

# Qualitative und Quantitative Bestimmung von Homocystein und Methylmalonsäure in DBS mittels LC-MS/MS

**Patrick Bannwarth**

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Analytik

Auftraggeber: Professor Dr. Götz Schlotterbeck  
Experte: Dr. Markus Ehrat

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine effektive LC-Methode entwickelt, mit der die Analyten erfolgreich getrennt werden konnten. Des Weiteren führte die Optimierung der MS-Parameter zu einer hohen Sensitivität. So betrug die Nachweisgrenze für Homocystein 10 pg, für Methylmalonsäure 20 pg und für para-Aminobenzensäure ebenfalls 10 pg on system. Ebenfalls wurde eine leicht durchführbare Extraktions- und Aufarbeitungsmethode entwickelt. Weiter konnte bewiesen werden, dass eine starke Suppression durch die Matrix auf die Analyten wirkt und diese Beeinflussung erfolgreich reduziert und kompensiert werden. Gleichzeitig führten Überprüfungen, zur weiteren Optimierung der quantitativen Analyse und zur weiteren Reduktion der Matrixsuppression, zu erfolgsversprechenden Massnahmen, um die Präzision und Wiederholbarkeit dieser Methode in zukünftigen Arbeiten noch zu steigern. Schlussendlich konnten zufällig ausgewählte Proben der ZHAW analysiert und quantifiziert werden.

Durch die Suppression der Matrix unterliegen die Messwerte, je nach Analyt und Retention, einer mehr oder weniger starken Streuung. Dies hat zur Folge, dass die ermittelten Konzentrationen von Homocystein in einem Bereich von  $\pm 20\%$  und die Konzentrationen von Methylmalonsäure in einem Bereich von bis zu  $\pm 30\%$  schwanken.

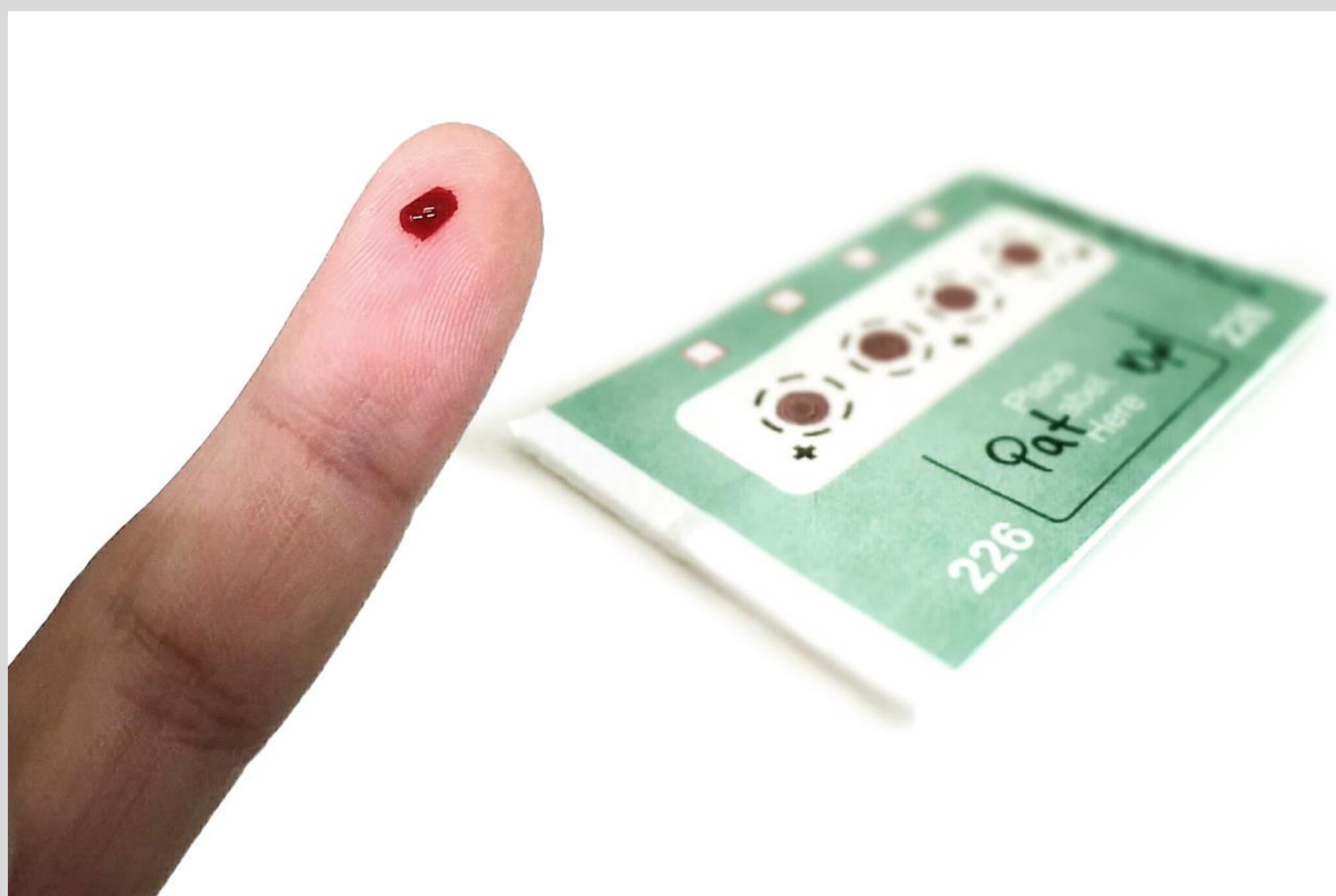


Abb. 1: Probenahme und DBS-Karte

## EINLEITUNG

Im Rahmen einer Schweiz-weiten Erhebung der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) werden belastbare Daten über die Nahrungs- und der damit verbundenen Nährstoffaufnahme der schweizerischen Bevölkerung ermittelt. Zusammenfassend soll die Studie Informationen darüber liefern, wie intra- und interindividuelle Veränderungen des Ernährungs- und Gesundheitsstatus, wie auch des subjektiven Wohlbefindens Einfluss auf das Altern nehmen.

Um jahreszeitliche Schwankungen im Ernährungsverhalten darstellen zu können, erfolgen die Befragungen der Probanden zweimal im Jahr. Bei diesen Befragungen werden physiologische Daten aufgenommen, sowie Vitalitätstests durchgeführt. Quantitative Aussagen über die aufgenommene Nahrung basieren auf den Notizen und Erinnerungen der Probanden. Jedoch könnte mit einer Nährstoffanalyse des Blutes eine genauere Betrachtung ermöglicht werden.

Um für Patienten und Probanden die Probenahme des Blutes einfach und möglichst schmerzfrei zu gestalten wird die Analyse auf Trockenblut ausgelegt, bei der lediglich eine kleine Menge Blut auf eine Filterkarte aufgetragen wird. Die Dried Blood Spot (DBS) Probenahme eröffnet einige Vorteile gegenüber den gewöhnlichen Probenahmen aus Vollblut, Plasma oder Serum. So ist der Stich in den Finger weniger invasiv, die Lagerung kann meistens bei Raumtemperatur erfolgen, die Probenahme kann vom Patienten oder Probanden selbst durchgeführt werden, das Infektionsrisiko wird stark reduziert und es sind sehr kleine Probenvolumina nötig ( $< 100 \mu\text{l}$ ).

Das Ziel dieser Bachelor Thesis war nun die Quantifizierung des Gehalts an

Vitamin B12 in Trockenblut. Die Bestimmung erfolgte allerdings indirekt über sogenannte Surrogat-Marker, die in ihrer Menge abhängig von der Menge Vitamin B12 sind und somit Rückschlüsse auf den Gehalt zulassen.



Abb 2: Ausgestanzter Spot von 3mm Durchmesser (Vol.: ~3µl)

## RESULTATE

Es wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt, mit der sich die Surrogat-Marker für Vitamin B12 und Folsäure quantitativ nachweisen lassen. Ebenfalls sorgte eine entsprechende Aufarbeitungsmethode für den quantitativen Nachweis von Homocystein und Methylmalonsäure. Durch die Auswahl geeigneter Parameter konnten zusätzlich Suppressionen durch die Matrix erfolgreich reduziert und kompensiert werden.

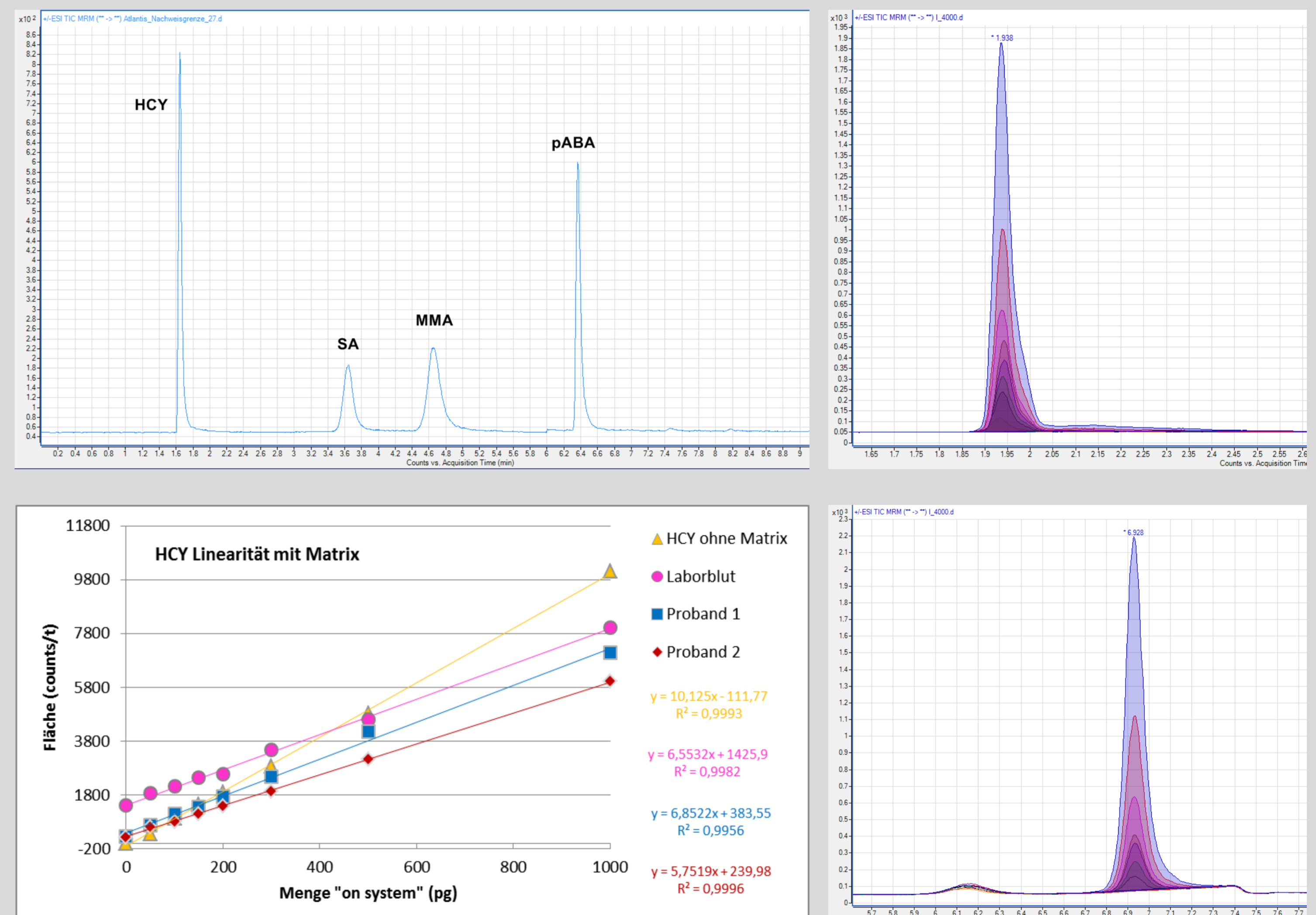


Abb. 3: MRM der Substanzen (o.l.); Linearität bei Koelution von Matrix bei verdünnter Injektion (u.l.); dotierte Proben HCY (o.r.) und MMA (u.r)

	Mittelwert HCY ( $\mu\text{mol/L}$ )	Streuung HCY (%)	Mittelwert MMA ( $\mu\text{mol/L}$ )	Streuung MMA (%)
9882/17	3,39	$\pm 4,7\%$	0,50	$\pm 28,8\%$
9946/81	3,65	$\pm 7,8\%$	0,46	$\pm 31,4\%$
9948/83	2,90	$\pm 9,3\%$	0,35	$\pm 30,1\%$
9916/51	3,43	$\pm 7,9\%$	0,43	$\pm 28,7\%$
9938/73	3,36	$\pm 21,5\%$	0,54	$\pm 29,3\%$
9950/85	3,16	$\pm 17,1\%$	0,64	$\pm 31,3\%$

Tabelle 1: Gehalt und Streuung gemessener ZHAW-Proben

## SCHLUSSFOLGERUNG

Die grosse Streuung der ZHAW-Proben kommt durch die Kalibrierung mit fremden Matrices zustande. Je nach verwendetem Blut wirkt auf die Analyten eine unterschiedlich starke Suppression, die für verschiedene Steigungen der Kalibrierungen sorgt. Die Suppression stammt von Matrixkomponenten, die mit den Analyten koeluiieren. Besonders zu Beginn der Trennung, wo auch Homocystein retendiert.

Durch den Einsatz von internen Standards und einer Optimierung des Extraktionsverfahrens konnte erfolgreich eine Reduktion dieser Suppression erreicht werden. Jedoch bedarf es weiterer Arbeit um eine genauere Quantifizierung der Analyten zu erreichen.