24/7 fullt automatiserad läkemedelsanalys (TDM) för forskningsprojekt med LC-MS/MS

Magnus Olin [1], Jaffuel Aurore [2], Yoshikawa Kohei [2], Streit Frank [3], Fischer Andreas [3]
[1] Shimadzu Filial Sverige, Stockholm, Sweden, [2] Shimadzu Corporation Japan, Kyoto, Japan, [3] Department of Clinical Chemistry, University Medical Center Göttingen (UMG), Germany

1. Introduktion

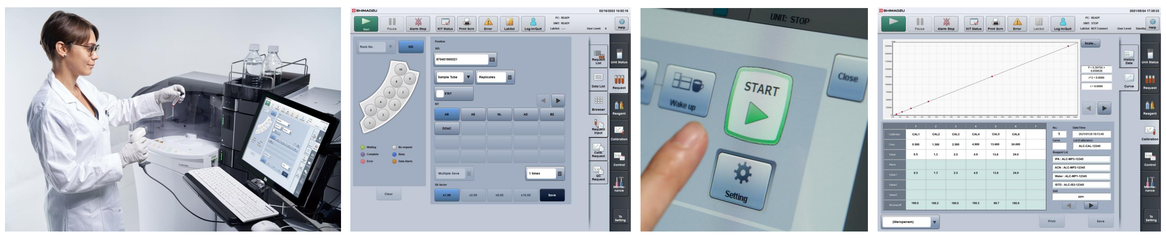
Förenklingar inom LCMS-instrumentering har gjort MS till ett attraktivt alternativ för klinisk forskning. Denna teknik har fördelen av specificitet, noggrannhet och minskade reagenskostnader jämfört med immunoanalyser. Möjligheten att använda olika analysmetoder på ett enda system är en viktig funktion. Det är dock inte alltid lätt att snabbt växla mellan flera olika analysmetoder. Automatisering är också en viktig funktion för att sträva efter bättre kvalitet och bättre arbetssituation för användarna i testlaboratorier. På senare tid har dock automatisering av biologisk provextraktion, direkt kopplad till LCMS, visat sig vara en utmaning inom området.

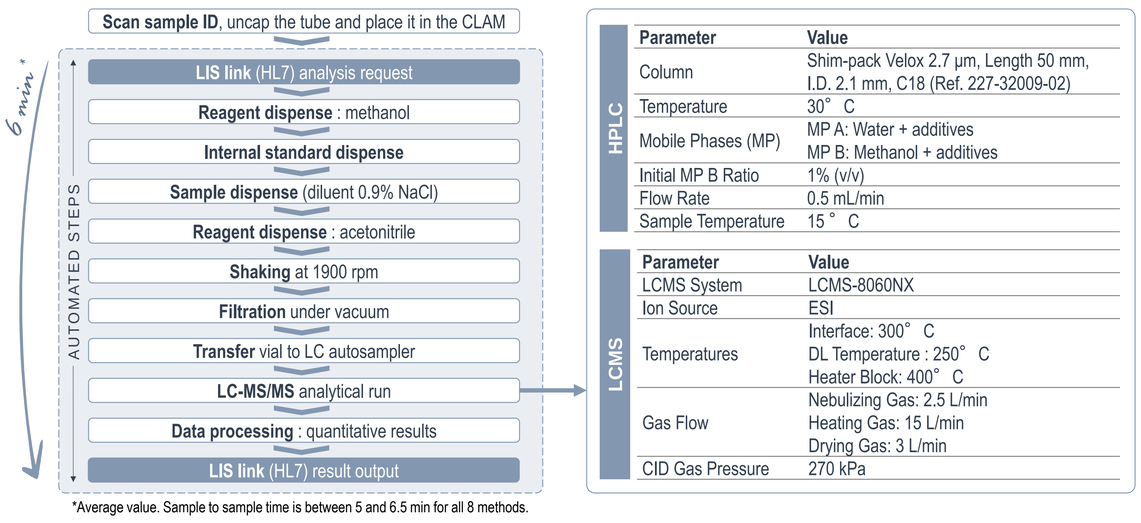
Ett samarbete mellan Universitetssjukhuset Göttingen (UMG) och Shimadzu Corporation byggdes upp för att gemensamt utveckla och validera flera analysmetoder för terapeutiska läkemedel, med hjälp av en helautomatiserad plattform (**Figur 1**). Syftet är att utveckla och validera en enhetlig metoduppsättning för LCMS, för analys dygnet runt, med en enda systemkonfiguration. Det innebär att metoderna enkelt kan växlas utan behov av mänsklig intervention, vilket möjliggör smidig användning i det kliniska forskningslaboratoriet.

Figur 1. Fullt automatiserad platform för TDM. Översikt över metoder och analytiskt system.

2. Material och Metoder

Det utvärderade analyssystemet var en helautomatiserad plattform från Shimadzu Corporation, bestående av en CLAM-2040-automationsmodul kopplad till Nexera X2 UHPLC och LCMS-8060NX MS/MS. HL-7-gränssnittsstandarder användes för dubbelriktad kommunikation mellan laboratorieinformationssystemet (LIS) (Dedalus, Tyskland) och CLAM-LC-MS/MS. Målapplikationerna var antibiotika (AB, 16 föreningar), direkta orala antikoagulantia (DOAC, 9 föreningar), antiepileptika (AE, 26 föreningar), neuroleptika (NL, 28 föreningar), SSRI-antidepressiva medel (AD, 36 föreningar), tricykliska antidepressiva medel (TCA, 13 föreningar), bensodiazepiner (BZ, 35 föreningar) och svampdödande medel (AF, 16 föreningar). För varje klass av analyter utvecklades och validerades en individuell metod (8 metoder). Alla metoder använder liknande analytiska förhållanden **(Figur 2),** så det finns inget behov av systemjämvikt mellan två olika metoder. Lämpligheten för denna plattform för användning dygnet runt utvärderades sedan genom att upprepade gånger begära mätningar för alla metoder slumpmässigt.

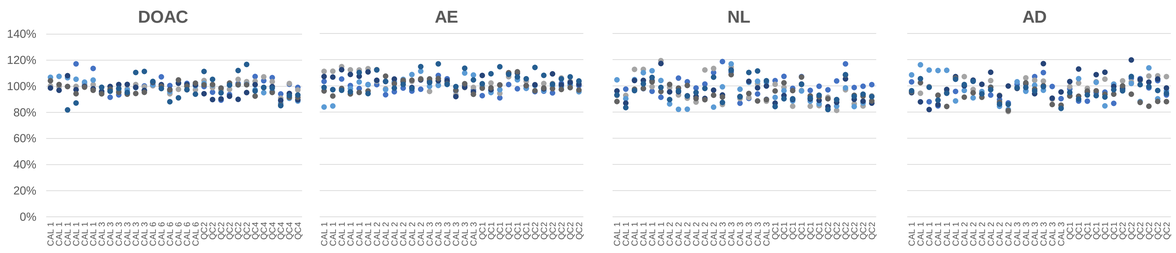




Figur 2. Enhetliga analytiska parametrar (identiska parametrar mellan alla 8 metoder).

3. Resultat

Alla andra metodvalideringar har redan slutförts. Valideringskriterierna beskrivs nedan. Individuella metodvalideringar inkluderar isobarupplösning (upplösning över 1), kalibreringsnoggrannhet (QC och kalibreringsnoggrannhet inom 80–120 %), LCMS-repeterbarhet (area, areaförhållande och jonförhållande CV under 10 %), CLAM-LC/MS/MS-metodens repeterbarhet (area, areaförhållande och jonförhållande CV under 15 %), daglig mellanliggande precision (area, areaförhållande och jonförhållande CV under 15 %), mobil fasstabilitet (avvikelse i retentionstiden under 2 % efter 2 veckor), LLOQ-bekräftelse (signal-brusförhållande över 10 och area-CV under 15 %), matriseffektutvärdering (matrisfaktor inom 50–120 %), frånvaro av överföringsbekräftelse (blank- till LLOQ-areaförhållande under 30 %) och ringtestanalys (provkoncentrationsnoggrannhet inom 80–120 %). Även upprepade mätningar för alla metoder i slumpmässig alternerande (endast delvis genomförda) är lovande och visar resultat inom acceptanskriterierna (noggrannhet inom 80–120 % och CV under 15 %). Ett urval av valideringsresultaten visas nedan. I **Figur 3** presenteras resultat för varje metod för 6 representativa föreningar: kalibreringsnoggrannheten (QC och kalibrant), CLAM-LC/MS/MS-metodens repeterbarhet (QC-areaförhållande CV, intradag) och den dagliga intermediära precisionen (QC-areaförhållande CV, mellan dagar). Alla klarade valideringskriterierna. **Figur 4** visar exempel på resultat från ringtestanalys för antidepressiva medel och bensodiazepiner.

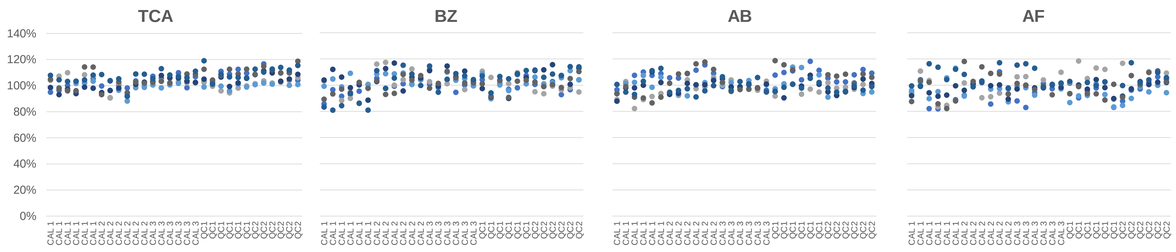


	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Apixaban	5.1	6.5	5.8	5.0
Betrixaban	4.7	8.4	3.8	6.2
Dabigatran	8.1	11.8	9.1	6.8
Edoxaban	4.0	8.2	2.9	1.5
Rivaroxaban	7.4	2.3	5.1	4.8
Warfarin	8.0	7.4	5.7	3.8

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
10-OH-CBZ	3.6	2.9	6.5	6.2
Carbamazepine	4.2	1.9	3.5	3.1
Lamotrigine	4.5	1.5	4.9	4.2
Levetiracetam	5.0	3.7	4.4	3.2
Oxcarbazepine	4.9	1.3	3.1	2.2
Valproic acid	4.0	5.1	5.5	6.2

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Aripiprazole	9.5	4.8	6.9	6.3
Haloperidol	14.5	4.1	14.5	6.9
Olanzapine	7.5	2.0	9.1	6.6
Quetiapine	9.8	2.3	9.0	6.6
Risperidone	7.6	2.7	8.1	6.1
9-OH-Risperidone	9.1	2.3	10.1	8.8

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Citalopram	3.8	3.8	9.4	9.5
Fluoxetine	2.3	4.8	7.9	5.5
DM-Fluoxetine	7.1	5.8	9.1	5.3
Paroxetine	4.7	6.4	8.5	10.0
Sertraline	4.5	7.1	7.1	4.3
Venlafaxine	4.4	3.7	14.1	8.0



	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Amitriptyline	6.2	3.9	5.6	5.4
Clomipramine	1.4	1.4	4.4	4.8
Desipramine	1.1	1.1	2.5	2.6
Doxepin	1.8	2.8	4.0	3.4
Imipramine	2.9	3.2	4.8	4.4
Nortriptyline	1.4	1.7	4.5	4.5

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Alprazolam	5.4	3.0	5.1	3.5
Clonazepam	6.9	2.3	5.3	2.7
Diazepam	1.1	0.8	5.3	3.5
Lorazepam	6.6	3.3	5.9	4.3
Nordiazepam	2.6	3.4	5.1	3.9
Oxazepam	2.2	4.1	4.2	3.4

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
Cefotaxime	4.60	1.03	2.46	1.58
Chloramphenicol	3.70	1.91	3.42	1.46
Daptomycin	1.28	0.48	4.39	3.56
Linezolide	2.10	1.79	3.61	3.77
Meropeneme	2.50	2.48	3.96	2.77
Piperacilline	3.52	2.13	4.50	2.12

	intra-day CV (%)		inter-day CV (%)	
	QC 1	QC 2	QC 1	QC 2
5-Fluorocytosin	4.71	1.13	2.42	2.47
Caspofungin	1.78	3.40	4.99	4.47
Voriconazol	1.55	1.03	7.60	2.32
Ketoconazol	2.16	1.36	1.84	2.13
OH-Itraconazol	6.06	2.93	4.79	2.94
Itraconazol	5.86	2.86	2.74	2.45

Figur 3. Kalibreringsnoggrannhet och QC-areakvot CV, intradag och interdag.
För varje metod presenteras 6 representativa föreningar.

Figur 4. Resultat från analys av ringstudier för antidepressiva medel (AD) och bensodiazepiner (BZ)

4. Diskussion

Denna metod har visat sig ha flera fördelar jämfört med typiska konventionella LCMS-metoder (**Figur 5**). Dessa inkluderar (men är inte begränsade till): kalibreringsstabilitet (daglig kalibrering är inte nödvändig), systemets enkla åtkomst som kräver låg teknisk kunskap, bekvämligheten med den automatiserade provberedning som möjliggör mindre än 10 minuters tid mellan mottagandet av provet och resultatet, enkel växling mellan olika analysmetoder utan behov av rensning eller jämvikt, möjligheten att analysera prover i slumpmässig ankomstordning (inklusive förfrågningar om olika metoder) och LIS-anslutning (HL7-gränssnitt).

	Typical LCMS Method	Novel Method
Feature	**Manual sample prep. + LCMS**	**CLAM-LC/MS/MS**
Calibration stability	Daily calibration	More than 1 week
Technical knowledge required	High	Low
Automated online sample preparation	Not available	Yes
Time from sample to result	More than 30 min	Less than 10 min
Procedure between methods	Purge, System equilibration	No need > smooth switch
Random order analysis (various methods)	Not available	Available
LIS link (HL7 interface)	Indirect	Yes
Suitable for 24/7	Difficult	Yes

Figur 5. Nya metodens fördelar jämfört med typisk konventionell LCMS-metod.

5. Slutsats

"Convincing" "Easy handling" "Conceivable for 24/7"

Denna strategi visade sig vara lämplig för terapeutisk läkemedelsanalys dygnet runt med LCMS. De snabba LCMS-metoderna, som kan alternera smidigt, och den automatiserade provextraktionen möjliggör robust terapeutisk läkemedelsanalys med hög genomströmning och låg kostnad, samtidigt som användarkomforten förbättras.

Disclaimer: For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.