

## Analyse biologischer Proben mit Quadrupol ICP-MS

**René Chemnitzer, Jörg Hansmann, Andreas Stroh**

*Varian Deutschland GmbH, Alsfelder Straße 6, 64289 Darmstadt*

*de.info@varianinc.com · www.varianinc.de*

### Einleitung

Die Analyse von biologischen Proben wie Blut, Serum und Urin ist durch das immer detailliertere Verständnis von Prozessen in Organismen und den daran beteiligten Elementen von zunehmendem Interesse. Dabei ist sowohl die Versorgung mit essentiellen Spurenelementen als auch der Nachweis toxischer Elemente gefragt. Schnelle und empfindliche Analysemethoden werden benötigt, um die pharmakologische Kinetik von Medikamenten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

Die ICP-MS ist seit den Anfängen in den 70er Jahren zu einer Routinemethode weiterentwickelt worden, welche heute durch eine deutlich höhere Nachweisstärke als Multielementmethode z.B. zur Untersuchung der Verteilung von Elementen in Körperflüssigkeiten eingesetzt wird. Biologische Proben stellen nicht nur im Hinblick auf die Probenzufuhr eine Herausforderung für die ICP-MS dar. Die Bildung von Molekülonen hat einen großen Einfluss auf die Richtigkeit der Analyse unterschiedlicher Matrices. In biologischen Proben treten Interferenzen vor allem durch Argon, die Matrixelemente Kohlenstoff, Natrium und Calcium sowie Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und den Molekülonen, die sich daraus im Plasma bilden, auf.

Die Untersuchung auf wichtige Spurenelemente wird im Folgenden dargestellt und Beseitigung der Interferenzen an Beispielen erläutert.

### Analyse biologischer Proben

Die Untersuchung biologischer Proben ermöglicht eine Vielzahl von Aussagen über den Zustand des jeweiligen Organismus. Für die Analysen können verschiedene Medien herangezogen werden (Tab.1). Die Auswahl des Mediums sollte sich an der Fragestellung orientieren, da jedes Material spezifische Eigenschaften besitzt, welche mit der Funktion im Organismus zusammenhängen.

Blut ist ein Transportmedium. Die Spurenelementkonzentration ist abhängig von der kurzzeitig zurückliegenden Aufnahme. Da eine unzureichende Mineralstoffzufuhr mit körpereigenen Reserven ausgeglichen wird, ist bspw. Serum nicht aussagekräftig für Mineralstoffmängel.

Umstritten ist die Aussagekraft der Haaranalyse. Die Ergebnisse sind stark beeinflusst von Alter, Geschlecht, Haarlänge, Haarfarbe, Pflegemitteln sowie Umweltfaktoren der Herkunft. Die endogenen und exogenen Anteile eines Stoffes im Haar können nicht differenziert werden und die Korrelation von Elementgehalten in Haaren mit den Gehalten in Blut/Urin ist nicht belegt.[1]

Allgemein anerkannt ist die Analyse von Haaren als Nachweis für Arznei- und Suchtstoffe sowie für Untersuchungen an historischen Proben.[2]

Tab. 1: Untersuchungsgegenstand biologischer Proben

Anwendungsgebiete	Untersuchungsmatrizes
Medizin <ul style="list-style-type: none"> <li>• Überwachung des Mineralstoffhaushaltes</li> <li>• Nachweis von Arznei- und Suchtstoffen</li> <li>• Innerer Exposition gegenüber Schadstoffen</li> <li>• Nachweis von Giften</li> <li>• Historische Untersuchungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Urin</li> <li>• Plasma</li> <li>• Serum</li> <li>• Vollblut</li> <li>• Haare</li> </ul>
Therapeutische Medizin <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pharmakokinetik</li> </ul>	

**Instrumentelles**

Für die Analysen wurde ein Varian 820-MS, ICP-MS mit Kollisions-Reaktions-Interface (CRI), eingesetzt. Dieses System bietet eine Reihe von patentierten Lösungen, um durch eine gesteigerte Effizienz der Ionenübertragung eine sehr hohe Empfindlichkeit zu erhalten und die Bildung von

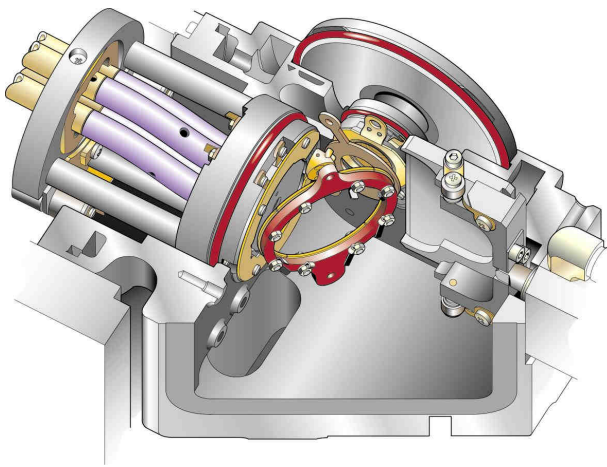


Abb. 1: Schematische Darstellung der 90°reflektierenden Ionenoptik mit Ionenspiegel und S-förmigem Pre-Quadrupol.

Interferenzen zu vermeiden bzw. entstandene Molekülonen durch Kollisionen und Reaktionen aus dem Ionenstrahl zu entfernen.

Das induktiv gekoppelte Plasma ist sehr gut geeignet, um sehr unterschiedliche Matrizes wie Blut und Urin stabil zu ionisieren. Nach dem Passieren des Interfaces muss der Ionenstrahl im Massenspektrometer fokussiert, gleichzeitig Photonen, Neutralteilchen und Partikel aus dem Ionenstrahl entfernt werden.

Der patentierte Ionenspiegel fokussiert die Analytionen mit sehr hoher Effizienz in den

Quadrupol, während Licht und Neutralteilchen vom angelegten elektrostatischen Feld nicht beeinflusst und berührungslos aus dem System entfernt werden [3]. Da keine physischen Barrieren den Weg des Ionenstrahls behindern, besteht nach den Interface-Konen keine Möglichkeit der Ablagerung von Probenbestandteilen und damit gegenüber linear aufgebauten Systemen ein deutlich reduzierter Reinigungsaufwand.

Neben den Analytionen werden im Prozess der Anregung und Übertragung der Ionen auch Molekülonen gebildet, welche die Analyse der Elemente mit der gleichen Masse erschweren. Um die Molekülonen zu zerstören, wird im Varian 820-MS das Kollisions-Reaktions-Interface (CRI) eingesetzt.

Im CRI werden die Kollisions- und Reaktionsgase (H<sub>2</sub> und He) zur Spitze der Interface-Konen geleitet. Die größeren polyatomischen Ionen und Moleküle kollidieren häufiger als die Analytatomme mit dem Kollisions-, Reaktionsgas und werden dabei in Atome zerlegt. Die Abtrennung der Interferenzen durch Reaktionen bzw. Kollisionen wird im Bereich der Interface-Konen durch die erhöhte chemische Reaktivität der Interferenzmoleküle durch hohe kinetische und thermische Energien in diesem Bereich begünstigt. Es werden nur einfache Gase wie Wasserstoff und Helium eingesetzt. Reaktive Gase wie Ammoniak oder Methan werden im CRI nicht benötigt. Die Kollisions- und Reaktionsgase bewirken neben Kollisionen, Ladungsübertragungen, Elektron-Ion-Wechselwirkungen, Ion-Molekül-Wechselwirkungen und Protonenübertragungen.

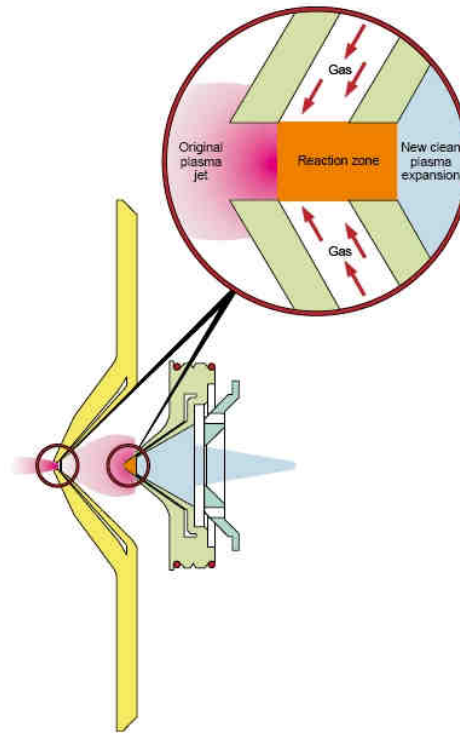


Abb. 2: Schematische Darstellung des Kollisions-Reaktions-Interface (CRI) zur Abtrennung von Molekülinterferenzen im Varian 820-MS

### Interferenzbeseitigung mit dem Kollisions-Reaktions-Interface (CRI)

Zur Untersuchung der Interferenzbeseitigung mittels CRI wurde eine Matrix mit 100 bzw. 500 mg/l Ca hergestellt. Dabei können Molekülionen aus Calcium und Sauerstoff und Wasserstoff gebildet werden, welche die Analyse von Cobalt und Nickel beeinflussen.

Tab. 2: Interferenzbeseitigung am Beispiel von Cobalt und Nickel

	ohne CRI		mit Helium	
	<sup>59</sup> Co µg/L	<sup>60</sup> Ni µg/L	<sup>59</sup> Co µg/L	<sup>60</sup> Ni µg/L
Ca 100mg/l	0.08	1.47	0.003	0.009
Ca 500mg/l	0.41	7.53	0.002	0.010
Ca 100mg/l, 1µg/l Co, Ni	1.08	2.43	0.995	0.994

$^{43}\text{Ca} + ^{16}\text{O} \rightarrow ^{59}\text{Co}$ ;  $^{44}\text{Ca} + ^{16}\text{O} \rightarrow ^{60}\text{Ni}$ ;  $^{42}\text{Ca} + ^{16}\text{O} + ^1\text{H} \rightarrow ^{59}\text{Co}$ ;  $^{43}\text{Ca} + ^{16}\text{O} + ^1\text{H} \rightarrow ^{60}\text{Ni}$

Tabelle 2 zeigt den Einfluss der Calciummatrix auf die Analyse von Cobalt und Nickel. Enthält die Probe 100 mg/l Ca, so werden durch gebildete Molekülionen 0,08 µg/l auf Masse 59 (Co) und

1,47 µg/l auf Masse 60 (Ni) gemessen, tatsächlich handelt es sich hierbei aber um Moleküle aus Ca, O und H mit der gleichen Masse wie Co bzw. Ni. Bei 500mg/l Ca werden entsprechend 0,4 µg/l (m/z 59) und 7,53 µg/l (m/z 60) detektiert.

Die Addition von 1µg/l Co und Ni auf 100mg/l Ca ergibt erwartungsgemäß eine zu hoch wiedergefundene Konzentration. Beide Resultate addieren sich zu der jeweiligen Interferenz.

Mit Hilfe des Kollisions-Reaktions-Interface können unter Einsatz von Helium die Molekülonen beseitigt werden und in beiden Lösungen werden weder Co noch Ni gefunden. Dann wird auch der tatsächlich addierte Wert von 1µg/l richtig wiedergefunden.

### Analyse zertifizierter Referenzmaterialien

Tabellen 3 – 6 geben die Ergebnisse der Analyse verschiedener Referenzmaterialien von zwei unterschiedlichen Herstellern wieder. Alle zertifizierten Materialien wurden mit dem angegebenen Volumen Reinstwasser (18MΩ/cm) aufgefüllt und nach vorsichtigem Schütteln der Probe 1/10 mit 0,5% HNO<sub>3</sub> und 0,005% TritonX-100 verdünnt. Als interne Standards wurden die Elemente Sc (m/z 45), Y (m/z 89), Rh (m/z 103), Tb (m/z 159), und Lu (m/z 175) ausgewählt und in einer Konzentration von 20 µg/l in 1% HNO<sub>3</sub> vorbereitet. Diese wurden über ein Y-Stück der Probe unmittelbar vor dem Zerstäuber zugeführt. Daraus resultierte eine weitere Verdünnung der Probe im Verhältnis 1 zu 2.

Tabelle 3 zeigt die Resultate für das Referenzmaterial Urin der Firma Recipe®. Nach Auffüllen des Gefäßes mit 10 ml Reinstwasser und verdünnen der Probe wurden Ergebnisse für die gemessenen Elemente im zertifizierten Bereich gefunden.

Tab. 3: Ergebnisse der Analyse ClinChek® Kontrollurin Level 1 und 2 (Ch.-B.: 314)

Element	Urin Level 1		Urin Level 2	
	gemessen	zertifiziert	gemessen	zertifiziert
Be µg/l	0,034	0,013 - 0,043	0,14	0,08 - 0,18
V µg/l	21,7	14 - 24	50,8	37 - 59
Cr µg/l	11,2	8,2 - 11,8	34,4	29 - 39
Mn µg/l	4,4	4,2 - 7	14,2	12 - 20
Fe µg/l	41,1	29 - 49	290	225 - 375
Co µg/l	5,5	4,1 - 6,9	34,5	29 - 41
Ni µg/l	9,4	7,4 - 12,6	47	38 - 56
Cu µg/l	56	46 - 66	112	95 - 131
Zn µg/l	205	160 - 260	546	510 - 670
Tl µg/l	3,8	2,6 - 4,4	18	15 - 23
Pb µg/l	22	21 - 33	55	48 - 72

Das Referenzmaterial Kontrollplasma von Recipe® wurde mit 3 ml Reinstwasser aufgefüllt und anschließend mit der Verdünnungslösung 1/10 verdünnt. Die gefundenen Konzentrationen in den Referenzproben (Tabelle 4) stimmen mit den zertifizierten Bereichen sehr gut überein.

Tab. 4: Ergebnisse der Analyse ClinChek®-Kontrollplasma Level 1 und 2 (Ch.-B.: 417)

Element	Plasma Level 1		Plasma Level 2		
	gemessen	zertifiziert	gemessen	zertifiziert	
Cd	µg/l	2,2	2,0 – 3,4	9,8	9 - 15
Cr	µg/l	3,5	2,6 – 4,2	14	11 - 16
Co	µg/l	5	4,1 – 6,7	16,6	14 - 22
Cu	µg/l	850	634 – 1056	1290	1050 - 1750
Fe	µg/l	756	563 - 937	964	859 – 1431
Li	mg/l	2,4	1,9 – 3,1	5,2	3,9 – 6,5
Mg	mg/l	26	23 - 37	30	32 – 37
Mn	µg/l	4,9	3,8 – 6,2	14,6	11 - 17
Mo	µg/l	1,1	0,7 – 1,2	6,6	4,5 - 7,5
Ni	µg/l	7,4	5,9 – 9,7	18	16 - 26
Tl	µg/l	0,03	<1	2,5	2,1 – 3,5
Zn	µg/l	1113	823 - 1371	1338	1133 - 1887

Das Referenzmaterial Trace Elements Serum von Seronorm™ wurde mit 3 ml Reinstwasser aufgefüllt und nachfolgend 1/10 verdünnt. Sowohl die Konzentrationen in mg/l, als auch die Konzentrationen in µg/l liegen in den zertifizierten Bereichen.

Tab 5.: Ergebnisse Analyse Seronorm™ Trace Elements Serum Level 1 und 2

Element	Seronorm Level 1 MI0181		Seronorm Level 2 NO0371		
	gemessen	zertifiziert	gemessen	zertifiziert	
Li	mg/l	5,4	5 – 5,7	10,0	9,7 – 10,5
Mg	mg/l	20,1	18,7 - 21	28,8	27,3 – 30,5
Ca	mg/l	103	97 - 109	123	108 – 126
K	mg/l	149	137 - 163	233	219 - 253
Mn	µg/L	8,6	8,0 – 13,3	14,8	12,9 – 15,1
Fe	mg/l	1,18	1,15 – 1,35	1,89	1,72 – 2,18
Co	µg/L	0,91	0,85 – 1,07	3,12	2,9 – 3,4
Ni	µg/L	5,2	4,8 – 6,1	9,61	9,3 – 12,1
Cu	mg/l	1,13	1,09 – 1,27	2,5	2,4 – 2,8
Zn	mg/l	1,25	1,23 – 1,43	0,99	0,85 – 0,98

Das Vollblut Referenzmaterial Trace Elements Whole Blood (Seronorm™) wurde nach auffüllen mit 5 ml Reinstwasser ebenfalls 1/10 verdünnt. Die analysierten Elemente konnten in den jeweils zertifizierten Bereichen wiedergefunden werden.

Tab 6: Ergebnisse der Messung Seronorm™ Trace Elements Whole Blood Level 1 und 2

Element	Seronorm Level 1 LOT 404107		Seronorm Level 2 LOT MR9067		
	gemessen	zertifiziert	gemessen	zertifiziert	
Cd	µg/l	0,72	0,67 -0,76	5,77	5,4 – 7,2
Co	µg/l	0,13	<1	5,3	5,2
Cr	µg/l	1,3	1,2	7,2	7,1
Mn	µg/l	9,5	9	13,9	12,8 – 15,1
Ni	µg/l	1,6	2	5,2	5
Pb	µg/l	33	31 – 39	364	353 - 443

Die Analyse der verschiedenen Referenzmaterialien hat gezeigt, dass die ICP-MS als Multielementmethode sehr gut geeignet ist, unterschiedliche Matrices schnell und robust auf zahlreiche Elemente zu analysieren.

### Platin

Seit Einführung der Katalysatoren in Kraftfahrzeugen nimmt die Freisetzung von Platin in die Umwelt ständig zu. Eine weitere Quelle sind Zahnfüllungen, die aus platinhaltigen Legierungen hergestellt sind.

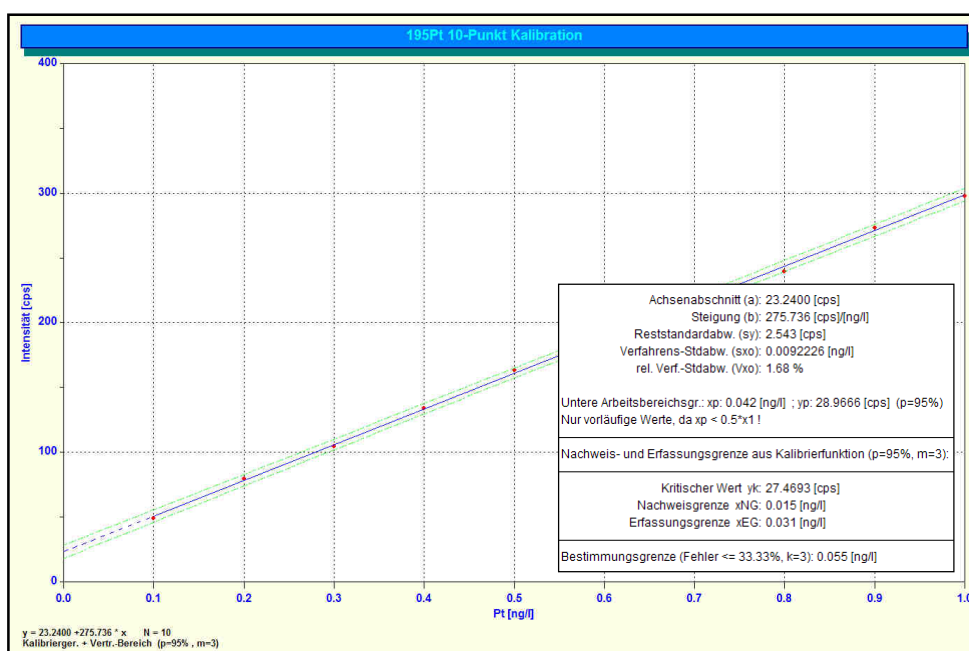


Abb. 3: 10 Punkt Kalibrierung <sup>195</sup>Pt (0,1 – 1ng/l)

Als Zytostatika zur Krebsbehandlung werden oft Medikamente mit Platinkomplexen eingesetzt. Die häufigst verwendeten Verbindungen sind Carboplatin, Cisplatin und Oxaliplatin. Die Wirkung dieser Medikamente beruht auf einer Vernetzung der DNA Struktur in den Zellen und dem letztendlichen Zelltod. Zur Untersuchung der Pharmakokinetik dieser Medikamente benötigt man ein Analysensystem mit einer hohen Empfindlichkeit, um auch Untersuchungen über die Langzeitretention dieser Medikamente vornehmen zu können. Die verwendete Analysenmethode muss darüber hinaus den zuverlässigen Nachweis im Bereich der natürlichen Platin Hintergrundkonzentration ermöglichen [4].

Abbildung 3 zeigt die eine 10-Punkt Kalibration von 0,1 bis 1 ng/l für Platin und die daraus bestimmte Nachweis-, bzw. Erfassungsgrenze. Diese betragen 0,015 ng/l (Nachweisgrenze) und 0,031 ng/l (Erfassungsgrenze). Für die Analyse von Platin in Urinproben sollten diese vorab mindestens 1/10 verdünnt werden, wodurch sich die Nachweis- und Erfassungsgrenze ebenfalls um Faktor 10 erhöhen und somit zu 0,15 ng/l bzw. 0,31 ng/l berechnet werden.

Tab. 7: Platinkonzentration in Urinproben

	<sup>194</sup> Pt	<sup>195</sup> Pt
Probe 1 [ng/l]	1,96	1,99
Probe 2 [ng/l]	0,71	0,68

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Platinanalyse zweier Urinproben. Die Proben wurden 1/10 mit 0,5% HNO<sub>3</sub> und 0,005% TritonX-100 verdünnt gemessen. Die ermittelten Konzentrationen stellen Hintergrundkonzentrationen dar, da weder Zahnfüllungen aus Platinlegierungen vorhanden waren, noch platinhaltige Medikamente eingenommen wurden.

**Fazit**

Das stetig wachsende Verständnis über die Bedeutung der Spurenelemente in Organismen erfordert eine schnelle Mutlielementanalytik. Daher gewinnt die ICP-MS in diesem Bereich stetig an Bedeutung. Durch die Möglichkeit der Interferenzabtrennung können Urin, Serum, Plasma und Vollblut mit dieser Methode untersucht werden. Die ICP-MS kann dabei sowohl höhere Konzentrationen der Hauptelemente (mg/l), als auch von Spurenelementen in µg/l gleichzeitig messen. Die hohe Empfindlichkeit der Methode ermöglicht weiterhin Langzeitstudien zur Retention von Medikamenten oder auch zur Exposition mit bestimmten Elementen.

[1] Dtsch Arztebl 2002, 99: A3026-3029 [Heft 45]  
 [2] Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2005, 48, 246-250  
 [3] GIT Laborfachzeitschrift 05/2005, 521-523  
 [4] Umweltmed Forsch Prax 9 (1) 2004