

Katharina Rentsch¹

Therapeutic Drug Monitoring mittels LC-MS

Die Flüssigchromatographie gekoppelt an die Massenspektrometrie ist heute die am häufigsten eingesetzte Analysenmethode zur Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen in der Schweiz. Die Vor- und Nachteile und das Haupteinsatzgebiet sind im Folgenden dargestellt.

Die quantitative Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mit dem Ziel der Therapieoptimierung (TDM) wird bereits seit mehr als 30 Jahren durchgeführt und stellt bei einigen Medikamentenklassen eine der Grundvoraussetzungen dar, dass die Therapie erfolgreich durchgeführt werden kann. Ganz am Anfang wurden diese Untersuchungen ausschliesslich mittels HPLC mit UV-Detektion beziehungsweise GC mit Flammen- oder NPD-Detektion durchgeführt. Mit der Entwicklung der automatisierten Immunoassays folgte dann der Schritt zur Automation für alle diejenigen Medikamente, bei denen eine hohe Zahl von Proben bestimmt werden musste. Als Mitte der 90er Jahre im letzten Jahrhundert die LC-MS-Technologie so weit fortgeschritten war, dass Benchtop-Geräte verfügbar waren, hat diese Technologie auch bei der Bestimmung von Medikamentenbestimmungen Einzug gehalten. Währenddem die GC schon seit längerer Zeit aus den Routinelaboratorien verschwunden ist, nimmt auch die Zahl der HPLC-UV-Geräte ständig ab, die für diese Bestimmungen eingesetzt werden.

Was sind die Vorteile der LC-MS für das Therapeutic Drug Monitoring?

Durch die Kopplung der Massenspektrometrie an die HPLC kann im Vergleich zur UV-Detektion eine bessere Sensitivität und Spezifität bei der Detektion der einzelnen Substanzen erreicht werden. Da die Ionisierungsmethoden bei der LC-MS aber im Allgemeinen sehr «weich» sind und nur

wenige Fragmente erzeugen, muss ein zweiter Fragmentierungsschritt in der Kollisionszelle eines Triple-stage-Quadrupol-Instrumentes (MS/MS) für die Quantifizierung herangezogen werden. Diese zusätzliche Fragmentierung wird als Übergang bezeichnet und folgendermassen dargestellt: $m/z\ XX \rightarrow m/z\ YY$. Da es leider auch unter den Medikamenten isobare Verbindungen gibt, sollten wenn immer möglich neben dem einen Übergang für die Quantifizierung zwei zusätzliche Übergänge für die Identifizierung der Substanz eingesetzt werden. In Abbildung 1 ist als Beispiel das Chromatogramm der Bestimmung von Lamotrigin dargestellt, in dem drei Übergänge dargestellt sind.

Die LC-MS weist auch eine deutlich höhere Spezifität auf als die im Routinebetrieb eingesetzten Immunoassays. Diese können oft nur schwer zwischen Muttersubstanz und Metabolit unterscheiden, was für die LC-MS kein Problem darstellt.

Ein zweiter wichtiger Vorteil der LC-MS im Vergleich zur HPLC mit UV-Detektion ist die Verwendung von deuterierten internen Standards. Plasma- oder Serumproben können aufgrund des hohen Proteingehaltes nicht direkt in die HPLC injiziert werden und benötigen immer mindestens einen Probenvorbereitungsschritt. Jeder Arbeitsschritt bei der Probenvorbereitung und der Analyse einer Probe ist mit einem Fehler behaftet. Diese addieren sich und finden sich schlussendlich in der Impräzision eines einzelnen Resultates. Es ist deshalb seit längerer Zeit state-of-the-art, dass bei allen chromatographischen Methoden interne Standards zugegeben werden, die alle Fehler des Analyten mitmachen. Für die

Berechnung des Resultates wird nicht die absolute Peakfläche des Analyten in der einzelnen Probe eingesetzt, sondern das Verhältnis der Peakflächen von Analyt zu internem Standard. Je ähnlicher das physiko-chemische Verhalten von Analyt und internem Standard sind, umso mehr Fehler können kompensiert werden. Deshalb stellen deuterierte Verbindungen im Allgemeinen ideale interne Standards dar, da sie sich nur im Molekulargewicht vom Analyten unterscheiden.

Ein dritter wichtiger Vorteil der LC-MS im Vergleich zur HPLC mit UV-Detektion ist die Dauer der einzelnen Analyse. Aufgrund der hohen Spezifität der Methode können die Analysenzeiten sehr stark verkürzt werden und eine Bestimmung von mehreren Medikamenten in einem Analysenlauf ist meist sehr gut möglich. Dies ist in Abbildung 2 am Beispiel der Neuroleptika gezeigt. In dieser Methode werden 5 Medikamente und 2 Metabolite in einem Analysenlauf bestimmt.

Was sind die Nachteile der LC-MS für das Therapeutic Drug Monitoring?

Obwohl die Bedienung und Wartung der LC-MS-Geräte immer einfacher werden, braucht es doch immer noch ein spezielles Know-how, um die Geräte in der Routine einsetzen zu können. Einige kommerzielle Anbieter bieten in der Zwischenzeit auch Kits für die LC-MS-Analytik an, allerdings unterscheiden sich LC-MS-Geräte verschiedener Hersteller viel stärker voneinander als HPLC-UV-Geräte, so dass auch bei diesen Kits Anpassungen ans eigene Gerät vorgenommen werden müssen. Wenn man die volle Flexibilität der Technologie ausnutzen möchte

¹ Prof. Dr. sc.nat. Katharina Rentsch, Leiterin Labormedizin, Universitätsspital Basel

kommt man nicht darum herum, die Methoden selbst zu entwickeln und die Parameter zu kombinieren, die im eigenen Labor gehäuft auftreten. Dies erfordert gute Kenntnisse der LC-MS-Technologie.

Bei der Beschaffung eines LC-MS-Gerätes stösst man vor allem in öffentlichen Laboratorien immer häufiger auf grosse Schwierigkeiten. Die Geräte sind immer noch sehr teuer in der Anschaffung, und auch die Wartungsverträge sind teuer. Die Betriebskosten hingegen sind günstiger als bei der HPLC-UV, da die kürzeren Analysenzeiten zu einem tieferen Verbrauch von Lösungsmitteln führen. Durch die höheren Abrechnungskosten in der Eidg. Analysenliste werden die Gesamtkosten aber mit einem genügend hohen Probenvolumen kostendeckend durch die Auftraggeber abgedeckt.

Für welche Medikamente wird die LC-MS heute eingesetzt?

Prinzipiell könnten alle Medikamente mittels LC-MS quantifiziert werden. Die Technik bietet sich vor allem für die Medikamentenklassen an, bei denen eine ganze Reihe chemisch ähnlicher Verbindungen quantifiziert werden müssen, so z.B. für die Antidepressiva, Neuroleptika und Antiepileptika. Durch die Kombination von 5 bis 10 Arzneimitteln in einer analytischen Methode können die Quantifi-

zierungen für alle Medikamente häufig täglich angeboten werden. Für die Bestimmung der Antiinfektiva (mit Ausnahme der Aminoglykosid- und Glykopeptid-Antibiotika), der Zytostatika (mit Ausnahme von Methotrexat) und der Sedativa stellt die LC-MS die Methode der Wahl dar.

Für die Quantifizierung der Immunsuppressiva werden heute immer noch meist Immunoassays eingesetzt, obwohl sämtliche Tests den Nachteil haben, dass Metaboliten teilweise mitbestimmt werden. Als mögliche Gründe dafür können einerseits die Komplexität der Vollblutmatrix mit höheren Anforderungen an die Probenvorbereitung und andererseits die rasche Verfügbarkeit der Resultate aufgeführt werden. Während ein Immunoassay-Gerät in einem sehr kurzen Zeitintervall ein Resultat nach dem anderen produzieren kann, braucht die LC-MS doch auch bei sehr kurzen analytischen Laufzeiten ein paar Minuten. Dies führt dazu, dass in den grossen Transplantationszentren eine sehr gute Absprache zwischen den Kliniken und dem Labor stattfinden muss, damit nicht nur eine optimale Qualität der Analysenresultate, sondern auch eine optimale Patientenversorgung sichergestellt ist.

Korrespondenz:
Katharina.Rentsch@usb.ch

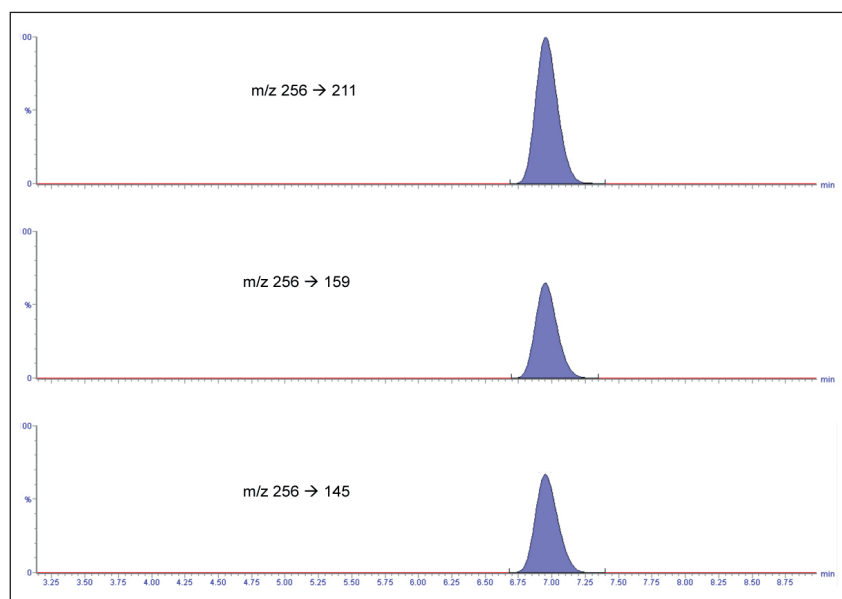


Abbildung 1: Chromatogramm eines Lamotrigin-Standards mit den drei verwendeten Übergängen.

Suivi thérapeutique des médicaments réalisé au moyen de la LC-MS

Les avantages de la LC-MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) pour le suivi thérapeutique des médicaments (TDM) sont une meilleure sensibilité et une spécificité accrues durant la détection de substances particulières. Par ailleurs, l'emploi de standards internes deutérés, présentant des propriétés chimiques et physiques identiques, permet de corriger les erreurs de façon optimale durant toutes les étapes analytiques. La durée réduite de chaque analyse constitue le troisième avantage. Parmi les inconvénients de la LC-MS, il faut citer d'une part la nécessité de posséder un savoir-faire spécifique, surtout du point de vue méthodologique, et d'autre part les frais d'acquisition élevés. La LC-MS est aujourd'hui utilisée pour le dosage des antidépresseurs, des antiépileptiques et des neuroleptiques, mais elle constitue également la méthode de choix pour la détermination des anti-infectieux, des cytostatiques et des sédatifs. Bien que le suivi thérapeutique des médicaments immunosuppresseurs par LC-MS soit très intéressant d'un point de vue analytique, le traitement en série d'un grand nombre d'échantillons constitue un défi.

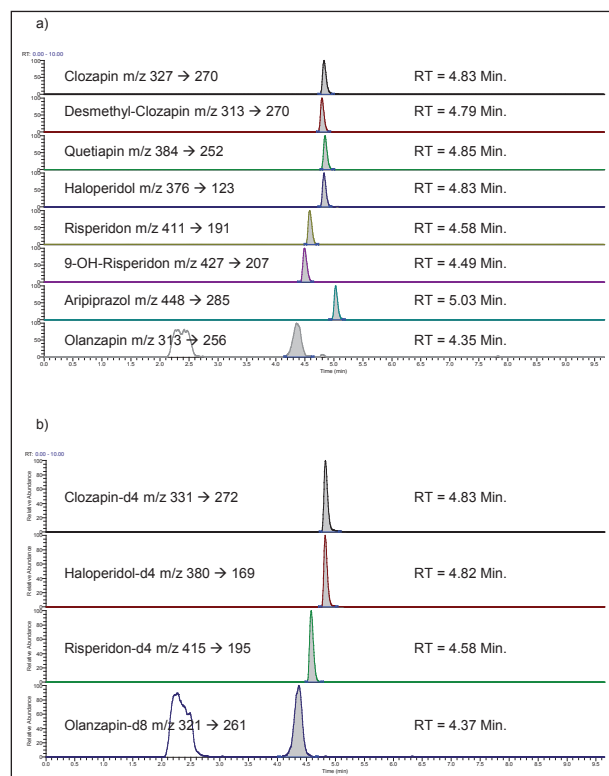


Abbildung 2: Chromatogramme einer Methode zur Bestimmung verschiedener Neuroleptika (a) und der für die Quantifizierung eingesetzten internen Standards (b).