



# Plasmaspiegel-Bestimmung von Imatinib mit LC-MS/MS. Ein Vergleich zwischen Ionenfalle und Triple Quadrupol Massenspektrometrie.

J. Emmert<sup>1</sup>, P. La Rosee<sup>2</sup>, P. Findeisen<sup>1</sup>, R. Schreiner<sup>3</sup> und M. Neumaier<sup>1</sup>

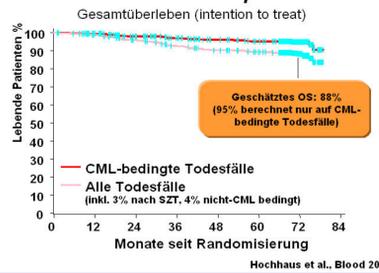
<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie, <sup>2</sup>III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mannheim, D, <sup>3</sup>Labor Limbach, Heidelberg, D

## Einleitung/Motivation

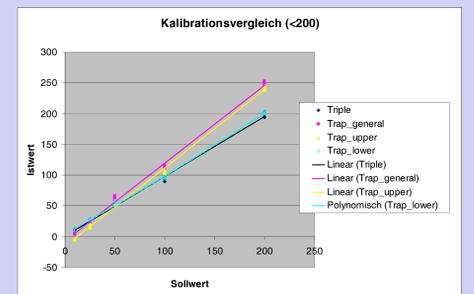
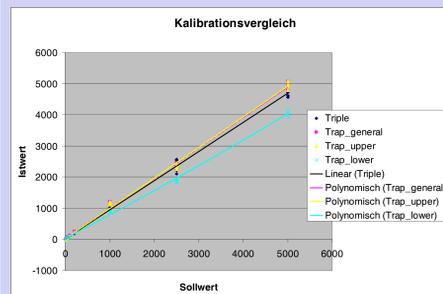
Imatinib ist ein Wirkstoff gegen chronische myelische Leukämie; es wirkt als Tyrosinkinase-Inhibitor. Trotz insgesamt exzellenter Behandlungsergebnisse erreicht eine gewisse Anzahl von Patienten nicht die prognostisch relevanten Meilensteine wie „complete cytogenetic response“ (CCR) oder „major molecular response“ (MMR). Gestörte Verstoffwechslung kann zur Anreicherung und damit zur toxischen Wirkung führen. Daher ist eine Plasmaspiegel-Bestimmung wichtig.

- ~25% der CML-Patienten zeigen bisher Therapieversagen:
  - 15% Primärresistenz
  - 10-15% Sekundärresistenz ohne Erreichen einer CCR nach Dosiserhöhung.
- 7% - 8% der Patienten zeigen Progression zu AP/BC.
- ~50% klinisch resistenter Patienten zeigen Kinase Mutationen der ABL-Kinasedomäne.

## IRIS – Follow up 6 Jahre



## MS-Geräte/Kalibration



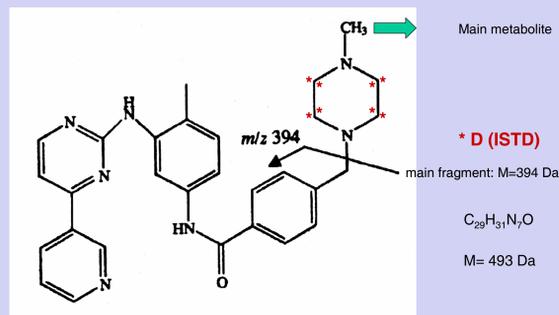
**Triple Quad (Waters Quattro Ultima):** grosser linearer Bereich, höhere Werte zu tief.  
**Ionenfalle (Bruker HCT):** Anpassung im unteren Konz.bereich nur durch segmentierte Kalibrationskurven.

## Leistungsdaten/Präzision/LOQ

Einzelwerte	[ng/ml]								QC1	QC min	QC mitte	QC max
Trap	10	25	50	200	500	1000	2500	5000	100	17.5	75	750
11,89	20,02	52,23	214,79	809,25	1171,65	2195,01	5124,35	118,09	11,52	80,03	877,12	
6,70	23,90	54,08	226,33	748,35	1107,76	2327,78	4718,01	100,39	11,29	74,40	883,09	
5,00	19,26	51,99	210,32	799,68	1072,11	2274,07	5040,64	112,83	10,58	84,77	799,19	
5,30	22,81	51,66	207,98	807,86	1085,94	2374,33	4663,22	106,60	9,48	79,04	871,00	
5,11	25,00	56,70	210,36	787,41	1107,23	2503,00	4898,32	102,67	12,28	86,45	879,81	
Mittelwert	6,80	22,20	53,33	213,96	790,51	1108,94	2334,84	4888,91	108,12	11,03	80,94	862,04
StAbw	2,93	2,47	2,10	7,34	25,12	38,15	115,25	199,18	7,30	1,06	4,80	35,41
VK	43,04	11,15	3,95	3,43	3,18	3,44	4,94	4,07	6,76	9,59	5,93	4,11
Triple Quad	10	25	50	200	500	1000	2500	5000	100	17,5	75	750
13,00	25,90	53,60	195,31	712,32	1094,73	2393,95	5101,66	116,52	23,30	75,40	791,20	
13,42	28,46	52,68	195,87	727,81	1096,26	2421,01	4901,26	111,12	18,50	73,70	809,00	
18,13	26,58	55,24	200,00	722,05	1093,99	2476,31	5164,47	108,44	18,20	72,10	795,70	
									18,40	72,30	810,20	
									18,40	72,30	803,00	
Mittelwert	14,85	26,95	53,81	197,06	720,73	1094,99	2430,39	5055,80	112,03	19,20	73,96	801,82
StAbw	2,85	1,37	1,31	2,56	7,83	1,16	42,02	137,47	4,12	2,32	1,86	8,27
VK	19,18	5,07	2,43	1,30	1,09	0,11	1,73	2,72	3,67	12,08	2,51	1,03

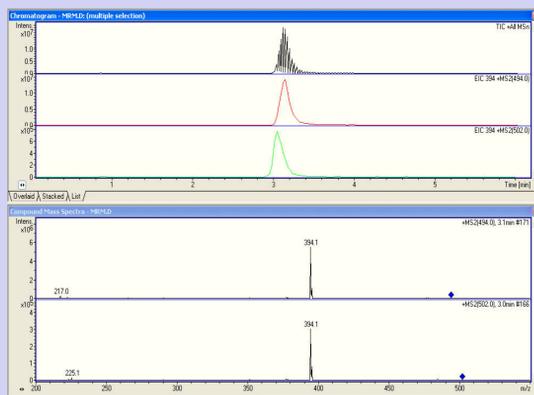
rot: nicht tolerierbarer Bias bzw. VK > 10%  
gelb: 10% > VK > 5%  
grün: VK < 5%

## Molekülstruktur/Messmethodik



UV-Signal ist nicht empfindlich genug (LOQ=1000 ng/ml), der typische therap. Bereich ist aber 300-1000 ng/ml. Daher Messung nur mit MS-Detektion möglich.

Praktische Durchführung im MRM-Modus, bei dem Massenübergänge zwischen Mutter- und Tochterionen betrachtet werden.  
Imatinib: 494 [M+H]<sup>+</sup> -> 394  
Metabolit: 480 [M+H]<sup>+</sup> -> 394  
D<sub>8</sub>-ISTD: 502 [M+H]<sup>+</sup> -> 394  
Besonderheit Imatinib: Zielbruchstück immer gleich.



## Probenvorbereitung/Chromatographie

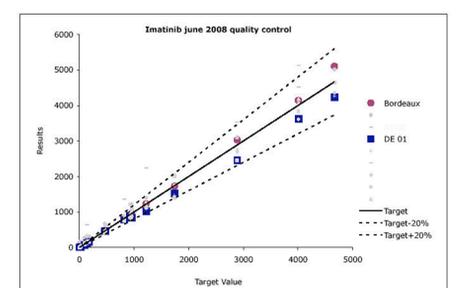
Einfache Proteinfällungen mit TCA oder HClO<sub>4</sub> wurden mit aufwendigeren Verfahren wie Liquid-Liquid-Extraction (LLE) oder Solid Phase Extraction (SPE) verglichen. Die Wiederfindung war in allen Fällen 95-100%. Der Vergleich zur LLE war nur über Ringversuch möglich, gewählt wurde die SPE mit Waters Oasis MCX (mixed-mode cation exchange) 1ml/30mg Extraction Cartridges. Die HPLC wurde auf einer Waters XBridge Phenyl 3.5µm, 2.1x100mm Säule durchgeführt. Die Säule zeichnet sich durch grosse pH-Stabilität aus; Trennungen können sehr gut durch Variation mit Methanol optimiert werden. Es wurde ein extrem schneller Gradient gefahren (Agilent 1200).

## Ringversuch Juni 2008

DE 01	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000
Mean	3,6	28,8	95,0	177,8	498,3	974,9	2923,2	4665,5		
SD (yL)	48,3	73,2	32,8	71,5	123,5	197,5	394,8	784,7		
CV	140	165,0%	65,0%	26,7%	15,0%	10,0%	9,0%	10,5%		
Min value	0	0	74	182	454	809	2492	4246		
Max value	160	190	270	338	650	1220	3642	6911		
Difference	160	190	196	158	201	411	1950	2271		
Your result	2	33	74	187	460	840	2460	4240		
Recovery	ND	-8,6%	-24,4%	-16,9%	-3,9%	-16,6%	-18,6%	-18,6%		
Z Value	-0,04	-0,08	-0,23	-0,15	-0,34	-0,88	-1,17	-0,98		

Für Werte <25 ng/ml ist die Präzision unzureichend (>10%), bei 10 ng/ml auch die Richtigkeit. Das LOQ müsste also bei 25 ng/ml festgesetzt werden.

Im Ringversuch wurden allerdings Werte von 25 und 0 ng/ml gut gefunden, das Resultat für 100 ng/ml lag hingegen ausserhalb. Weitere Erfahrungen und Messungen mit der Methode sind notwendig.



## Literatur

- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al. Blood 2006; 108(6): 1809-1820
- Titier K, Picard S, Ducint D, Teilhet E, et al. Ther Drug Monit 2005; 27:634-40
- Parise RA, Ramanathan RK, Hayes MJ, Egorin MJ. J. Chromatogr. B 2003; 791: 39-44