohe Robustheit der LC-Tandem-MS, die typischerweise kurzen analytischen Laufzeiten unter 5 min. und die Möglichkeit, einfache, oft "generische", d.h. auf mehrere unterschiedliche Assays anwendbare, weitgehend automatisierte Probenvorbereitungsverfahren zu verwenden (z. B. mit den Standardschritten Zugabe der Internen Standards – Proteinfällung – Zentrifugation – On-line Festphasenextraktion mit Säulenschaltung), erlaubt die LC-Tandem-MS Hochdurchsatz-Analysen im Dauerbetrieb rund um die Uhr.

Richtigkeit: Da die LC-Tandem-MS – ebenso wie die GC-MS – die Verwendung von Stabilisotopen zur internen Standardisierung erlaubt, ermöglicht die Technik die Entwicklung von Referenzmethoden von höchster analytischer Richtigkeit. Aufgrund des erreichbaren hohen Probendurchsatzes ist die Anwendung solcher Referenzmethoden nicht mehr Kleinstserien wie bei der GC-MS vorbehalten, sondern durchaus im Routinebetrieb realisierbar [2].

Kosten: LC-Tandem-MS-Analysen sind mit niedrigen laufenden Kosten im Cent-Bereich pro Messung verbunden, die für Probengefäße und geringe Mengen an Lösungsmitteln für Probenvorbereitung und Chromatographie anfallen. Die Standzeiten der Säulen sind meist sehr lang, da die Ansprüche an die Trennung gering sind. Die Gerätepreise von LC-Tandem-MS-Systemen liegen in der Dimension von Immunoanalyzern, bei denen jedoch sehr hohe laufende Kosten anfallen. Geht man willkürlich von einer Gerätelaufrzeit von fünf Jahren aus, von 15 Stunden Betrieb an 300 Tagen pro Jahr und einer Analysenzeit von 5 Minuten, so liegt der Gerätekostenanteil pro Analyse unter einem Euro. Bei guter Geräteauslastung stellt die LC-Tandem-MS damit eine sehr kosteneffiziente Technik dar, die gegenüber der Immunoassay-Technologie für viele Analyten bei exzellenter analytischer Qualität ein beträchtliches Einsparungspotential eröffnet.

Limitierungen der LC-Tandem-MS

Trotz des Detektionsprinzips von Mutter- und Tochter-Ion darf die Spezifität der LC-Tandem-MS nicht überschätzt werden. So kann es u. a. zur sogenannten "In-source transformation" von Konjugat-Metaboliten eines Analyten kommen. Beispielsweise kann das Glucuronid des

immunsuppressiven Wirkstoffs Mycophenolsäure schon bei der – an sich als "weich" bezeichneten – Ionisation desintegriert werden, so daß bei der Ionisation Mycophenolsäure-Moleküle aus dem Konjugatmetaboliten entstehen [4]. Dieses Beispiel macht deutlich, daß die der Tandem-MS-Analyse vorgeschaltete Chromatographie im Allgemeinen Konjugatmetabolite von unkonjugierten Analyten trennen sollte; andernfalls würde in diesem Fall Mycophenolsäure-Glucuronid fälschlicherweise als unkonjugierte Mycophenolsäure mitquantifiziert. Immer wieder werden auch bei LC-Tandem-MS-Analysen unspezifische MRM-Signale gefunden, die meist als breite Störpeaks imponieren. Hierbei ist eine Zuordnung zu einem Stoff meist nicht möglich, vermutlich liegen mehrfach-geladene Makromoleküle oder Lösungsmittel-Cluster zugrunde. Generell sollte daher die Quantifizierung mittels LC-Tandem-MS nur bei typischer, symmetrischer Peakform erfolgen, und die Validierung einer LC-Tandem-MS-Methode muß grundsätzlich auch Spezifitätsuntersuchungen umfassen.

Mit gegenwärtig verfügbaren LC-Tandem-MS-Systemen wird die potentielle Nachweisempfindlichkeit moderner Immunoassays meist nicht erreicht. Typische Nachweisgrenzen von LC-Tandem-MS-Assays liegen im Bereich von 1 µg/l bzw. 50 pg absolut. Aufwendige Probenvorbereitungsverfahren zum Aufkonzentrieren der Probe führen meist auch zu einer Zunahme des "Noise". Tandem-MS-Systeme der neuesten Generation weisen deutlich niedrigere Nachweisgrenzen bei jedoch recht hoher Preislage auf.

Zur Quantifizierung von Peptid- und Proteohormonen bzw. Zytokinen eignet sich die LC-Tandem-MS derzeit vor allem aus Empfindlichkeitsgründen nicht. Die sehr hohe Spezifität der LC-Tandem-MS, basierend auf exakten Molekulargewichten, würde hier weiterhin Probleme aufwerfen, falls Analyten auch nur geringfügige Modifikationen wie Trunkierungen aufweisen. Die Quantifizierung entsprechender Substanzen dürfte auf die Dauer der Immunoassay-Technologie vorbehalten bleiben.

Kollisionsinduzierte Desintegrations-Massenspektren der LC-Tandem-MS werden von weit mehr Parametern als Electron Impact-Massenspektren der GC-MS bestimmt. Die Entwicklung von Spektren-Bibliotheken zur Identifikation unbekannter Substanzen in biologischen Proben ist daher für die LC-Tandem-MS nur schwer realisierbar. Ein entsprechendes "unknown screening" in Toxikologie und Umweltmedizin wird wohl der GC-MS vorbehalten bleiben, wobei gegenwärtig Versuche zum Aufbau von LC-Tandem-MS-Spektren-Bibliotheken unternommen werden.

Einsatz der LC-Tandem-MS in der Klinischen Chemie

Routinetaugliche LC-Tandem-MS-Systeme sind Mitte der 90er Jahre kommerziell verfügbar geworden. Im Bereich der Arzneimittel-Analytik der pharmazeutischen

Industrie hat die Technik rasch Verbreitung gefunden und konventionelle HPLC-Methoden und die GC-MS in kurzer Zeit weitgehend verdrängt. Die erste wesentliche Anwendung der Technik in der klinischen Labordiagnostik war das von Rashed et al. beschriebene erweiterte Neonatalscreening auf angeborene Stoffwechselstörungen aus kapillären Blutproben [5]. Auf Basis einer inzwischen weiterentwickelten Multimethode kann hierbei eine große Zahl von Stoffwechseldefekten des Aminosäure-Stoffwechsels (über die Erkennung der Phenylketonurie hinaus), des Stoffwechsels organischer Säuren, des Harnstoff-Stoffwechsels und der Fettsäure-Oxidation vor einer klinischen Manifestation erkannt und meist diätetisch behandelt werden [6, 7]. Inzwischen wird ein erweitertes Screening mittels LC-Tandem-MS in vielen Ländern von wenigen zentralen Labors flächendeckend durchgeführt.

Die Verwendung der LC-Tandem-MS im Bereich des therapeutischen Drug Monitorings war zunächst überwiegend wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. Ein wesentlicher Impuls für die Anwendung in diesem Bereich gab im Jahr 2000 die Einführung des Immunsuppressivums Rapamycin (syn. Sirolimus). Wie bei den bis dato vorwiegend verwendeten Substanzen Cyclosporin und Tacrolimus ist bei diesem Stoff aufgrund der intra- und interindividuell stark variablen Pharmakokinetik ein therapeutisches Monitoring zur Dosisindividualisierung obligatorisch. Während der klinischen Studien zur Einführung des Wirkstoffs stand ein Immunoassay zur Verfügung, der jedoch nach Zulassung des Stoffs aus firmenpolitischen Gründen vom Markt genommen wurde. Da Rapamycin nur eine sehr geringe UV-Absorption aufweist, sind konventionelle HPLC-Methoden für die Messung von Rapamycin im Vollblut kaum routinetauglich, während sich die LC-Tandem-MS für diesen Zweck hervorragend eignet. Weil Rapamycin im Gegensatz zu Cyclosporin und Tacrolimus keine Nephrotoxizität aufweist, stellt die Einführung dieses Stoffes in der Transplantationsmedizin einen wesentlichen Fortschritt dar, der direkt von der Verfügbarkeit der LC-Tandem-MS abhängt. Entsprechend ist das Monitoring von Rapamycin für eine rasch zunehmende Zahl klinischer Schwerpunkt-Labors der Auslöser für die Implementierung von LC-Tandem-MS-Systemen, die dann die Basis für die Entwicklung weiterer Verfahren bieten. Die LC-Tandem-MS wird so derzeit in einer kontinuierlich wachsenden Zahl medizinischer Routinelabors sowohl im stationären als auch im niedergelassenen Sektor genutzt. Handhabung und Routinetauglichkeit der LC-Tandem-MS sind der anderer chromatographischer und massenspektrometrischer Verfahren deutlich überlegen. Für die allermeisten potentiellen Analyten im Bereich der Labormedizin ist die Anwendung der LC-Tandem-MS keine mehr oder weniger zwingende Voraussetzung (wie im Falle von Rapamycin) und alternative Messverfahren sind verfügbar, jedoch sind entsprechende LC-Tandem-MS-Verfahren hinsichtlich der Einfachheit der Probenvorbereitung, Spezifität, Empfind-

lichkeit, des Probendurchsatzes und der laufenden Kosten fast immer überlegen. So konkurriert die LC-Tandem-MS mit allen konventionellen chromatographischen Methoden wie auch mit der Immunoassay-Technologie in der Analytik niedermolekularer Stoffe.

Die routinemäßige Anwendung von LC-Tandem-MS-Verfahren im klinischen Umfeld stellt prinzipiell andere Anforderungen als die Verwendung der Technik im Bereich der pharmakologischen Forschung, in dem sie primär etabliert war. Sehr hohe Robustheit der Verfahren, Vorkehrungen für den Fall von technischen Defekten und die rasche und lückenlose Befunderstellung sind wesentliche Voraussetzungen für den Einsatz entsprechender Verfahren in der direkten Patientenversorgung. Sind Methoden in einem klinischen Labor längere Zeit etabliert worden, ist die weitgehend selbstständige Bearbeitung von Routineserien durch gut eingewiesenes technisches Personal im Allgemeinen gut realisierbar. Im Gegensatz zu photometrischen und immunometrischen Analysensystemen liegt bei der LC-Tandem-MS die unmittelbare Systemverantwortung inklusive Methodenentwicklung und Koordination des technischen Unterhalts jedoch in aller Regel bei entsprechend qualifizierten Akademikern, da hier immer noch ein sehr viel intensiveres Engagement als bei lange etablierten vollautomatisierten Routinelabor-techniken notwendig ist. Im klinischen Sektor wird die Implementierung der LC-Tandem-MS daher momentan eher durch die jeweilige Personalstruktur als durch die Systemkosten limitiert.

Perspektiven der LC-Tandem-MS

Gerätetechnische Entwicklungen dürften die Sensitivität von LC-Tandem-MS-Systemen in den kommenden Jahren weiter erhöhen. Des weiteren wird die Integration der Probenvorbereitung hin zu weitgehend geschlossenen Analysensystemen Gegenstand der technischen Entwicklung sein. Auf applikativer Seite ist zu hoffen, daß Diagnostika-Hersteller komplette Lösungen für spezifische Parameter anbieten. Kits mit Kalibrations- und Kontroll-Materialien, Materialien zur Probenvorbereitung und besonders konfektionierte Interne Standard-Substanzen können die Implementierung von Methoden für medizinische Labors erheblich erleichtern, was insbesondere dann relevant ist, wenn ein breites Analysenspektrum vorgehalten werden soll. In Frage kommen LC-Tandem-MS-Analysen für ein Routinelabor momentan z. B. bei Analyten wie Homocystein, 17- α -OH-Progesteron, Urin- und Plasma-Metanephren, 25-OH-Vitamin D3, Cortisol, Antiepileptika, Amino-glykosid-Antibiotika etc. Damit stehen LC-Tandem-MS-Methoden bei einer Reihe von Parametern in Konkurrenz zu kommerziell angebotenen Immunoassays. Dies gilt insbesondere – aber keineswegs ausschließlich – für die Messung von Immunsuppressiva. In diesen Bereichen wird die kostengünstige LC-Tandem-MS einen erhebli-

chen Preisdruck auf die Anbieter von Immunoassays ausüben.

Über die Anwendung auf bekannte Analyten hinaus eröffnet die enorme analytische Leistungsfähigkeit der LC-Tandem-MS besonders durch die Möglichkeit umfangreicher Multianalytmethoden die Perspektive, eine Vielzahl von Stoffwechselmetaboliten simultan zu quantifizieren. Die LC-Tandem-MS ist damit eine Schlüsseltechnik von Metabolomics, dem Ansatz - analog zu Genomics und Proteomics -, den metabolischen Phänotyp des Menschen umfassend zu beschreiben. Hierbei besitzt neben der Identifikation und Quantifizierung von einzelnen neuen Markern besonders die zusammenschauende Bewertung der Konzentrationen zahlreicher Stoffe im Sinne eines Profiling – wie im erweiterten Neonatalscreening bereits realisiert – möglicherweise ein erhebliches diagnostisches Potential.

Die flexible Methodenentwicklung mit Hilfe der LC-Tandem-MS – unabhängig von der Diagnostika-Industrie – wird vermutlich dem Therapeutischen Drug Monitoring bzw. der Klinischen Pharmakologie wesentliche neue Impulse geben, da in einem völlig neuen Umfang untersucht werden kann, für welche Präparate eine Individualisierung der Behandlung für den Behandlungserfolg vorteilhaft sein kann. Ist dies für ein Arzneimittel der Fall, kann mit Hilfe der LC-Tandem-MS auch kurzfristig eine entsprechende Routineanalytik angeboten werden, während bisher die Entwicklung entsprechender Immunoassays viele Jahre dauerte oder diese am latenten Widerstand der Arzneimittelhersteller scheiterte. Damit dürfte die LC-Tandem-MS längerfristig direkte Auswirkungen auf therapeutische Standards haben.

Nach etwa fünf Jahren der Anwendung der LC-Tandem-MS in der Labormedizin ist deutlich geworden, daß diese enorm leistungsfähige Technik auf Dauer einen fes-

ten Platz im methodischen Instrumentarium des Fachs einnehmen wird, insbesondere im Bereich des therapeutischen Drug Monitorings, der Diagnostik von Stoffwechselstörungen und auch in der labormedizinischen Forschung.

Literatur

1. Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzner J, Spöhrer U, Seidel D. Quantification of sirolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using on-line solid-phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:40–5.
2. Vogeser M, Briegel J, Jacob K. Determination of serum cortisol by isotope-dilution liquid-chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:944–7.
3. Streif F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. *Clin Chem* 2002;48:955–8.
4. Vogeser M, Zachoval R, Spöhrer U, Jacob K. Potential lack of specificity using electrospray tandem-mass spectrometry for the analysis of mycophenolic acid in serum. *Ther Drug Monit* 2001;23:722–4.
5. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alammoudi M, Alwattar M, Ozand PT. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem* 1997;43:1129–41.
6. Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B* 2001;758:27–48.
7. Wilcken B, Wiley V, Hammon J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003;348:2304–12.