



# Bepaling van immuno-suppressiva met behulp van LC-MS/MS

Karin Hoogtanders,  
Jac van der Heijden,  
Laboratorium Klinische Farmacie en  
Toxicologie,  
Academisch Ziekenhuis Maastricht

## Inleiding

Immuno-suppressiva zijn geneesmiddelen die de immuun chemische reactie van het lichaam tegen een getransplanteerd orgaan onderdrukken. De meest gebruikte immuno-suppressiva zijn ciclosporine, tacrolimus, mycofenolzuur en sirolimus. Deze geneesmiddelen zijn farmacokinetisch onvoorspelbaar, voor een juiste dosering is Therapeutic Drug Monitoring (TDM) noodzakelijk. Massaspectrometrie in combinatie met GLC of HPLC werd in het verleden veelal gebruikt voor structuur-opheldering en voor toxicologie. Door de verbeterde specificiteit en gevoeligheid en de gebruikersvriendelijkheid is deze techniek ook uitermate geschikt voor een kwantitatieve bepaling. In onderstaande tabel staan enkele voor-nadelen van LC/MS versus conventionele technieken voor kwantitatief gebruik

De concentratie van de immuun-suppressiva (met uitzondering van mycofenolzuur) moet in volbloed bepaald worden. Door het grote

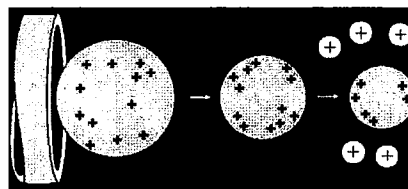
monsteraanbod hebben Immuno-assays de voorkeur vanwege de snelheid en het gebruikersgemak. Problemen bij deze techniek zijn de prijs, de cross reactiviteit van het anti-lichaam en de nauwkeurigheid. Medio 2001 verschenen diverse publicaties waarbij immuno-suppressiva in een klinische setting met LC tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS) werden bepaald. Kostprijs berekeningen gaven aan dat de LC-MS/MS t.o.v. immuno-assays een besparing van € 30.000 (met afschrijving en onderhoud apparatuur) per jaar zou opleveren voor ons ziekenhuis. De moeite waard dus!

## LC-MS/MS

Massaspectrometrie gekoppeld aan LC heeft de laatste jaren een snelle ontwikkeling doorgemaakt door de introductie van ionisatie bij atmosferische druk. De meest gebruikte manier van atmosferische ionisatie is de electrospray ionisatie. Hierbij wordt de mobiele fase door stikstof verneveld tot kleine druppels. Deze druppels bevinden zich in een elektrisch veld en de ladingen binnen deze druppels zullen dus polariseren, bijv. positieve ionen naar de buitenkant en negatieve ionen naar de binnen kant van de druppel. Door verdamping wordt de druppel

steeds kleiner en neemt de energie binnen de druppels toe totdat de druppel uit elkaar springt en de ionen verdampen uit de druppel (zie figuur 1).

Deze ionen worden door een geladen sampling cone de massaspectrometer ingezogen. Uiteindelijk komt minder dan 1% van de ionen die zich in de LC-outlet bevinden op de detector. Voor kwantificering is een goede interne standaard dan ook noodzakelijk.

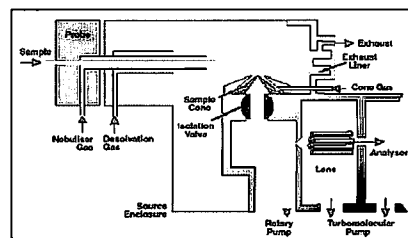


**Figuur 1:**  
Druppel in een elektrisch veld

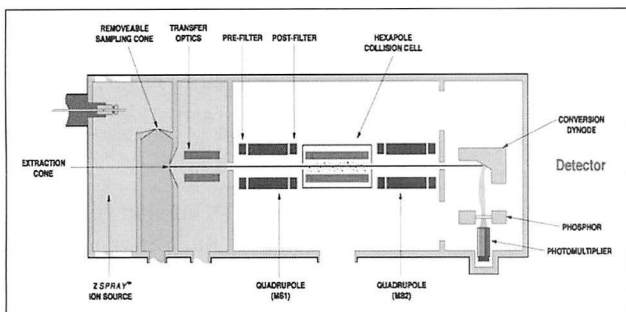
Een tweede bijdrage aan de snelle ontwikkeling van MS in combinatie met LC is de koppeling van LC en Massaspectrometer. Tegenwoordig staat de inlet van de sampling cone meestal orthogonaal op de outlet van de HPLC, waardoor de vervuiling van het vacuumedeelte minimaal is. Hierdoor is de gebruikersvriendelijkheid toegenomen. In ons laboratorium is de LC-MS/MS nu ruim een half jaar in gebruik en tot nu toe is het wekelijks schoonmaken van de sample cone voldoende om merkbare vervuiling tegen te gaan.

Techniek	Voordeel LC-MS	Nadeel LC-MS
Immunoassay	Lage reagentia kosten Specifieker Gevoeliger Meer analytische mogelijkheden	AANSCHAFKOSTEN Meer kennis Analyse tijd
LC/UV of LC/DAD	Analyse tijd Specifieker Gevoeliger	AANSCHAFKOSTEN Andere kennis

Tabel 1



**Figuur 2:**  
Z-spray waters quatro micro.



**Figuur 3:**  
LC-MS/MS quattro micro waters

Het analyzer gedeelte bestaat bij de "eenvoudige" massaspectrometers uit één quadruupool.

Het scheidend vermogen van een singlequadruupool MS ligt rond de 1 amu. De specificiteit van de MS wordt vergroot door meerdere quadruupolen in serie te schakelen (zie figuur 3).

In de eerste quadruupool wordt het gewenste ion geselecteerd. In de hexapool wordt argon gas toegevoegd en ontstaan er botsingen tussen monsterionen en argon-atomen. Dit heeft tot gevolg dat de monsterionen uit elkaar vallen volgens een specifiek patroon. In de laatste quadruupool wordt een specifiek dochter ion uitgescand dat vervolgens door de detector gemeten wordt. Indien meerdere stoffen bepaald moeten worden zal de eerste en de laatste quadruupool afwisselend scannen op ionen met een bepaalde m/z.

Een zeer specifieke methode die, theoretisch gezien, monstervoorbewerking en HPLC-scheiding overbodig maakt waardoor een hoge

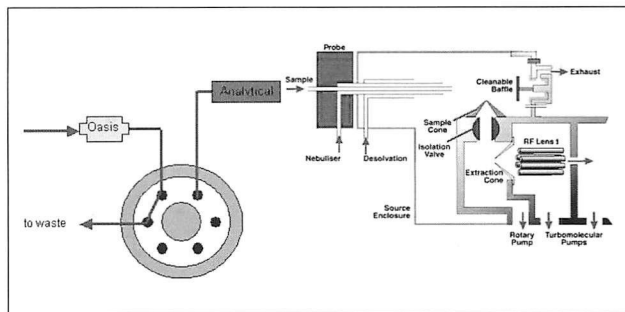
monstercapaciteit mogelijk is.

### Bepalingsmethode:

Na aanschaf van de LC-MS/MS is de opdracht: ontwikkel een high-throughput analysemethode voor ciclosporine, tacrolimus en sirolimus die aan de geldende normen voldoet.

Uit bovenstaand verhaal blijkt dat monstervoorbewerking niet meer belangrijk zou zijn. Niets is minder waar. Indien veel ionen aanwezig zijn in de druppel (fig 1) dan zal het te bepalen ion hinder ondervinden om te verdampen en zal ion-suppressie optreden. Dit is afhankelijk van de matrix waarin het monster zich bevindt. Het is dus belangrijk om middels een eenvoudige monstervoorbewerking zoveel mogelijk storende ionen te verwijderen. Daarnaast is het belangrijk om een structuuranaloog als interne standaard te kiezen zodat het effect van ion-suppressie voor component en interne standaard even groot is. In onze methode hebben wij voor elke component een aparte interne standaard.

Zoals eerder vermeld moeten de componenten in volbloed bepaald worden. Na lysisatie met zinksulfaat en onteiwitiging met methanol wordt het monster opgebracht op een concentratie kolom. Na een 0,5 min spoelen wordt het monster in fore flush gespoeld naar de analytische kolom. De componenten elueren tussen 2,4 en 2,7 min van de analytische kolom. De componenten zijn nauwelijks gescheiden, dat is ook



**Figuur 4:**  
Automatische deel monstervoorbewerking immunosuppressiva

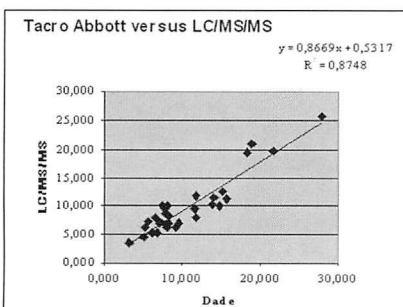
niet noodzakelijk want de scheiding vindt plaats op molecuulgewicht in de massaspectrometer (zie figuur 4).

### Discussie:

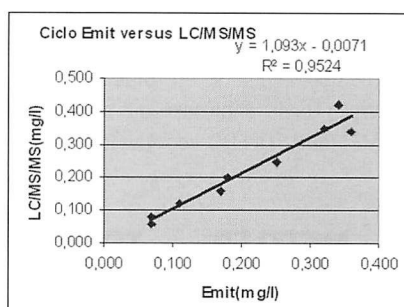
Na een uitgebreide validatie is de methode 26 januari j.l. officieel in gebruik genomen voor tacrolimus en ciclosporine. Met de bepaling van sirolimus zijn er op dit moment nog problemen met de gevoeligheid en reproduceerbaarheid. Een vergelijking van resultaten tussen de LC-MS/MS en de oude methode staan weergegeven in grafiek 1 en 2.

Ciclosporine is overeenkomstig de immunoassay van Dade Behring, tacrolimus heeft gemiddeld een lagere waarde dan de immunoassay van Abbott. De reden hiervoor is dat de immunoassay minder specifiek is en cross reactiviteit heeft met de metabolieten.

*De figuren uit dit artikel zijn afkomstig van Micromass.*



**Grafiek 1**  
Tacrolimus vergelijking



**Grafiek 2**  
Ciclosporine vergelijking