Verifizierung der freien Metanephrine in Plasma mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an ein Massenspektrometer (LC-MS/MS)

Lina Al Tai, BMA 22-25

Biomedizinische Analytik HF

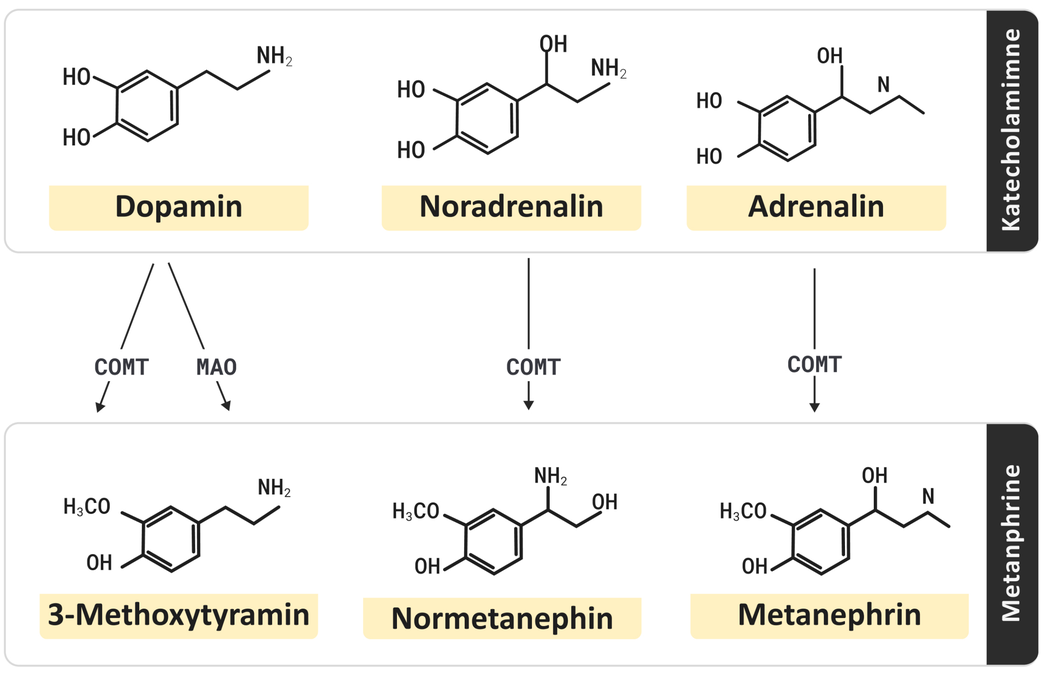
1. Zusammenfassung

Durch die erfolgreiche Methodenverifizierung freier Metanephrine im Plasma konnte am Labor für Stoffwechseldiagnostik des Inselspitals Bern eine neue Analyse etabliert werden. Damit ist die Bestimmung von der freien Metanephrine nun direkt vor Ort möglich und muss nicht mehr an externe Labore abgegeben werden. Bewertet wurden die definierten Akzeptanzkriterien (Linearität, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Präzision, Wiederholbarkeit und Richtigkeit). Alle Kriterien konnten erfüllt werden, sodass die Methode am 12. Mai 2025 in die Routinediagnostik eingeführt wurde. Ein Methodenvergleich mit der bisherigen Fremdversand Methode am Universitätsspital Lausanne (CHUV) zeigte Unterschiede in den Messergebnissen, die auf geräte- und methodenabhängige Faktoren zurückzuführen sind.

2. Einleitung

Freie Metanephrine (Metanephrine, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin) entstehen durch enzymatischen Prozess (siehe Abbilding1) als Abbauprodukte der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin [1]. Sie diffundieren kontinuierlich aus den chromaffinen Zellen in den Blutkreislauf und spiegeln dadurch die Aktivität des Katecholamin Stoffwechsels verlässlich wider. Besonders bei neuroendokrinen Tumoren wie Phäochromozytomen und Paragangliomen, die unkontrolliert Katecholamine produzieren, sind freie Metanephrine im Plasma stark erhöht und stellen hochsensitive Marker dar [2].

Die klinische Bedeutung liegt darin, dass diese Tumoren oft schwer erkennbar sind und Symptome wie Hypertonie, Kopfschmerzen oder Palpitationen hervorrufen. Da die Katecholamin-Ausschüttung schwanken kann, ist die Bestimmung der freien Metanephrine im Plasma zuverlässiger als die alleinige Messung von Katecholaminen. Deshalb gilt die Plasmamessung heute als Goldstandard in der biochemischen Diagnostik dieser Tumoren.



(COMT) Catechol-O-Methyltransferase
(MAO) Monoaminooxidase

Abb. 1 Metabolisierung der Katecholamine

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel: Verifizierung des Chromsystems-Kits für freie Metanephrine auf den beiden LC-MS/MS-Geräten (Shimadzu 40DX3 gekoppelt mit SCIEX Triple Quad™ 6500+).

Fragestellungen:

• Wird eine Quantifizierungsgrenze (LLOQ) von ≤ 30 pmol/L für freies 3-Methoxytyramin erreicht?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Für die Verifizierung wurde eine Verdünnungsreihe von Kalibrators 1 des Chromsystems-Kits mit NaCl-Lösung hergestellt, aufgearbeitet und auf dem LC-40DX gekoppelt mit dem Triple Quad6500+ Massenspektrometer gemessen. Das analytische Prinzip basiert auf einer Flüssigchromatographie mit anschliessender Massenspektrometer (Abbildung 1). Zuerst erfolgt in der Flüssigchromatographie (LC) die Trennung der Substanzen anhand ihrer Polarität. Die Analyten werden auf der Säule unterschiedlich stark zurückgehalten und eluieren zu verschiedenen Zeiten. Danach gelangen sie in das Massenspektrometer (MS), durch Ionisierung in verschiedenen Quadrupolen überführt wo sie selektiert und schliesslich an einem Detektor gemessen werden.

Abb. 2: schematisch Aufbau LC-MS/MS

5. Ergebnisse/ Resultate

Auf beiden eingesetzten LC-MS/MS-Systemen, dem Hauptgerät und dem Backupgerät, wurde mit dem verdünnte Kalibrators Chromsystems-Kit die in der Fragestellung definierte Nachweisgrenze für 3-Methoxytyramin überprüft. Die ermittelten Werte sind in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

Metabolit	Haupt Gerät		Back-up Gerät	
	LLOD	LLOQ	LLOD	LLOQ
MN	27	54	15	46
NMN	17	33	23	70
3-MT	10	**22**	8	**23**

Tabelle 1: Übersicht Resultate von LLOQ auf beide Geräten

6. Diskussion

Die Verifizierung zeigte, dass mit beiden eingesetzten LC-MS/MS-Systemen für 3-Methoxytyramin eine Nachweisgrenze deutlich unterhalb von 30 pmol/L erreicht werden konnte. Damit ist sichergestellt, dass auch sehr geringe Konzentrationen zuverlässig erfasst werden. Dies unterstreicht die hohe Sensitivität der Methode, die es ermöglicht, selbst bei niedrigen Konzentrationen ein deutliches Signal vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Dadurch wird eine präzise Quantifizierung von 3-Methoxytyramin gewährleistet, was insbesondere für die klinische Diagnostik von Bedeutung ist, da auch geringfügige Erhöhungen zuverlässig erkannt werden müssen. Die Resultate bestätigen damit nicht nur die Sensitivität, sondern auch die Robustheit und Stabilität der Methode im praktischen Einsatz.

Referenzen

[1] Eisenhofer et al., 2023, 862-90

[2] Gupta et al., 2015, S. 633–638

Abbildungen

Abb. 1 Fernandez et al., 2023, pp. 19-34 - adaptiert

Abb. 2 (Dewi et al., 2023)- adaptiert