



**Institut für Laboratoriumsmedizin,
Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik**

Massenspektrometrie: Technologie der Zukunft auch in der Qualitätssicherung?

Uta Ceglarek

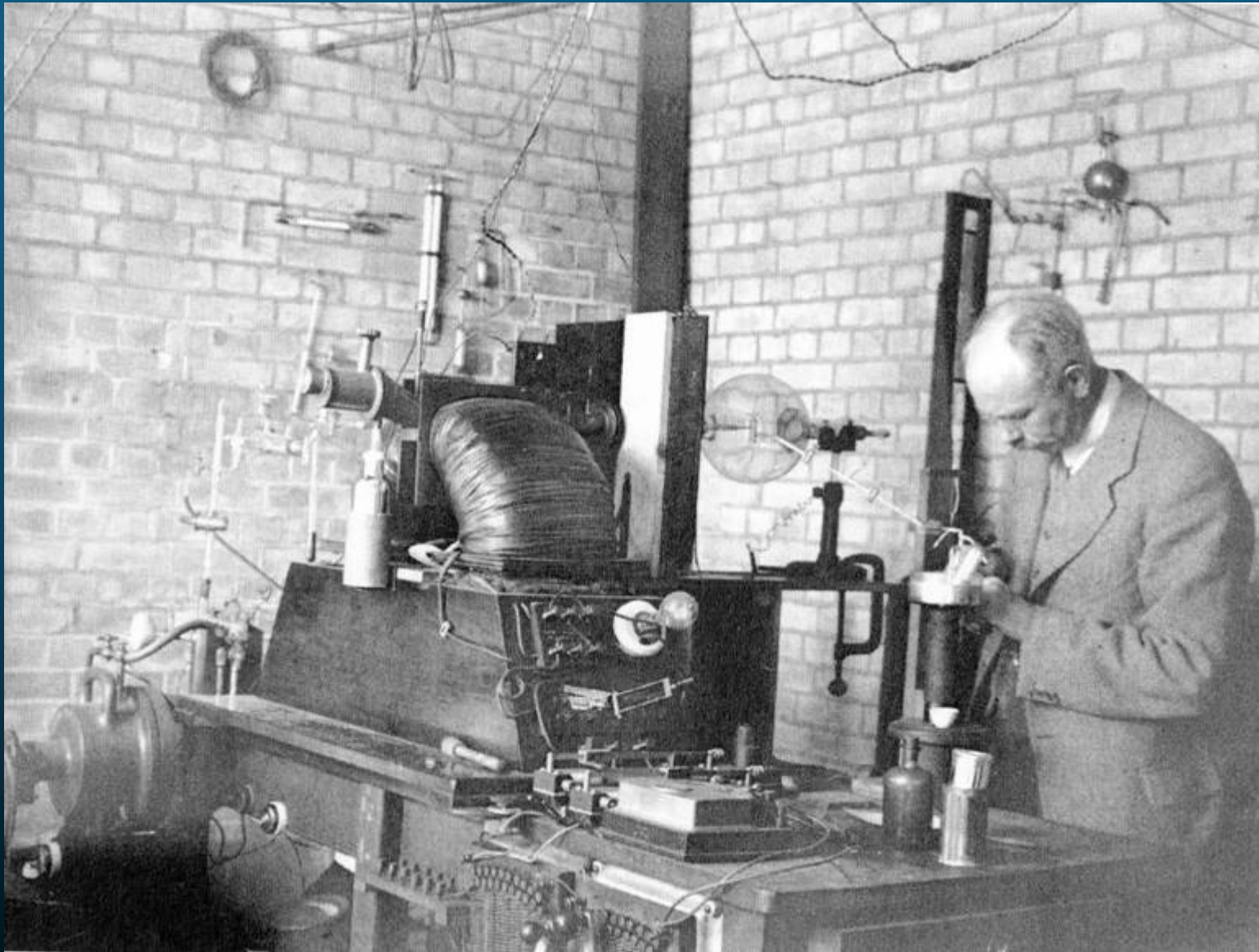
Berlin 3.Juli 2009

Anfang der Massenspektrometrie



Nobelpreis für Physik 1906

Thomson J.J. On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures *Philosophical Magazine*, **1899**, 48:295, p.547-567



Massenspektrometer von Francis William Aston 1921, University of Cavendish
(Watson JT, Sparkman OD Introduction to Mass Spectrometry, Wiley 2007)

Moderne LC-MS/MS Analytik



Orbitrap Thermo



API 5500 Applied
Biosystems



Waters

Proteinanalytik mit Massenspektrometrie

Nobelpreis für Chemie 2002

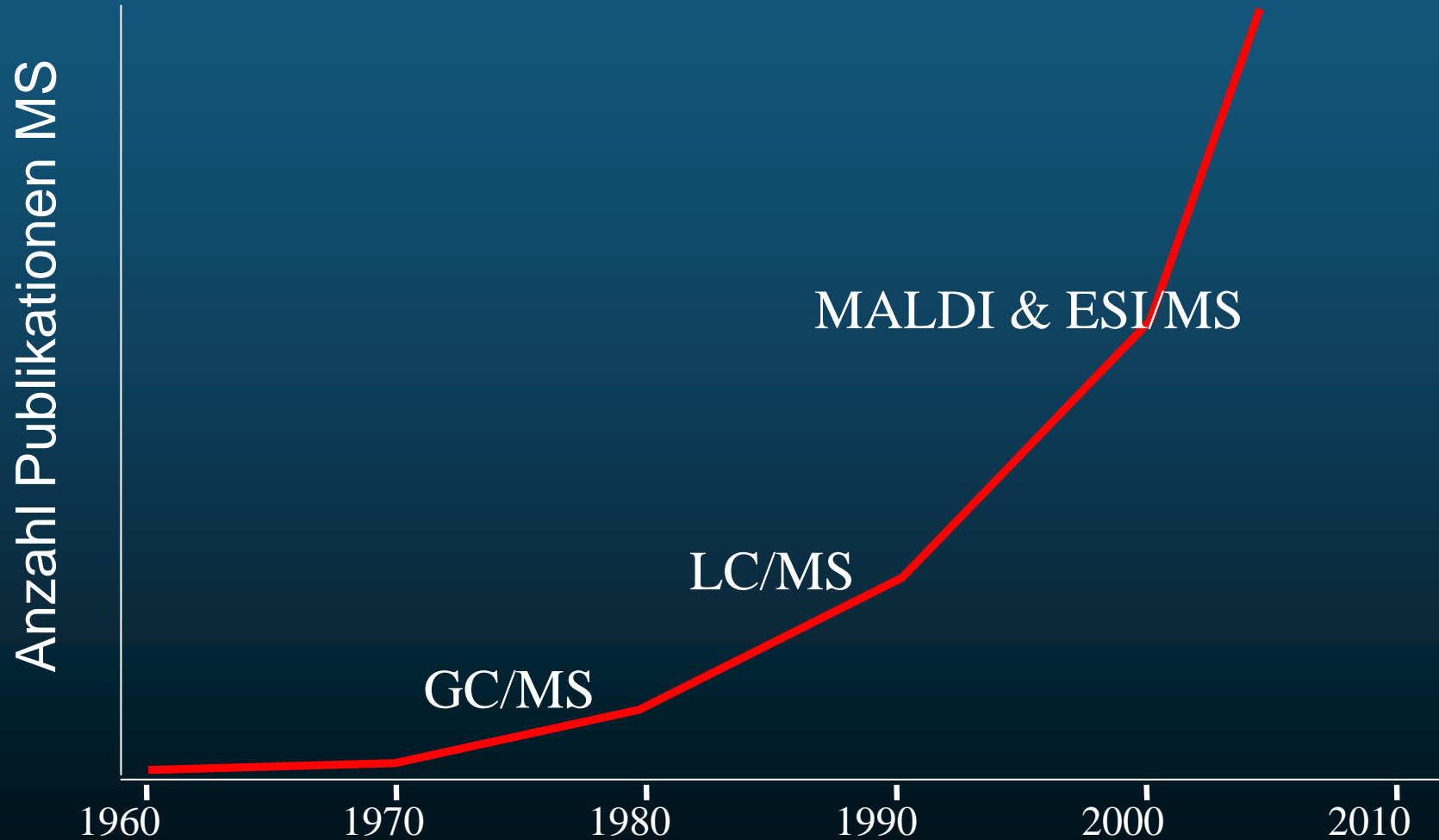


„ Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Tanaka K**, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida T. Rapid Commun Mass Spectrom 2: 151 (1988)

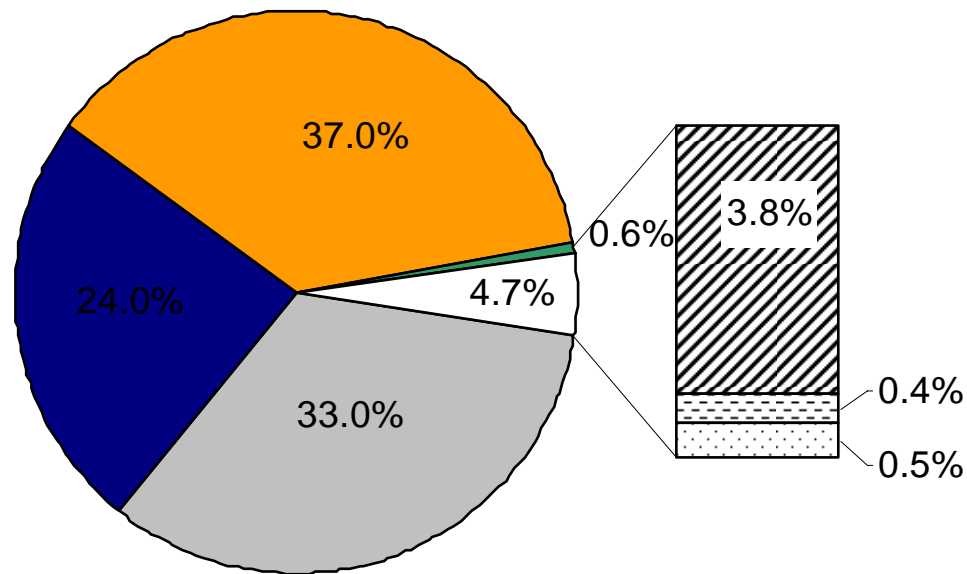


"Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules," **J. B. Fenn**, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, Science 246, 64 (1989)

Entwicklung der massenspektrometrischen Analysetechnik



Massenspektrometrie und klinisch-chemische Analytik



- Photometrie
- Elektrochemische Methoden
- Immunchemische Verfahren
- Molekularbiologie
- Elektrophorese
- Chromatographie
- LC-MS/(MS)

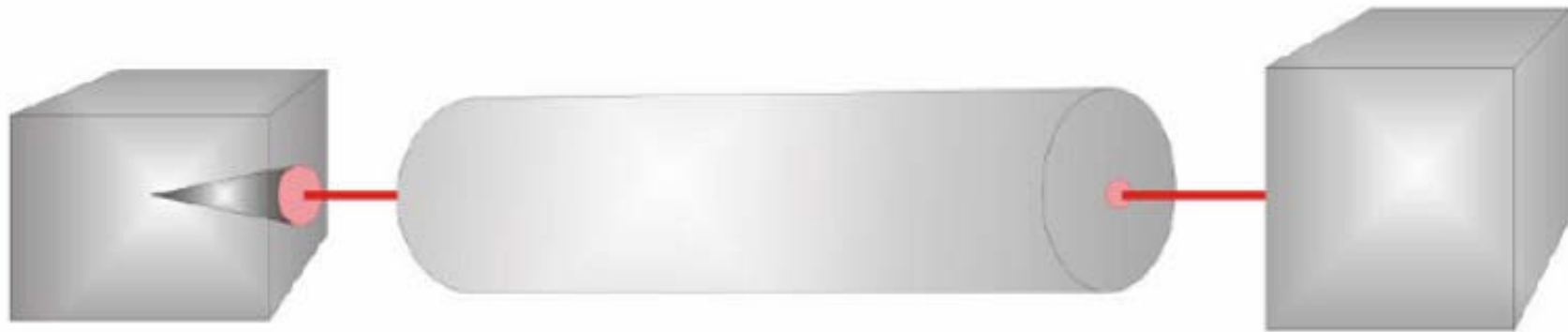
Prinzip der Massenspektrometrie

Physikalisches Verfahren, mit dem ionisierte Moleküle entsprechend ihrer Masse im elektrischen oder magnetischen Feld aufgetrennt werden.



Elektronische Wiegung von Molekülen

Aufbau eines Massenspektrometers



Ionenerzeugung

Ionenquelle

- Elektronenstoß-Ionisation (EI)
- Chemische Ionisation (CI)
- Fast-Atom-Bombardment (FAB)
- Elektrospray-Ionisation (ESI)
- Matrixunterstützte Laserdesorption/ Ionisation (MALDI)

Ionentrennung

Massenanalysator

- Quadrupol
- Magnetisches Sektorfeld
- Elektrisches Sektorfeld
- Flugzeitanalysator (TOF)
- Elektrische Ionenfalle (Ion Trap)
- Elektromagnetische Ionenfalle (Ionencyclotron)

Ionennachweis

Detektor

- Konversionsdynode mit Sekundärionenvervielfacher (SEV)
- Szintillationszähler
- Vielkanalplatte (multichannel plate)
- Faraday-Cup

Massenanalysatoren

	Quadrupol	Ion Trap	TOF	Orbitrap
Auflösung	2000	4000	20 000	100 000
Massebereich	3000	6000	> 100 000*	50 000
Accuracy	100 ppm	100 ppm	10 ppm	< 5 ppm
MS/MS	MS/MS	MS ⁿ	MS/MS	-
Quantifizierung	gut	schlecht	schlecht	schlecht

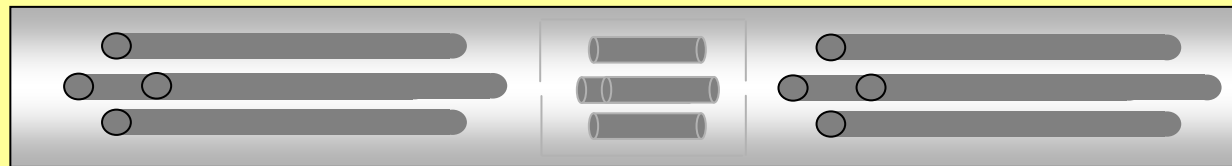
*) linear mode

1. Bestimmung der Masse eines Ions
2. Bestimmung des Masse zu Ladungsverhältnisses (m/z)
3. Messung von Gasphasen-Ionen im Hochvakuum

Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie

Schaltung von 3 Massenspektrometern in Serie

Triple - Quadrupole - MS



1. Quadrupol

2. Quadrupol

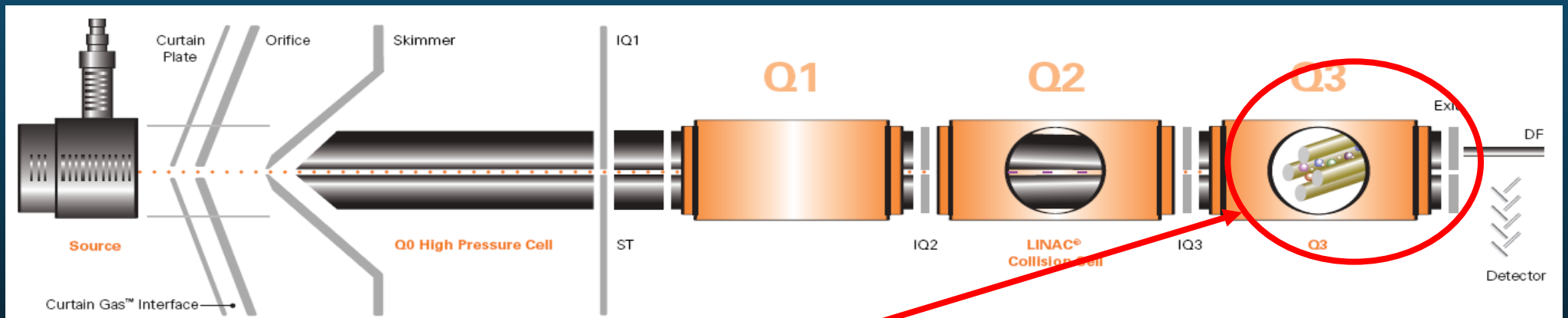
3. Quadrupol

Kollisionszelle

Fragmentierung ausgewählter Molekülonen durch Stöße mit Gasmolekülen

Multi-Targetanalytik mit QTrap MS

Quadrupol Linear Ion Trap Mass spectrometry (QTrap)



Q3 kann als Quadrupol (Quantifizierung) oder Lineare Ionenfalle (Identifizierung) eingesetzt werden

LC-MS/MS in klinischen Applikationen

Vorteile:

- neue diagnostische Möglichkeiten
- hohe Präzision und Richtigkeit
- robust
- Multiplex testing
- kurze Analysenzeiten
- geringe Testkosten

Nachteile:

- hohe Anschaffungskosten
- keine evaluierten Testkits
- qualifiziertes Personal erforderlich

Therapeutisches Drugmonitoring mit LC-MS/MS



Immunsuppressive Therapie



Gleichgewicht zwischen effektiver Therapie und Aufrechterhaltung des Immunsystems



- Infektionen (viral, bakteriell, Pilze)
- maligne Entartung von Zellen
- Vielzahl substanzspezifischer NW

Voraussetzungen für die Durchführung eines Therapeutischen Drugmonitorings

Die Konzentration des Medikaments im Plasma muss mit der Wirkung am Rezeptor (Wirkort) im Gleichgewicht stehen (steady state).

Eine zuverlässige Bestimmungsmethode muss vorhanden sein:

- Robustheit (Matrixeffekte, Verschleppung)
- Verfügbarkeit (24h an 7 Tagen/Woche)
- Reproduzierbarkeit (Vergleichbarkeit der Befunde)
- Richtigkeit (Kreuzreaktivität mit Metaboliten)

Immunsuppressiva

Cyclosporin A (Sandimun®)

Calcineurin-Inhibitor, hemmt selektiv die Aktivierung von T-Zellen und die Expression von Zytokinen wie IL-2

Tacrolimus (FK506, Prograf®)

ähnlicher Wirkmechanismus, aber 10-100 wirksamer als CsA!

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®)

Hemmt die Proliferation von T- und B-Zellen durch Inhibition der p70 S6 Kinase nach Bindung an mTOR

Everolimus (Certican®)

Modifiziertes Rapamycin mit verbesserter Dosis/Wirkung

Immunoassays und TDM von Immunsuppressiva

Kompetitive Testsysteme:

EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

FPIA: Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay

Direkte Testsysteme:

CEDIA: Genetic engineering based technology

ACMIA: Microparticle-Immunoassay

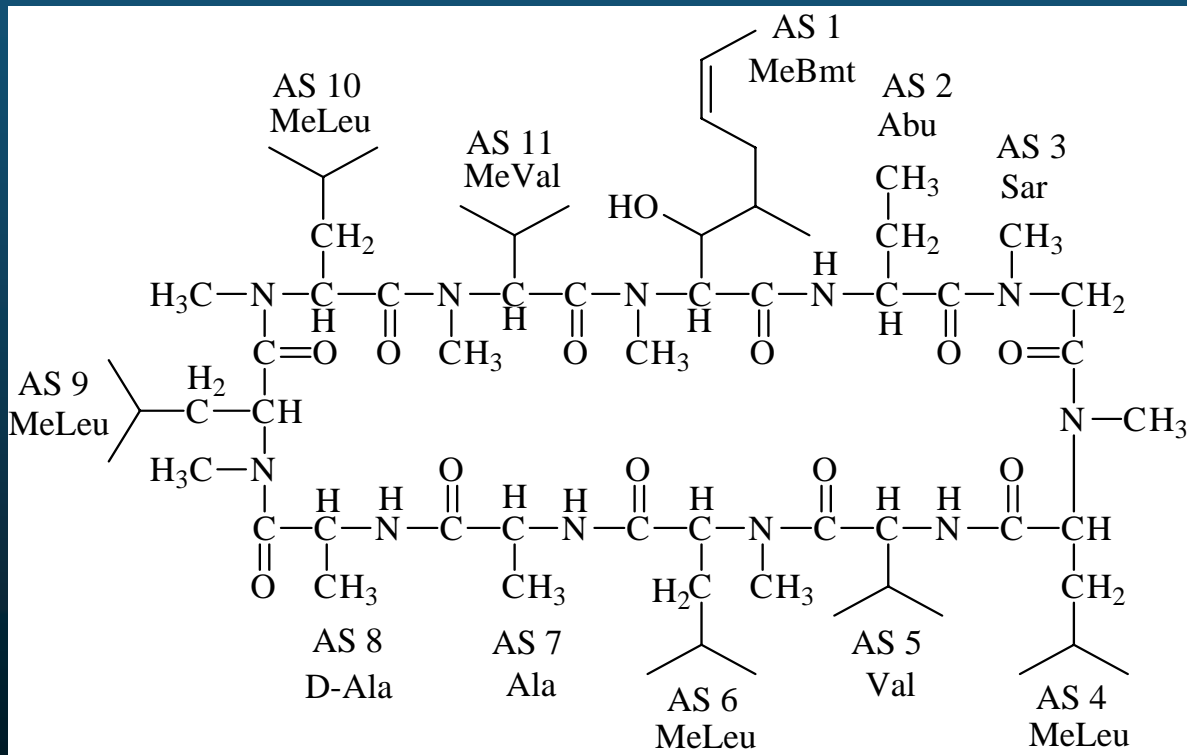
ARCHITECT: Two step Chemiluminescent Microparticle Immunoassay

Immunoassays für Immunsuppressiva

1. kleine Moleküle, nur ein spezifisches Epitop
2. Kreuzreagierende Metabolite
3. Interferenzen mit der Probenmatrix

Cyclosporin A

zyklisches Undecapeptid (11 AS), Makrolid, MW 1202.8

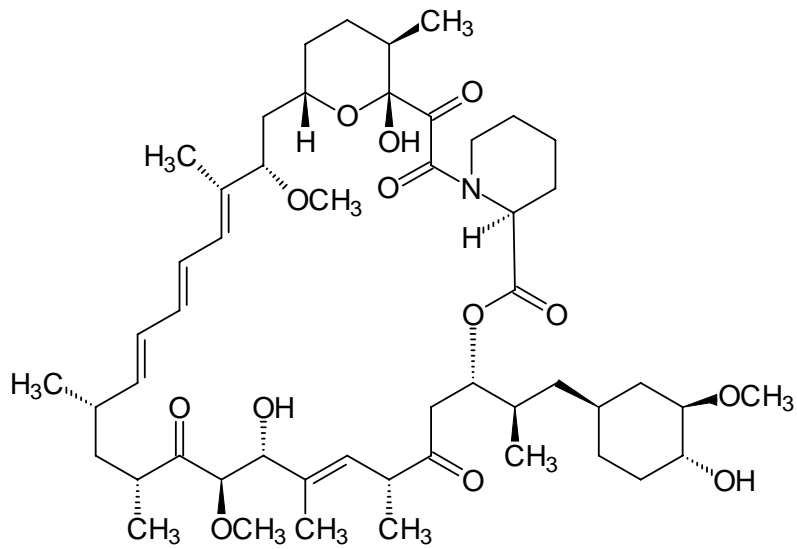


über 30 bekannte Metabolite durch:

- Hydroxylierung
- Demethylierung
- Cyclisierung

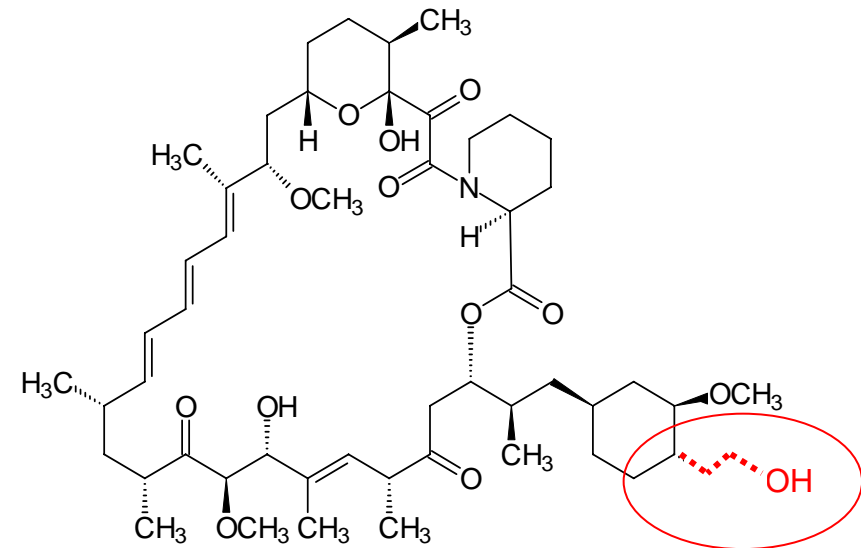
AM1 (aktiv)
AM19 (aktiv)
AM4N
AM1a

Sirolimus und Everolimus



Rapamycin MW 914,2

Halbwertszeit: 60 Stunden



Everolimus MW 958,25

Halbwertszeit: 28 Stunden

TDM von Immunsuppressiva mit LC-MS/MS am ILM Leipzig

Methodenentwicklung: 2002-2003

Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry

Ceglarek, U., Lembcke, J., Fiedler, G.M., Werner, M., Witzigmann, H., Hauss, J.P., Thiery, J. *Clinica Chimica Acta*, (2004); 346:181-190.

Methodenumstellung: Tacrolimus (September 2002)

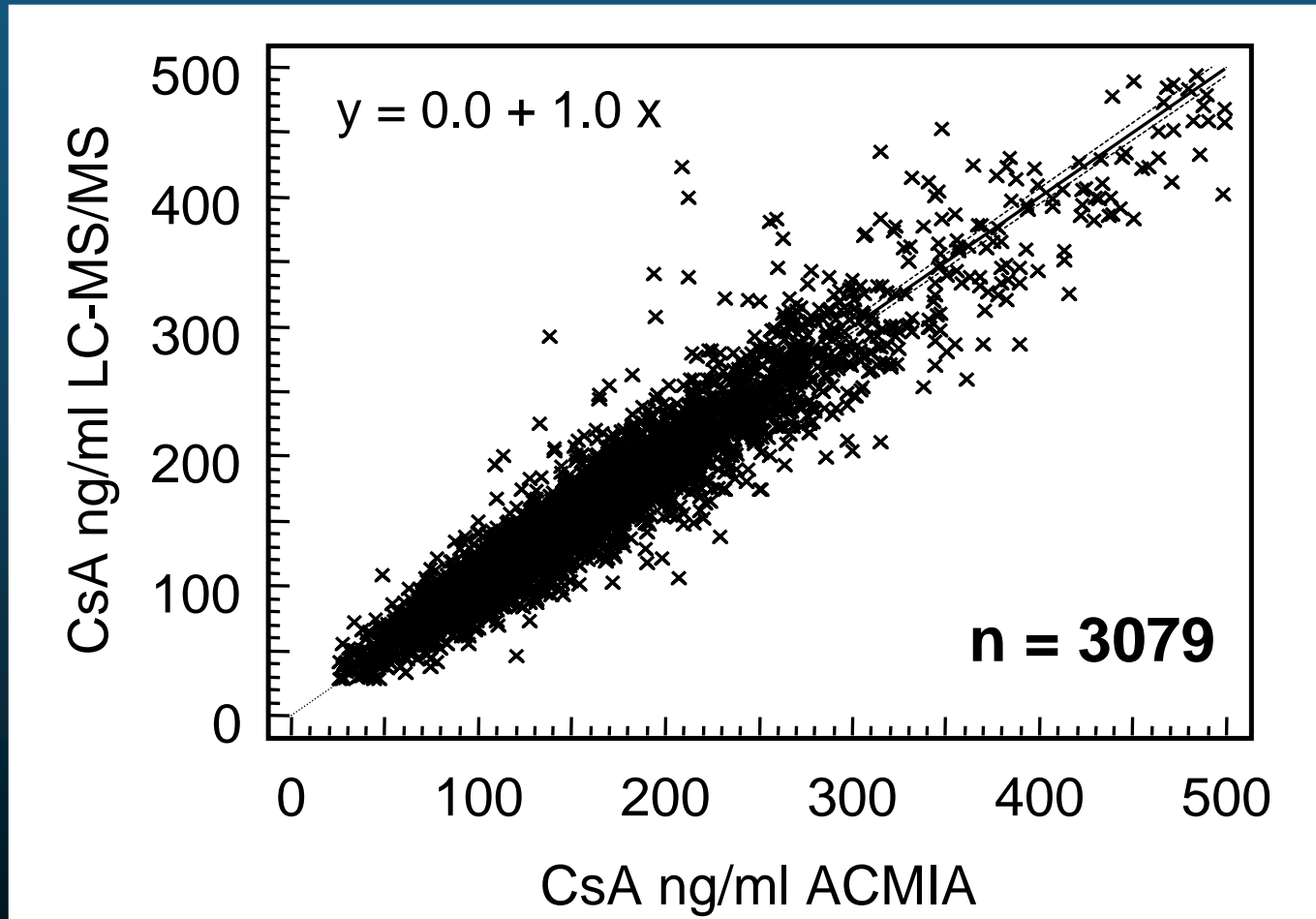
Sirolimus (Oktober 2002)

Cyclosporin A (April 2004)

Everolimus (April 2004)



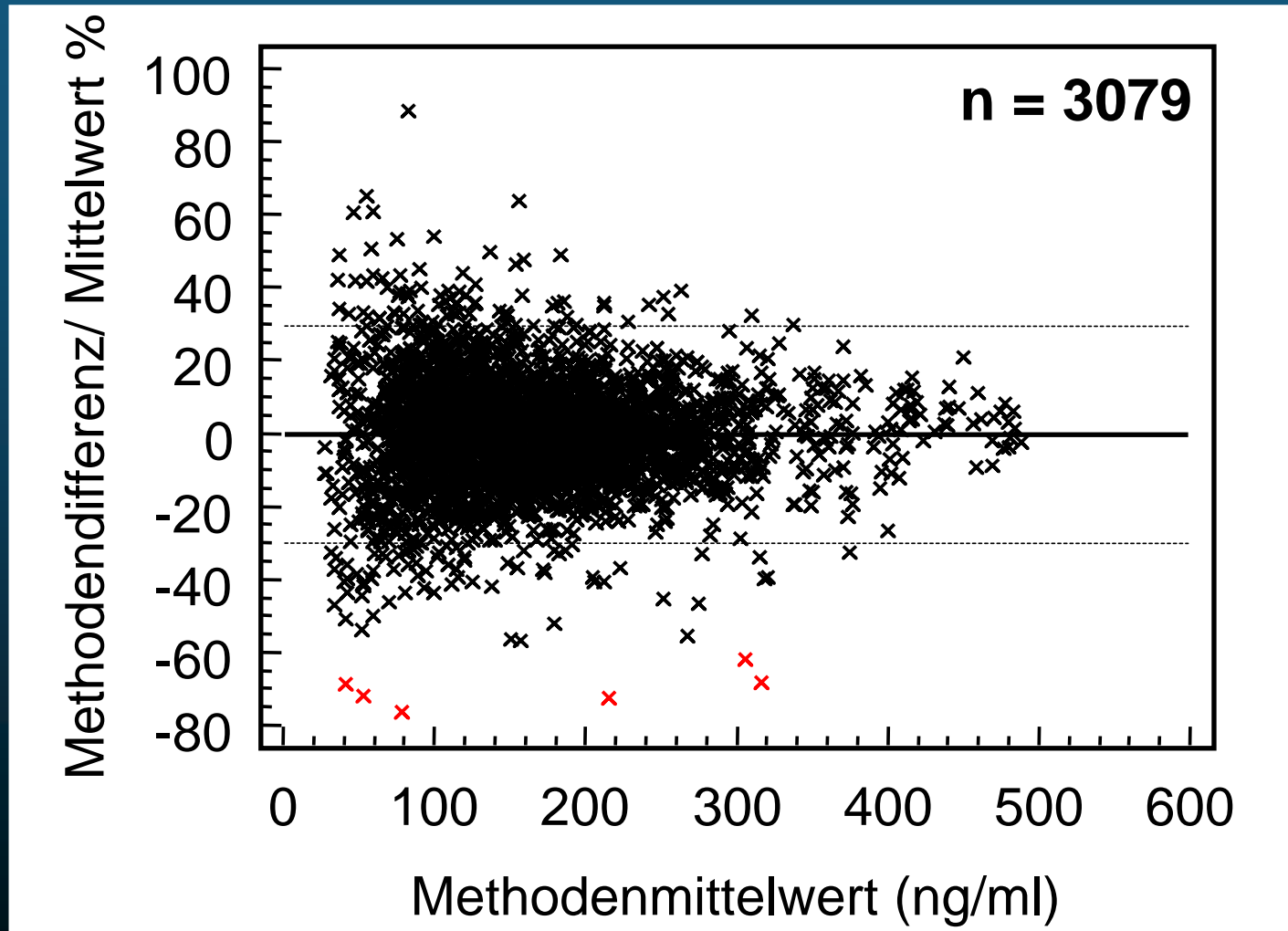
Methodenvergleich Talspiegel ACMIA[®] vs. LC-MS/MS für CsA



$r_s = 0.95$ (95% CI:[0.95, 0.96])

Passing Bablok Regression

Prozentuale Methodendifferenz (ACMIA[®]-LC-MS/MS)



**Bland Altman
Plot**

+1.96 SD 29.9

Mittl. Differenz

0.1

-1.96 SD -29.6

$p = 0,761$

Es gibt keine signifikante Messdifferenz der CsA-Bestimmung.

Präzision der CsA-Bestimmungen

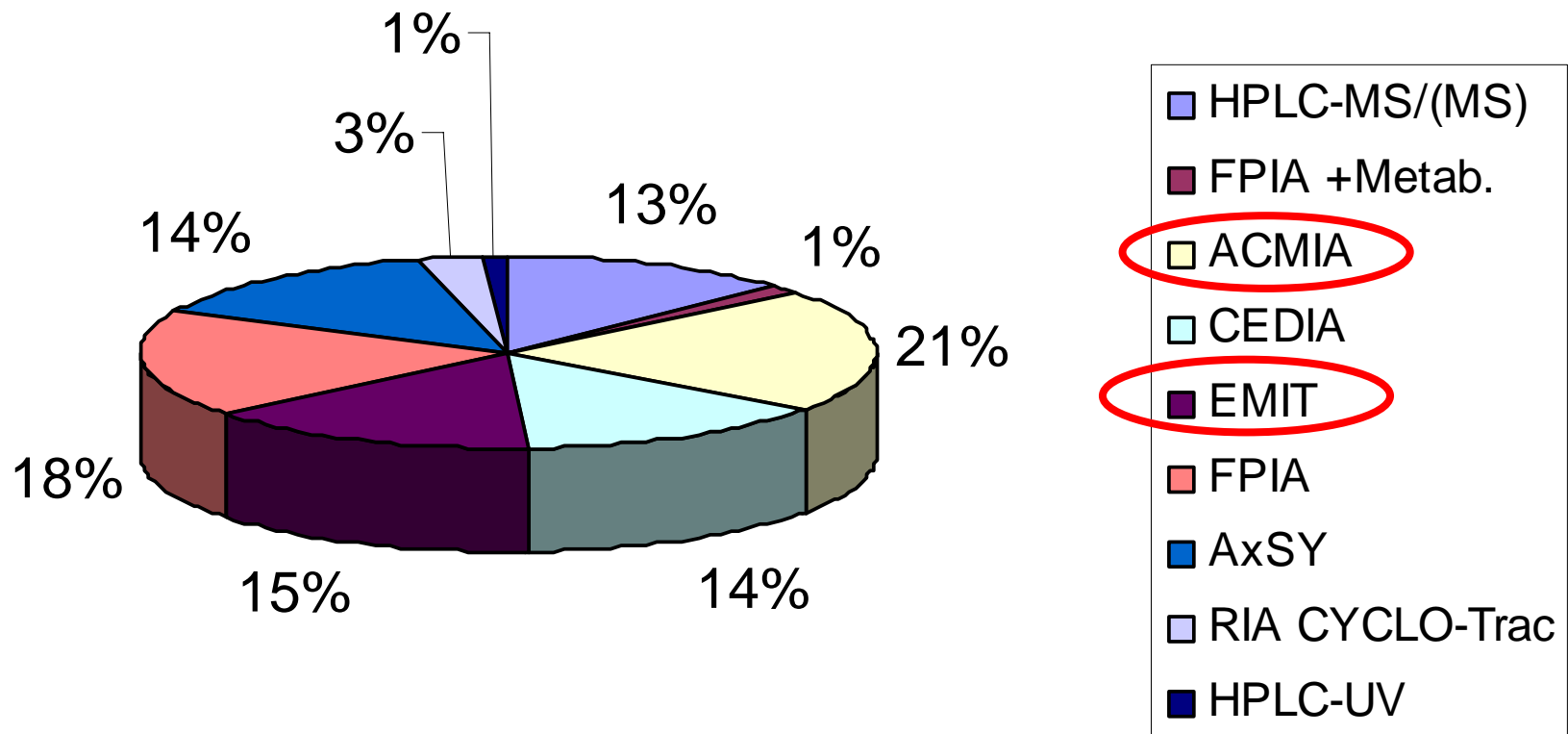
Dimension (ACMIA) 12/2003

LC- MS/MS 1/2009

QK Biorad	C in ng/ml	VK in %	QK CS	C in ng/ml	VK in %
QK 1	57	14,7	QK 1	104	4,2
QK 2	119	10,7	QK 2	246	3,6
QK 3	310	9,2	QK 3	502	2,8

Immunoassays im TDM

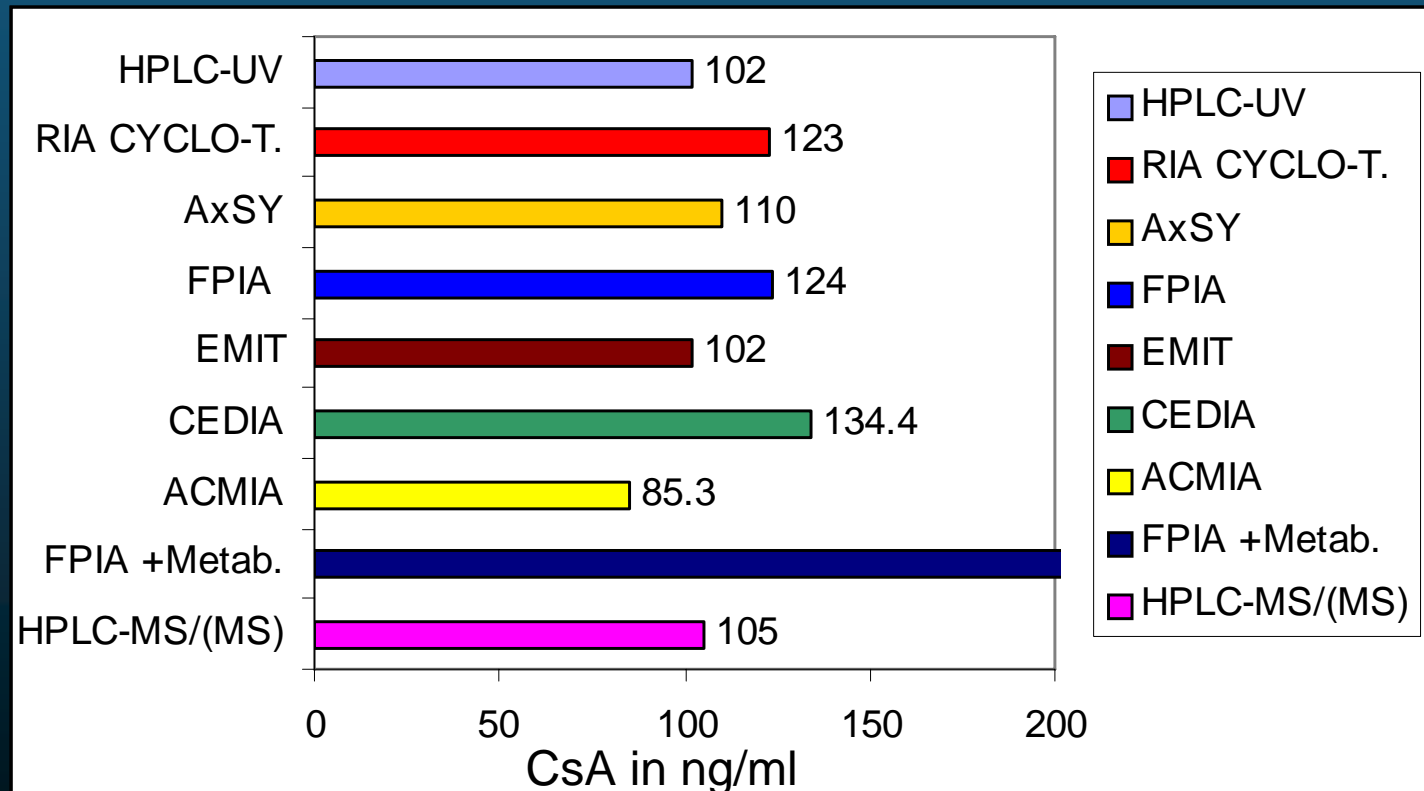
Cyclosporin A



International Proficiency Testing Scheme London 2008: 475 RV-Teilnehmer

Immunoassay Cyclosporin A- Kreuzreaktivitäten

Ringversuchsprobe CsA: Patient nach Knochenmarkstransplantation



VK: ACMIA 16.3%

CEDIA 9.5%

LC-MS/MS 6.5%

International Proficiency Testing Scheme London: 475 RV-Teilnehmer

Ringversuch Sirolimus- Immunoassay

100% Kreuzreaktivität mit Everolimus

G.601/3 Sirolimus ug/L Split 10: R.AB;

Probe A: 0 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
				4.300
				4.700 B8
				4.800
				5.100 B8
				5.200 B8
				5.300 B8
3				5.400
				5.500 B8
				5.500 B8
				5.600 B8
				5.700
				5.700
				6.900

Xm= 5.362 s%=11.6 N=13-0
Md= 5.400 s =0.62
40%-Ber: 3.240 - 7.560
ZW= 0.000 Vk-Bew=0.00
SollBer: 0.000 - 7.020

Probe B: 4.9 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
				4.700 B8
				4.800
				4.900
				5.100 B8
				5.300 B8
				5.300
				5.400 B8
				5.700 B8
				5.800 B8
				5.900
				6.000 B8
				6.100
				6.800

Xm= 5.523 s%=10.9 N=13-0
Md= 5.400 s =0.60
40%-Ber: 3.240 - 7.560
ZW= 5.400 Vk-Bew=10.00
SollBer: 3.770 - 7.020

Probe C: 0 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
				0.000
				0.200 B8
				0.900
				1.100 B8
				1.500
				1.700 B8
				2.000
				2.000 B8
				2.300
				2.500 B8
				2.500 B8
				2.500

Xm= 2.125 s%=18.3 N=12-4
Md= 1.850 s =0.39
40%-Ber: 1.110 - 2.590
ZW= 0.000 Vk-Bew=0.00
SollBer: 0.000 - 2.500

Zielwert Everolimus Probe A: 5 ng/ml

Immunoassay im TDM Tacrolimus

Interferenzen

G.601/2 Tacrolimus ug/L Split 20: R.AB;

Probe A: 6.4 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
30098	2	AB	AB08	4.600
30642	4	AB	AB18	5.400 E9
4028	99	AB	AB18	5.800
30406	99	AB	AB08	5.800
5932	99	AB	AB08	5.900
6855	99	AB	AB08	5.900
1509	2	AB	AB08	6.100
7167	99	AB	AB08	6.100 E9

Probe B: 0 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
				0.000
				0.000
				0.000
				0.000
				0.100 E9
				0.100
				0.100 E9
				0.200

Probe C 0 µg/L

Tnr	Me	Re	Ger.	Wert
				0.000
				0.000
				0.000
				0.000
				0.000
				0.100 E9
				0.100 E9
				0.200 E9
				0.500

IMX Tacrolimus funktionelle Sensitivität > 4.1 ng/ml!

6312	2	AB	AB08	6.800	1.000	1.000
4715	2	AB	AB08	6.900 E9	1.100 E9	1.100
8352	99	AB	AB08	7.000	1.100	1.400
30819	2	AB	AB08	7.000	1.300	1.500
160	4	AB	AB99	7.100	1.500	1.500 E9
1854	0	AB	AB08	7.230 E9	1.500 E9	1.500
4465	4	AB	AB08	7.500	1.500	1.500

d.h. VK= 20%

3.2 µmol/L=4.92 µmol/L

2115 4 AB AB08 8.550

Xm= 6.858 s%-14.0 N=28-0
 Md= 6.850 s -0.96
 40%-Ber: 4.110 - 9.590
 ZW= 6.850 Vh-Bew=10.00
 SollBer: 4.790 - 8.910

Xm= 1.017 s%-20.1 N=27-21
 Md= 1.000 s -0.20
 40%-Ber: 0.600 - 1.400
 ZW= 1.000 Vh-Bew=0.00
 SollBer: 0.000 - 1.500

Xm= 0.919 s%-27.3 N=27-19
 Md= 1.000 s -0.25
 40%-Ber: 0.600 - 1.400
 ZW= 1.000 Vh-Bew=0.00
 SollBer: 0.000 - 1.500

Zusammenfassung

- Die Anwendung der LC-MS/MS im Rahmen des therapeutischen Drugmonitorings ermöglicht eine präzise und richtige Bestimmung von Immunsuppressiva unter Hochdurchsatzbedingungen.
- Die Analytik wird nicht durch Kreuzreaktionen mit Metaboliten beeinflusst.
- Die geringen Nachweisgrenzen erlauben auch bei niedrigen Arzneimittelkonzentrationen eine exakte Bestimmung.
- Trotz in-House Methoden und fehlender kommerzieller Testkits ist die Varianz der LC-MS/MS Bestimmung zwischen den Laboren signifikant niedriger im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Immunoassays.