

Massenspektrometrische Identifizierung synthetischer Insuline

Mario Thevis und Wilhelm Schänzer

1 Einleitung

Der Nachweis synthetischer Insuline, zu denen u.a. sogenannte *rapid-* und *long-acting* Insuline wie Humalog[®] (Lispro) und Novolog[®] (Aspart) bzw. Lantus[®] (Glargine) gehören, zählt zu den Aufgaben der heutigen Dopinganalytik. Der Missbrauch von Insulin im Sport ist bereits mehrfach dokumentiert worden, im Besonderen im Bereich Body Building (Dawson & Harrison 1998, Evans & Lynch 2003, Rich, et al. 1998), jedoch konnte die Frage ob Insulin eine leistungsteigernde Substanz ist bisher nicht eindeutig geklärt werden (Sonksen 2001). Neben rekombinantem humanen Insulin werden seit einigen Jahren in der Medizin auch synthetische Insuline eingesetzt, deren Vorteil in einer schnelleren bzw. längeren Wirksamkeit liegen. Diese wird durch Modifikation der Primärstruktur erreicht wie in Abbildung 1 graphisch dargestellt ist. Humanes Insulin tendiert zur Bildung nicht-kovalenter Hexamere in den β -Zellen des Pankreas (Abbildung 2), welche durch Sezernieren in die Blutbahn dissoziieren und aktive Monomere freisetzen. Injektionspräparate mit rekombinantem humanen Insulin beinhalten ebenfalls solche hexameren Komplexe und benötigen nach *s.c.* Applikation zwischen 45 und 120 Minuten, um aktive Insulinmonomere bereitzustellen (s. Abbildung 3). Dieser Zeitraum, die sogenannte *lag-phase*, wird durch Reduktion der Selbstaggregation deutlich verringert, wofür im wesentlichen die Aminosäuresequenz der C-terminalen Region der B-Kette des verantwortlich ist. Bei Humalog[®] wurden daher die Aminosäuren B₂₈ und B₂₉ vertauscht, wodurch eine erhöhte Repulsion zwischen den Insulinmonomeren erzeugt wird, welche die Komplexbildung behindert und somit eine schnellere Verfügbarkeit ermöglicht. Der gleiche Effekt wurde bei Novolog[®] durch Austausch des Prolins an B₂₈ durch Asparaginsäure erzielt. Im Gegensatz dazu wurde die Wirksamkeit des Insulinpräparats Lantus[®] durch Erhöhung des isoelektrischen Punkts (pI) durch Addition zweier Arginine an den C-Terminus der B-Kette verlängert, um ein lang-wirksames Insulin zu erhalten.

Mit Hilfe verschiedener Immunoassays wie z.B. RIA (*radioimmuno assay*), ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) oder MEIA (*microparticle enzyme immuno assay*) werden seit der ersten Entwicklung durch Yalow und Berson (Yalow & Berson 1959) im Jahre 1959 Identifizierungen und Quantifizierungen von Insulinen durchgeführt. Auch massenspektrometrische Nachweise wurden für menschliches und tierische Insuline entwickelt, die als Basis für die Identifizierung synthetischer Analoge herangezogen wurden (Darby, et al. 2001, Stöcklin, et al. 1997).

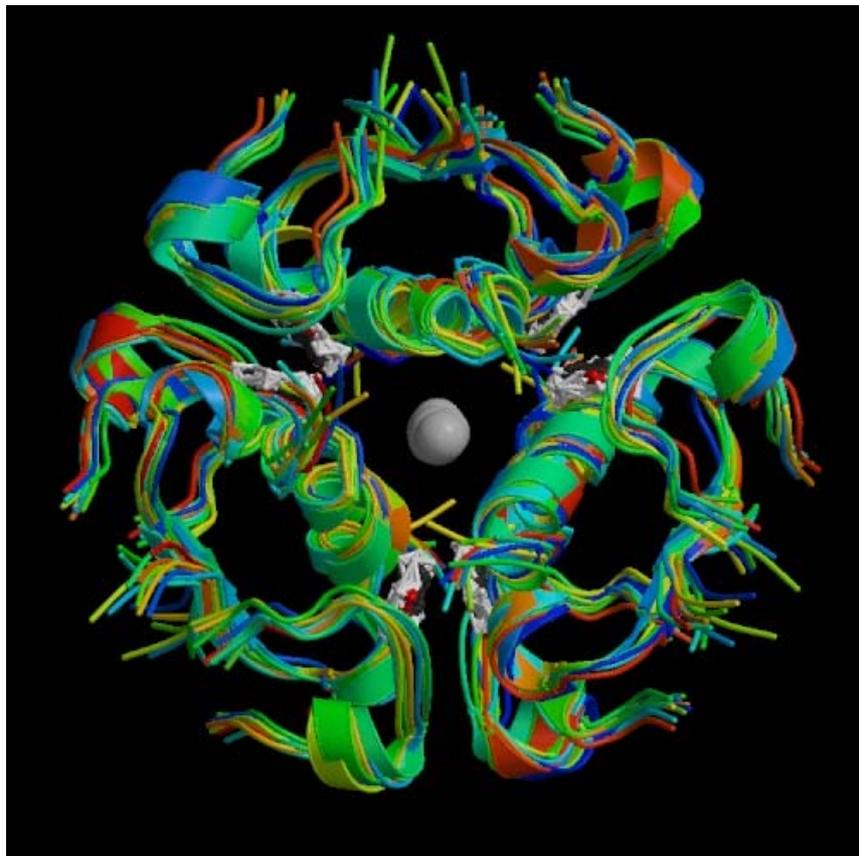


Abb. 2: Struktur des hexameren Insulin-Komplexes mit zentralem Zink-Ion. Im Besonderen sind die Aminosäuren 8, 9, 12, 16, 21, 23-29 der B-Kette in die Selbstaggregation involviert.

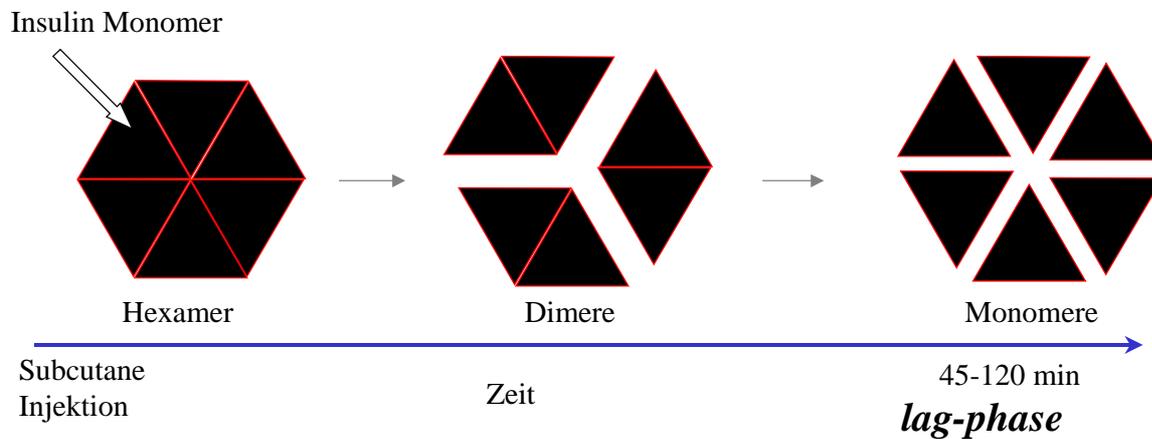


Abb. 3: Schematische Darstellung der Dissoziation des Insulin-Hexamers in dimere und monomere Unterheiten. Hauptsächlicher Grund für den Zerfall des Komplexes ist ein Verdünnungseffekt durch Eintritt des Insulins in den Blutkreislauf.

2 Massenspektrometrische Analytik

Um synthetische Insuline eindeutig zu identifizieren eignet sich insbesondere die Massenspektrometrie. Mit Hilfe moderner Ionisations- und Fragmentierungstechniken wie Elektrospray-Verfahren (ESI) und kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) können Molekulargewichte exakt bestimmt und Teile der Aminosäuresequenzen determiniert werden.

Peptide und Proteine wie Insulin generieren im Allgemeinen mehrfach geladene Moleküle, wenn sie mittels ESI ionisiert und in ein Massenspektrometer transferiert werden. In Abbildung 4 ist ein *full-scan* Massenspektrum des humanen Insulins dargestellt, welches die fünf-, sechs- und siebenfach protonierten Moleküle bei m/z 1162.4, 968.9 und 830.6 beinhaltet. Je nach Geräteparameter der Ionenquelle, Flussrate des Elektrosprays und der anliegenden Potentiale des Massenspektrometers herrschen

verschiedene Ladungszustände der Analyten bevorzugt vor; hier dominiert das $(M+6H)^{6+}$ des Insulins.

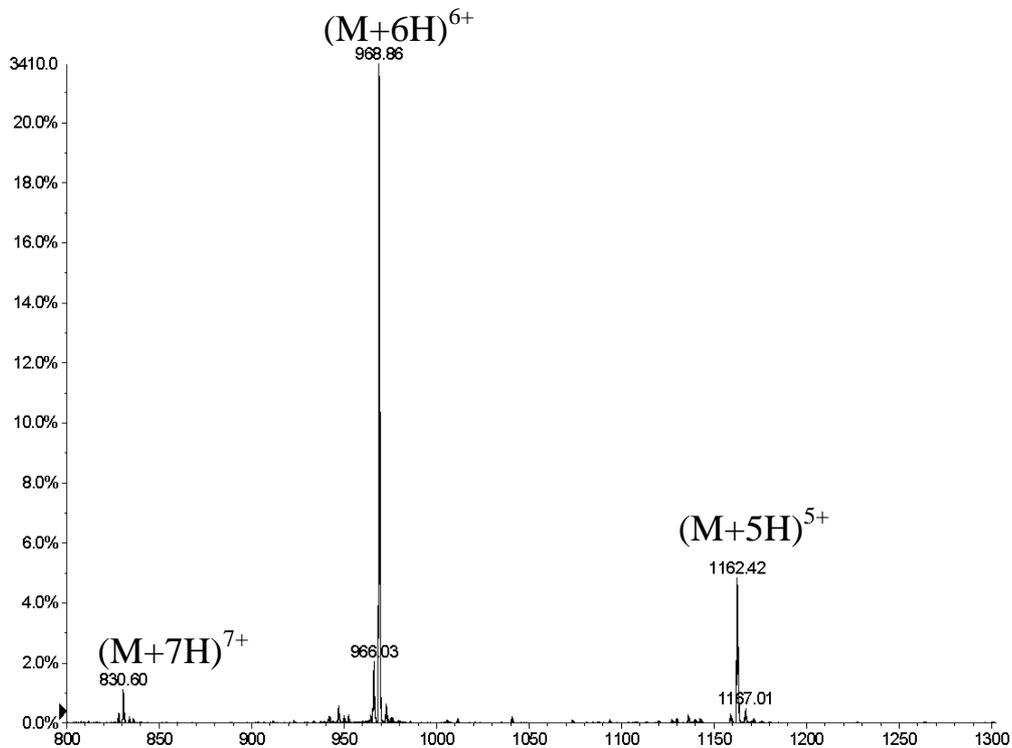


Abb. 4: *Full-scan* Massenspektrum des humanen Insulins ($M_w = 5808$ u) mit Signalen des fünf-, sechs- und siebenfach protonierten Moleküls

Plasmaproben können auf verschiedene Arten zur massenspektrometrischen Analyse bezüglich synthetischer Insuline aufbereitet werden. Eine einfache Methode basiert auf dem Prinzip der Festphasenextraktion und ermöglicht die Messung der intakten Analyten mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie (LC) in Kombination mit einem Tandem-Massenspektrometer. Ein typisches Chromatogramm einer Probe mit spezifischen extrahierten Ionenspuren für Humalog[®], Novolog[®] und Lantus[®] ist in Abbildung 5 zu sehen. Hier wurden zu einem Milliliter Plasma je 10 pmol der jeweiligen synthetischen Insuline gegeben, mit Hilfe einer Festphasenextraktion aufgereinigt und analysiert.

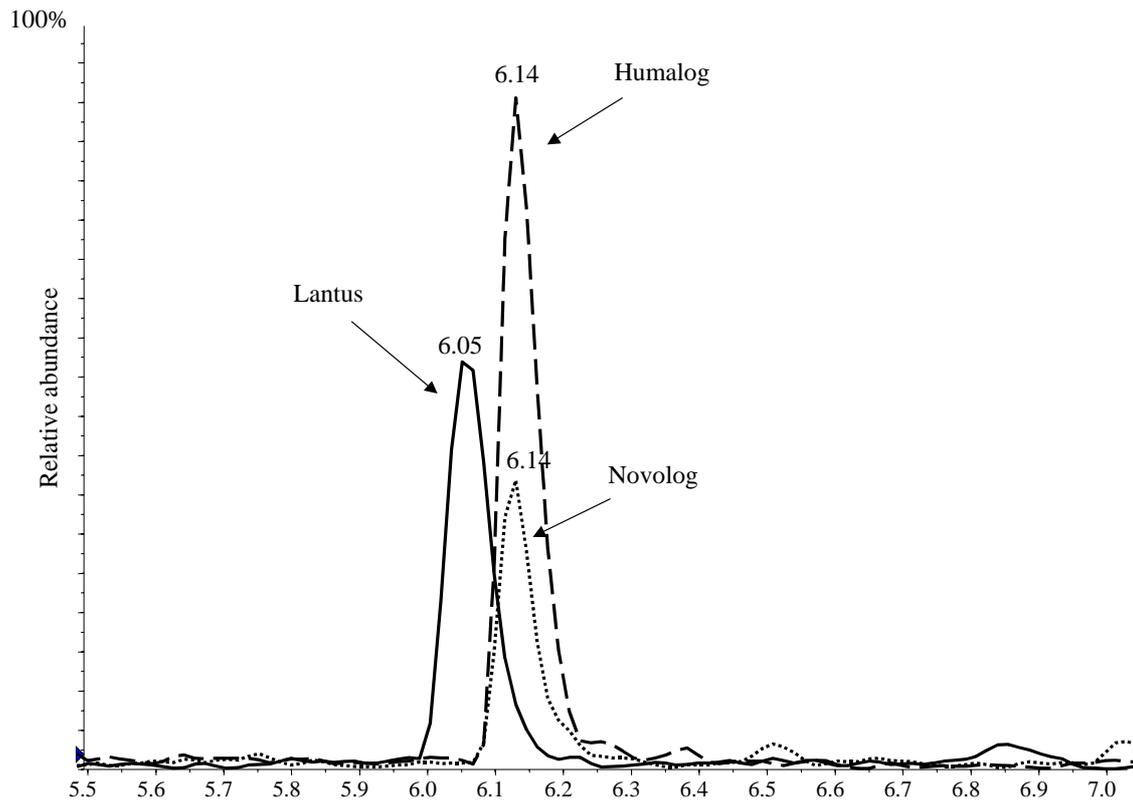


Abb. 5: Extrahiertes Ionenchromatogramm einer Plasmaprobe, welche mit je 10pmol/ml Humalog[®], Novolog[®] und Lantus[®] angereichert wurde. Die hier gemessenen mehrfachgeladenen Moleküle wurden bei m/z 1162, m/z 1166 bzw. m/z 1213 aufgezeichnet.

Die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) der mehrfach geladenen Moleküle des humanen Insulins erzeugt ein Produkt-Ionenspektrum wie beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt ist. Durch CID werden Strukturinformationen erhalten, die im Besonderen bei der Differenzierung zwischen endogenem Insulin und Humalog[®] wichtig sind, da der Unterschied dieser Verbindungen sich lediglich auf einen Positionstausch zweier benachbarter Aminosäuren beschränkt. Bei Novolog[®] und Lantus[®] dagegen sind auch die Molekulargewichte der Substanzen verschieden.

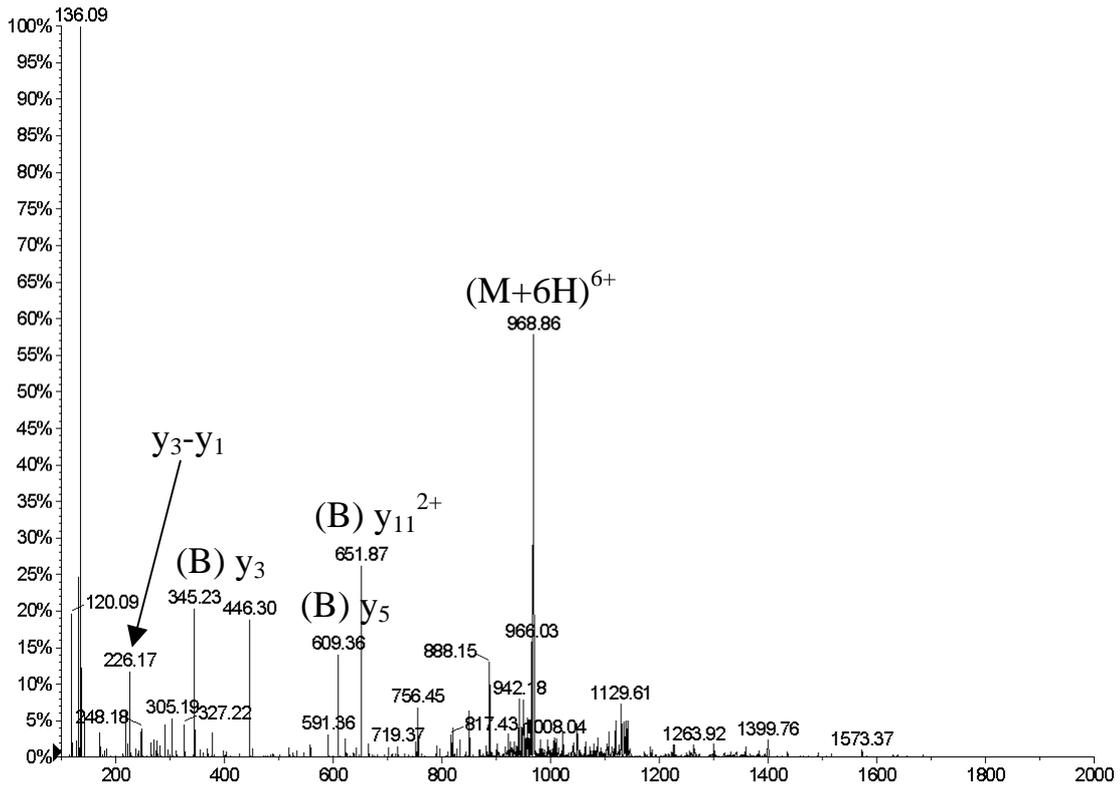


Abb. 6: ESI-Produkt-Ionenspektrum von m/z 968.9 des humanen Insulins. Das Fragment-Ion bei m/z 226 (y_3-y_1) repräsentiert die Prolin-Lysin Konstitution an $B_{28}-B_{29}$.

Das Fragment-Ion bei m/z 226 beinhaltet die Aminosäurereste Prolin-Lysin (y_3-y_1), welche vom C-Terminus der B-Kette resultieren. Eine Verstärkung der Intensität dieses human-Insulin-spezifischen Produkt-Ions kann durch Spaltung der A- und B-Kette durch Reduktion der Disulfidbrücken mit anschließender Messung eines Produkt-Ionenspektrums der mehrfach protonierten B-Kette erzielt werden. Die B-Kette des humanen Insulins hat ein Molekulargewicht von 3429 Da und das entsprechende vierfach geladene Ion wird bei m/z 858.4 erfasst. Abbildung 7 zeigt das zugehörige Produkt-Ionenspektrum mit einem Basispeak bei m/z 226.

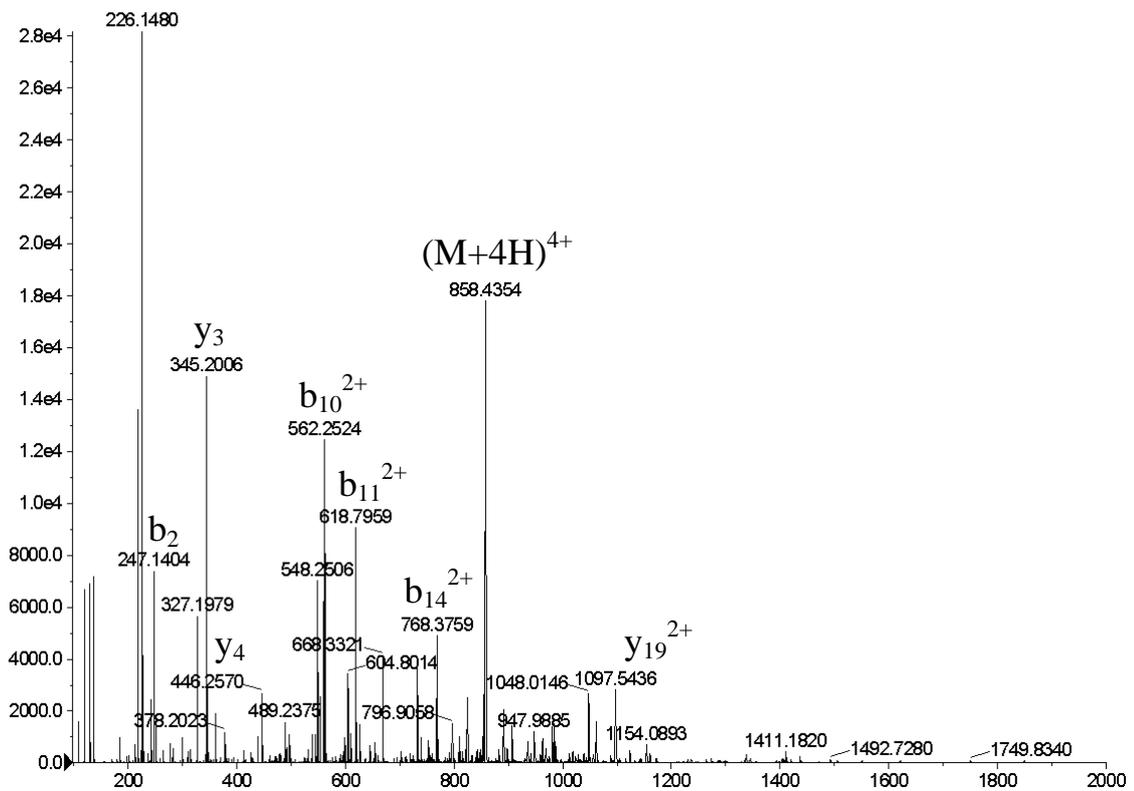


Abb. 7: ESI-Produkt-Ionenspektrum von m/z 858.4 des humanen Insulins. Das Fragment-Ion bei m/z 226 (y_3 - y_1), welches das endogene Insulin charakterisiert, ist das intensivste Signal dieser Aufnahme.

Wenn das gleiche Experiment mit Humalog[®] durchgeführt wird, enthält das korrespondierende Produkt-Ionenspektrum (Abb. 8) kein Fragment bei m/z 226 sondern bei m/z 217, welches als y_2 -Ion zu bezeichnen ist und aus Prolin-Threonin besteht. Dieses identifiziert den modifizierten C-Terminus des Insulins und unterscheidet maßgeblich das synthetische Humalog[®] von endogenem Insulin.

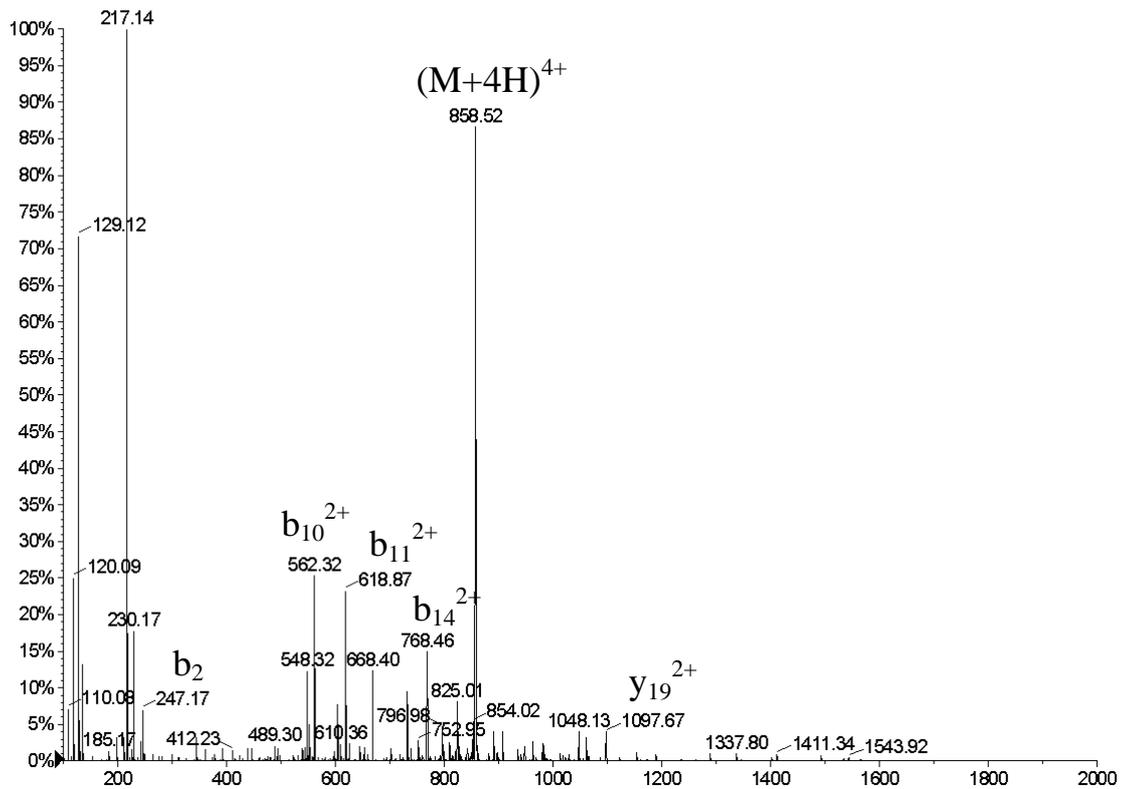


Abb. 8: ESI-Produkt-Ionenspektrum von m/z 858.4 des Humalogs[®]. Das Fragment-Ion bei m/z 226 (y_3-y_1) fehlt wogegen das entsprechende Gegenstück bei m/z 217, das y_2 -Ion, deutlich erkennbar ist.

Novolog[®] und Lantus[®] können nach dem gleichen Prinzip aufbereitet und analysiert werden, obwohl sich eine Differenzierung zwischen diesen synthetischen Insulinen und dem endogenen Pendant einfacher gestaltet, da unterschiedliche Molekulargewichte und, wenn auch nur geringfügig, unterschiedliche Primärstrukturen vorliegen. Die Abbildungen 9 und 10 beinhalten die jeweiligen Produkt-Ionenspektren der B-Ketten von Novolog[®] bzw. Lantus[®] nach ESI und CID.

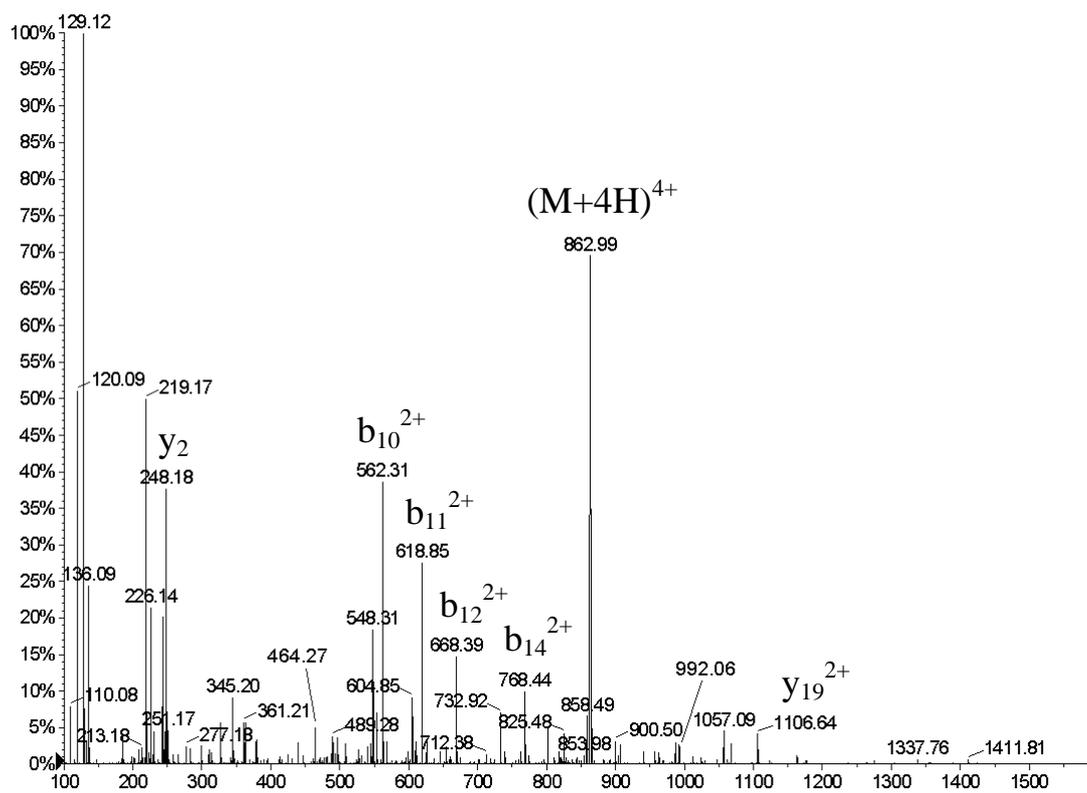


Abb. 9: ESI-Produkt-Ionenspektrum von m/z 863.0 der B-Kette des Novologs[®].

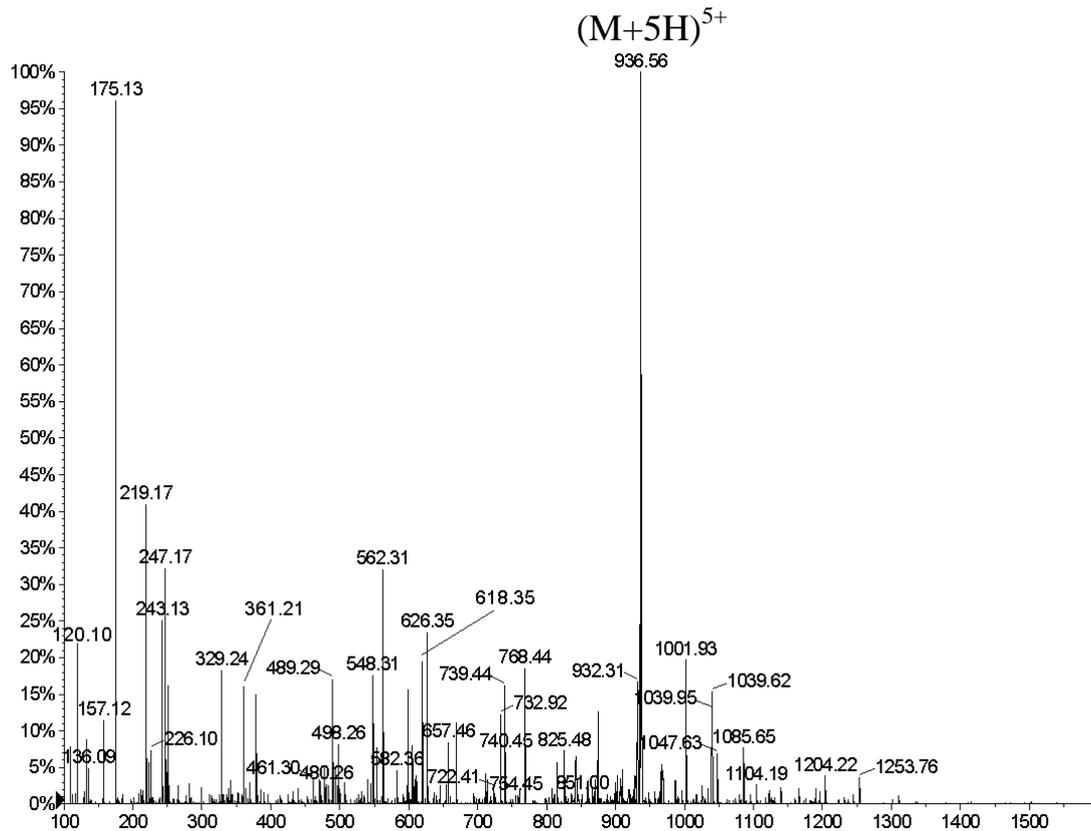


Abb. 10: ESI-Produkt-Ionenspektrum von m/z 936.6 der B-Kette des Lantus[®].

3 Schlussfolgerung

Die eindeutige Identifizierung synthetischer Insuline ist mittels Elektrospray Ionisation und anschließender kollisionsinduzierter Dissoziation durchführbar. Trotz sehr ähnlicher Strukturen der Analyten können geringfügige Unterschiede durch Betrachtung der Fragmentierungs-Schemata der B-Ketten hervorgehoben und zur Charakterisierung herangezogen werden.

4 Danksagung

Die Autoren möchten sich beim Bundesinstitut für Sportwissenschaft, Bonn, und der Manfred-Donike Gesellschaft, Köln, für die finanzielle Unterstützung bedanken.

5 Literaturverzeichnis

- Darby, S. M., Miller, M. L., Allen, R. O. & LeBeau, M. (2001). A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 8-14.
- Dawson, R. & Harrison, M. (1998). Use of insulin as an anabolic agent. *Br J Sports Med*, 31, 259.
- Evans, P. J. & Lynch, R. M. (2003). Insulin as a drug of abuse in body building. *Br J Sports Med*, 37, 356-357.
- Levien, T. L., Baker, D. E., White, J. R. & Campbell, R. K. (2002). Insulin glargine: A new basal insulin. *The Annals of Pharmacotherapy*, 36, 1019-1027.
- Rich, J. D., Dickinson, B. P., Merriman, N. A. & Thule, P. M. (1998). Insulin use by bodybuilders. *Jama*, 279, 1613.
- Sonksen, P. H. (2001). Hormones and sport (insulin, growth hormone and sport). *Journal of Endocrinology*, 170, 13-25.
- Stöcklin, R., Vu, L., Vadas, L., Cerini, F., Kippen, A. D., Offord, R. E. & Rose, K. (1997). A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes*, 46, 44-50.
- Yalow, R. S. & Berson, S. A. (1959). Radiobiology: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184, 1648-1649.