



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Quantitative Analyse von Störsubstanzen für
Blutglukosemessungen aus *dried blood spots* (DBS) mittels
hochauflösender Massenspektrometrie unter
Umgebungsbedingungen**

Autor: Markus Siebenhaar
Institut / Klinik: Institut für Medizintechnologie
Doktorvater: Prof. Dr. C. Hopf

Eine der am häufigsten auftretenden Volkserkrankungen weltweit stellt Diabetes Mellitus dar. Um den Lebensstandard für Diabetes Patienten aufrechterhalten zu können, sind sogenannte Selbstüberwachungssysteme für Blutglukose (*Self-Monitoring of Blood Glucose; SMBG*) unverzichtbar, die für die Blutglukose-Bestimmung direkt durch den Patienten entwickelt wurden. Die am häufigsten verwendeten SMBG-Systeme basieren auf der enzymatischen Umsetzung von Glukose zu Gluconolacton, gefolgt von Redox-Reaktionen, die zu einem Farbumschlag (photometrische Messung) oder zu einem Stromfluss (elektrochemische Messung) führen. Um die Spezifikationen für die Zulassung zur Vermarktung dieser Systeme zu erlangen, muss u.a. die exakte Messung der Glukosekonzentration nach Vorgaben von internationalen Zulassungsbehörden gewährleistet sein. Die Nachweisreaktionen der enzymbasierten Glukose-Messung können dabei von endogenen als auch exogenen Substanzen gestört werden, wodurch ein hohes Risiko für den Patienten entstehen kann. Durch die Diversität der interferierenden Substanzen besteht für deren analytische Erfassung ein Bedarf an Methoden, die sie aus Vollblut simultan, quantitativ erfassen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie entwickelt und ihre Eignung für Analysen von niedermolekularen Substanzen aus getrockneten Blutspots bewertet. Die Desorptions-Elektrospray-Ionisation (DESI) wurde dabei als am besten geeignete Ionisationsquelle identifiziert und deren Parameter optimiert.

Ein kritischer Faktor bei dem Einsatz von direkten Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden stellt die Einbringung eines internen Standards zur Quantifizierung dar. Hierbei konnte eine neuartige *dried blood spot* (DBS) Methodik, die Dreischicht-Methode, entwickelt und validiert werden. Dieses Verfahren erfordert keine zusätzlichen Handhabungsschritte zur Standardisierung und ermöglicht eine patientennahe Diagnostik. Für die Methodenentwicklung wurde Salicylsäure als Modellschicht eingesetzt. Diese zeigte dabei eine homogene Verteilung in den getrockneten Blut-Spots nach der Probenapplikation. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verteilung des internen Standards in der verwendeten Celluloseschicht weitestgehend homogen ist, was jedoch durch die Verwendung eines alternativen Materials verbessert werden kann. Das Verhalten der Probe und des internen Standards in der Celluloseschicht wurden detailliert untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der interne Standard während der Probenapplikation von der Probe gelöst und zusammen mit dem Analyten auf ein Filterpapier transferiert wird.

Zusätzlich konnten zwei die Ionensuppression reduzierende Effekte, die durch die einzelnen Schichten realisiert wurden, identifiziert und beschrieben werden. Die Celluloseschicht zeigt einen starken Filtereffekt wodurch die zellulären Bestandteile der Blutprobe abgetrennt werden. Durch die Messung auf der Rückseite des Filterpapiers konnte eine chromatographische Trennung genutzt werden, die zusätzlich die Matrix verringert und somit die Ionisationseffizienz weiter erhöht. Dabei spielt die Wahl des Filterpapiers eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene Filterpapiertypen untersucht und ein eindeutiger Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Ionisationseffizienz, und damit auf die Sensitivität der Methode, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine minimale Trocknungszeit der Probe zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Dreischicht-Methode zu zwei Stunden ermittelt werden. Ein entscheidender Vorteil zu bestehenden DBS-Methoden wurde in der Unabhängigkeit der Dreischicht-Methode vom

Applikationsvolumen, dem Hämatokrit-Wert des Blutes und von potentiell eingesetzten Antikoagulantia gezeigt. Mit einer Gesamt-Methodenstreuung von 13,5 % erfüllt die Methode Vorgaben aus internationalen Normen für die Quantifizierung aus DBS auf Filterpapier.

Nach erfolgter Methodvalidierung konnte diese erfolgreich auf pharmakologische Studien angewendet und damit die Eignung für zukünftige therapeutische Drug Monitoring Methoden gezeigt werden. Dabei wurde eine Pharmakokinetik-Studie des Hauptmetaboliten Salicylsäure nach oraler Aspirin-Gabe aufgenommen und Pharmakokinetik-Parameter wie Halbwertszeit und maximale Konzentration nach Gabe ermittelt werden. Zusätzlich konnte mittels patientennaher, pharmakologischer Endpunktstudie nach oraler Gabe von Aspirin für fünf Probanden die Salicylsäure-Konzentration quantifiziert und mit Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Messungen verglichen werden. Hiermit konnte erfolgreich die Anwendbarkeit für diagnostische Zwecke gezeigt und belegt werden.

Da besonders im Fall von Typ 2 Diabetes Mellitus Patienten häufig mehrfach Medikationen zur Behandlung eingesetzt werden, wurde die entwickelte Methode auf ihre Eignung zum Zweck der simultanen, quantitativen Multikomponentenanalytik geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Methode zur simultanen Quantifizierung von Acetaminophen, Ibuprofen, Salicylsäure, Tolbutamid und Harnsäure grundsätzlich geeignet ist. Um potentielle Ionensuppressionseffekte durch die zu untersuchenden Substanzen selbst zu identifizieren, wurden Konzentrationsvariationen mittels DESI- und Flowprobe-Quelle parallel erfasst. Hierbei konnte eine Quellen-spezifische Ionensuppression von Harnsäure unter Einsatz der Flowprobe-Quelle bzw. Acetaminophen unter Einsatz der DESI-Quelle ermittelt werden.

In einer Screening-Studie mit einer Gruppe von 150 gesunden Spendern konnte abschließend die Anwendbarkeit der hier entwickelten Methodik auf patientennahe Diagnostik gezeigt werden. Aufgrund der besseren Automatisierbarkeit wurde hierfür die DESI-Quelle eingesetzt. Es wurden sechs Spender positiv auf Salicylsäure mittels DESI-MS und dazu korrelierender Referenz-Analytik getestet, wobei zwei Spender davon eine geringe Glukose-Wert-Abweichung des SMBG-Systems von der Referenzmethode zeigten. Weiterhin konnte bei der Analyse von Harnsäure mit Hilfe einer Tag-zu-Tag-Auswertung der Harnsäure-Konzentration teilweise eine lineare Korrelation zwischen DESI-MS und Referenz-Analytik ermittelt werden. Die Therapeutika Acetaminophen, Ibuprofen und Tolbutamid konnten bei der Screening-Studie mittels DESI-MS nicht erfasst werden. Eine Erweiterung auf mindestens 1000 Spender oder die Untersuchung einer spezifisch erkrankten Zielgruppe wird empfohlen.

Mit der auf DBS basierenden simultanen, quantitativen Multikomponentenanalytik ist ein großer Schritt hin zur personalisierten Gesundheitspflege und individuellen pharmakologischen Studien erfolgt. Durch die Verwendung von industriell hergestellten Dreischicht-Slides können die Proben vom Patienten selbstständig mittels Stechhilfe minimal-invasiv generiert werden und in spezialisierte Labore eingeschickt werden. Mögliche Nebenwirkungen oder Arzneimittelinteraktionen könnten somit schnell und individuell vom behandelten Arzt ermittelt und darauf reagiert werden.