

Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus:

Immunsuppressiva-Analytik durch HPLC/Tandem-Massenspektrometrie

Als Immunsuppressiva werden allgemein diejenigen pharmakologisch wirksamen Substanzen bezeichnet, die durch molekulare Manipulation der humanen Immunantwort die Abstoßungsreaktion unseres Körpers auf transplantierte Gewebe bzw. Organe unterdrücken und somit einen essentiellen Beitrag zum Erfolg dieser Transplantationen leisten. In den meisten Fällen wird eine Kombination von unterschiedlichen Immunsuppressiva verabreicht, mit der die Signalkaskade vom Antigenrezeptor zum Zellkern unterbrochen wird, indem die T-Zell-Aktivierung an unterschiedlichen Stellen der Reaktionskette blockiert wird (1).

Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK 506) kommen vornehmlich nach Transplantationen kompletter Organe sowie Knochenmarkstransplantationen zum Einsatz. CsA bindet Cyclophilin A, und FK 506 bindet das Protein FKBP12. Die jeweiligen Komplexe binden wiederum an hochkonservierte Domänen des zytosolischen Proteins Calcineurin A, die Aktivität dieser Serin/Threonin-Phosphatase wird dadurch blockiert (8). Durch die Hemmung der Calcineurin A-Aktivität unterbleibt die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-AT, AP-3 und NF-KB in den Zellkern (2,3). Die Aktivität dieser Nukleoproteine im Zellkern ist für die transkriptionelle Aktivierung von Genen der Cytokine Interleukin-2, -4 und -15 unerlässlich; durch das Ausbleiben wird die Produktion der Interleukine heruntergefahren. Der Zellzyklus verharrt in der G0-Phase, ohne Übergang in die G1-Phase. Damit unterbleibt die T-Zell-Aktivierung (4). Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus werden nach



Organtransplantationen eingesetzt. Das Molekül bindet ebenfalls das Immunophilin FKBP12 und komplexiert danach jedoch mit einer bislang nicht näher beschriebenen Serin/Threonin-Kinase, die momentan als mTOR („mammalian target of rapamycin“) bezeichnet wird. Dieses Zielmolekül liegt in der Signaltransduktionskette der Phosphatidylinositol-3'-kinase (4,5) und aktiviert unter physiologischen Bedingungen die 40S ribosomale Protein S6-Kinase (p70s6k) und den Initiationsfaktor *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1*. Durch die Bindung an mTOR und die daraus resultierende Aktivitätshemmung unterbricht Sirolimus die Signalkette des natürlichen Zellzyklus des T-Lymphozyten und die Progression von der G1-Phase zur S-Phase unterbleibt (6,7). Diese Funktion der Unterbindung von Zellwachstum und Störung des Zellzyklus bietet auch den Einsatz von Sirolimus und analogen Substanzen als Antitumor-Therapeutikum an. Aufgrund ihrer hohen pharmakologi-

schen Wirkung ist es extrem wichtig, die Blutkonzentrationen der Immunsuppressiva innerhalb der therapeutischen Bereiche zu halten. Zu geringe Konzentrationen resultieren in einer zu schwachen Unterdrückung der Abstoßungsreaktion und das transplantierte Gewebe kann irreversibel geschädigt werden, was u.U. zum schnellen Tode des Patienten führen kann. Zu hohe Blutkonzentrationen hingegen verstärken die medikamentösen Nebenwirkungen: CsA und FK506 sind nephrotoxisch, alle Immunsuppressiva führen zur Hypercholesterinaemie. Starke intra- und interindividuelle Schwankungen der Pharmakokinetik erfordern stets eine individuelle Einstellung der Einnahmemengen und Beobachtung des Arzneimittelspiegels.

Die Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) ist eine sehr spezifische Analyseverfahren in Hinblick auf die Identifikation einzelner Komponenten. Dennoch ist das potentielle Risiko, Matrix-Interferenzen zu erhalten,

Seite 2

Immunsuppressiva-Analytik

Fortsetzung von Seite 1

Seite 3

Control of Assays for Immunosuppressive Drugs

Artikel von Dr. David W Holt

Immunsuppressiva Vollblut-Kontrollen Level I, Level II, Level III, Level IV

Produktinformation

Seite 3/4

Belastungen am Arbeitsplatz

Der Chromsystems-Kit zur Bestimmung arbeitsmedizinischer Parameter im Urin

Determination of solvent Metabolites in Urine

Artikel von Dr. Claudio Minoia, Italy

Seite 5

Hippursäure, Methylhippursäuren, Mandelsäure & Phenylglyoxylsäure im Urin

Produktinformation

Seite 6/7

HPLC-Analytik von Neuroleptika

Olanzapin, Quetiapin und Promazin im Serum/Plasma

Produktinformation

Seite 7

Porphyrien

Die Notwendigkeit zum Porphyrin-profiling

Seite 8

Wir stellen vor... Termine & News

hoch, wenn extrem geringe Konzentrationen gemessen werden, wie es bei Tacrolimus und Sirolimus der Fall ist. Auch unterschiedlich effektive Probenvorbereitungsprozedere und chromatographische Auftrennungen machen die Einschätzung von Matrix-Blindwerten notwendig.

Die Chromsystems-Qualitätskontrollen ermöglichen die zuverlässige Routine-Überprüfung gemessener Patientenwerte. Empfohlen wird die Positionierung einer Kontrollmessung nach jeder zwanzigsten Patientenprobe, jedoch mindestens nach jeder fünfzigsten Probe. Die Kontrollen müssen, unabhängig von der Messmethode, wie reguläre Patientenproben aufgearbeitet werden. Die Kontrollen sind in vier Konzentrationen erhältlich

(0082, 0083, 0084, 0085), wovon drei die üblichen Talspiegel abdecken und einer zur Kontrolle des Spitzenspiegels direkt nach Verabreichen des Medikaments bestimmt ist. Da CsA, Tacrolimus sowie Sirolimus und Everolimus in Erythrozyten akkumulieren, ist nur die Messung von Vollblutproben sinnvoll; entsprechend basieren die Chromsystems-Kontrollen auf einer Vollblutmatrix. Alle Kontrollen sind lyophilisiert erhältlich, um die Langzeitstabilität der Analyten und die höchste Genauigkeit der Zielwerte zu gewährleisten. Die Blindwertkontrolle „blank control“ (0089) ist zur Messung von Matrixinterferenzen (siehe oben) bestimmt. Gegebenenfalls festgestellte „Nullwerte“ können zur Anpassung des Messsystems genutzt werden. Auch die Blindwertkontrolle wird in

Vollblutmatrix produziert und lyophilisiert. Dabei ist es zur Erlangung höchstmöglicher Genauigkeit notwendig, dass die Nullwertkontrolle in exakt der selben Matrix erstellt wird, wie die Qualitätskontrollen 0082 bis 0085. Selbstverständlich ist das bei Chromsystems der Fall, und alle fünf Kontrollen werden entsprechend als Set mit übereinstimmenden Chargennummern angeboten.

Der Vollblut-Kalibrationsstandard 28003 komplettiert die Serie von Immunsuppressiva-Kontrollen. Auch dieser Standard wird lyophilisiert geliefert und muss wie eine Patientenprobe aufgearbeitet werden. Alle Kontrollen und der Kalibrationsstandard sind sowohl für HPLC-Methoden als auch für Immunoassays geeignet.

Literatur:

- (1) Am J Kidney Dis. 1996 Aug;28(2):159-72. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB.
- (1b) Clinical Chemistry. 2002;48:2225-2231. Delayed Cytokine mRNA Expression Kinetics after T-Lymphocyte Costimulation: A Quantitative Measure of the Efficacy of Cyclosporin A-based Immunosuppression. Christoph Härtel1, Lutz Fricke2, Nina Schumacher1, Holger Kirchner1 and Michael Müller-Steinhardt1
- (2) Science. 1989 Dec 22;246(4937):1617-20. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR.
- (2b) J Lab Med 2003;27 (5/6):222-227. Drug Monitoring of Sirolimus and Everolimus. Victor W. Armstrong, Frank Streit
- (3) Cancer Biol Ther. 2003 May-Jun;2(3):222-32. Rapamycin: mechanism of action and cellular resistance. Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ
- (4) Clin Breast Cancer. 2003 Jun;4(2):126-37. Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK
- (5) Mol Immunol. 2003 Jul;39(17-18):1073-7. The mosaic of immunosuppressive drugs. Masri MA
- (8) EMBO J. 1995 Jun 15;14(12):2771-83. Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. Cardenas ME, Muir RS, Breuder T, Heitman J

Control of Assays for Immunosuppressive Drugs

Dr. David W Holt, Director, Analytical Unit, St George's Hospital School, London SW17 0RE
Contact: d.holt@sgghms.ac.uk

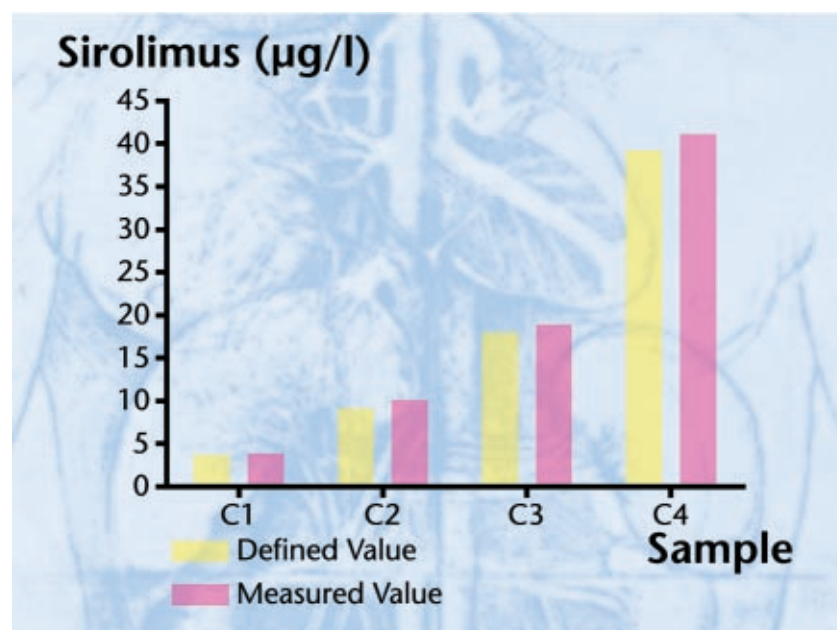
The immunosuppressive drugs are characterised by substantial between-patient differences in their pharmacokinetics and a broad spectrum of unwanted effects. Cyclosporin and tacrolimus, still the mainstay of drug therapy for the avoidance of graft rejection, are routinely measured in blood to assist in their optimal prescription. Recently, attention has focused on a newer drug, sirolimus, for which drug monitoring in blood is a regulatory requirement in Europe.

There are no established reference methods for the measurement of the immunosuppressive drugs, nor are there certified reference materials for calibration. As a result, between-method assay performance varies substantially. This is due both to errors in calibration, and to differences in specificity of the antibodies used in the immunoassays. Data on method performance can be judged by external proficiency testing material, as presented on our web site (www.bioanalytics.co.uk), and by reference to consensus documents on immunosuppressive drug monitoring. A joint Working Group sponsored by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology is reviewing current methods and monitoring strategies (1).

There are some interesting developments in immunosuppressive drug therapy, related to both the introduction of new drugs and the use of new drug combinations. These developments pose analytical challenges for the laboratory related to sensitivity

and selectivity. A driving force for innovation in methodology has been the introduction of sirolimus since, currently, HPLC is the only technique available for its measurement. More than 100 centres world-wide are now measuring the drug by HPLC, about half of these using mass-spectrometric detection (LC/MS). This technique

has also underpinned all the clinical studies of the sirolimus analogue, everolimus, to be introduced in Europe early in 2004, and is being used by an increasing number of centres for the measurement of cyclosporin and tacrolimus.



and selectivity. A driving force for innovation in methodology has been the introduction of sirolimus since, currently, HPLC is the only technique available for its measurement. More than 100 centres world-wide are now measuring the drug by HPLC, about half of these using mass-spectrometric detection (LC/MS). This technique

The need for centres to prepare in-house calibrators for use in LC/MS assays has focused attention on the need for well-defined control material. This is particularly so for sirolimus, since there are no immunoassay results with which to compare locally prepared calibration material. Recently, we have tested a set of four freeze-

dried whole blood controls with defined-values for the measurement of sirolimus, using LC/MS (Chromsystems GmbH, München, Germany). The results are illustrated below and show good agreement between the mean of 5 replicates of each control, analysed in this laboratory, and the mean defined value. The average deviation from the expected value was 6.5%. A blank matrix and calibrator are also available from the same source. All these materials also contain defined values of cyclosporin and tacrolimus.

Even for immunoassays there is interest by manufacturers in defining their own calibrators against well sourced control material. Currently, we are supplying services to diagnostics manufacturers for the assessment of calibrator material using validated LC/MS assays, and by supplying proficiency testing material previously assayed on multiple sites.

Thus, in a continuously evolving field, there is a need for constant vigilance to ensure that assays for these critical dose drugs are both accurate and precise.

Literature:

- (1) Ther Drug Monit, 24, 59-67, 2002. International Federation of Clinical Chemistry/International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Working Group on immunosuppressive drug monitoring. Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM.

Immunsuppressiva

Vollblut-Kontrollen Level I, Level II, Level III, Level IV

Vollblut-Kalibrationsstandard/Vollblut-Blank-Kontrolle

Konzentrationen: Chromsystems Immunosuppressants Control			Level I		Level II		Level III		Level IV	
Substanz	Methode	Einheit	Wert	Bereich	Wert	Bereich	Wert	Bereich	Wert	Bereich
Ciclosporin A	HPLC-UV	µg/l	96	77-115	242	193-290	476	381-572	1899	1519-2278
	Dade-Behring EMIT	µg/l	101	81-121	247	198-296	467	374-560	2051	1641-2461
	Abbott TDx	µg/l	110	83-138	274	206-343	528	396-659	1833	1375-2291
Rapamycin (Sirolimus)	LC-MS/MS	µg/l	3,7	2,6-4,8	9,1	7,3-10,9	18,0	14,4-21,6	39,2	31,4-47,0
Tacrolimus (FK 506)	Abbott IMx	µg/l	6,4	5,1-7,7	12,2	9,8-14,6	23,7	19,0-28,4	44,6	35,7-53,5
	LC-MS/MS	µg/l	3,4	2,7-4,1	8,2	6,6-9,8	18,1	14,5-21,7	36,0	28,8-43,2

Konzentrationen:			Whole Blood Calibration Standard	Whole Blood Blank Control
Substanz	Methode	Einheit	Wert	Wert
Ciclosporin A	HPLC-UV	µg/l	332	not detected
	Dade-Behring EMIT	µg/l	338	not detected
	Abbott TDx	µg/l	383	< 6,0
Rapamycin (Sirolimus)	LC-MS/MS	µg/l	14,5	not detected
Tacrolimus (FK 506)	Abbott IMx	µg/l	17,3	< 3,0
	LC-MS/MS	µg/l	13,4	not detected

Anleitung Vollblut-Kontrollen Level I, Level II, Level III, Level IV

Diese Chromsystems-Kontrollen dienen zur Überprüfung von Richtigkeit und Präzision analytischer Verfahren für die quantitative Bestimmung von Ciclosporin A, Rapamycin und Tacrolimus im Vollblut. Die lyophilisierte Kontrolle ist auf der Basis von Humanvollblut hergestellt und kann unter Routinebedingungen analog zur jeweiligen Testdurchführung analysiert werden. Die Vollblutkontrolle wird in gleicher Weise wie eine Patientenprobe entsprechend der Testvorschrift verwendet und eingesetzt.

Bestellinformationen

Best. Nr. Produkt

- 0081 Immunosuppressants Whole Blood Control, Four-Level (I + II + III + IV), 4 x 2 x 2 ml
- 0082 Immunosuppressants Whole Blood Control, Level I, 5 x 2 ml
- 0083 Immunosuppressants Whole Blood Control, Level II, 5 x 2 ml
- 0084 Immunosuppressants Whole Blood Control, Level III, 5 x 2 ml
- 0085 Immunosuppressants Whole Blood Control, Level IV, 5 x 2 ml

Anleitung Vollblut-Kalibrationsstandard/Vollblut-Blank-Kontrolle

Diese Chromsystems-Blank-Kontrolle dient zur Überprüfung der Einflüsse der verwendeten Matrix auf analytische Verfahren für die quantitative Bestimmung von Ciclosporin A, Rapamycin und Tacrolimus im Vollblut. Die lyophilisierte Kontrolle ist auf der Basis von Humanvollblut hergestellt und kann unter Routinebedingungen analog zur jeweiligen Testdurchführung analysiert werden. Diese Vollblutkontrolle wird in gleicher Weise wie eine Patientenprobe entsprechend der Testvorschrift verwendet und eingesetzt. Diese Blank-Kontrolle repräsentiert die Original-

matrix der Chromsystems Immunosuppressants Kontrollen- und Kalibratorserie der identischen Lot.

Bestellinformationen

Best. Nr. Produkt

- 28003 Immunosuppressants Whole Blood Calibration Standard, 5 x 2 ml
- 0089 Immunosuppressants Whole Blood Blank Control, 5 x 2 ml

Belastungen am Arbeitsplatz

Belastungen durch organische Lösungsmittel am Arbeitsplatz: Der Chromsystems-Kit zur Bestimmung arbeitsmedizinischer Parameter im Urin

Beschäftigte der chemischen Industrie sind einer Vielzahl gesundheitsschädlicher, leicht flüchtiger Substanzen ausgesetzt, welche durch die Atmung aufgenommen und durch die Lunge absorbiert werden. Große Bedeutung haben die Lösungsmittel Toluol und Xylol, die in der Produktion von Fetten und Ölen, Farben, Klebstoffen, Reinigungsmitteln und in Motorkraftstoffen eingesetzt werden. Daneben spielt auch Styrol eine Rolle, diese Substanz ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Synthese von Kunststoffen.



Im Organismus unterliegen alle drei Substanzen dem Stoffwechsel: Toluol wird durch Oxidation und Konjugation in Hippursäure umgewandelt, Xylol in die entsprechende o-, m- oder p-Methylhippursäure. Styrol wird zu Mandelsäure (85%) und Phe-

nylglyoxylsäure (10%) oxidiert. Toluol, Xylol und Styrol sind lipophil und verteilen sich im Fettgewebe und Nervengewebe. Ihre Metaboliten hingegen sind hydrophil und können mit dem Urin ausgeschieden werden. Eine akute Vergiftung mit diesen Substan-

zen führt zu Rauschzuständen und Halluzinationen; chronische Vergiftungen bewirken Schäden am ZNS und am peripheren Nervensystem. Als Grenzwert einer noch unschädlichen Exposition wurde die „Maximale Arbeitsplatz-Konzentration“, der MAK-

Wert, eingeführt, der diejenige Konzentration am Arbeitsplatz definiert, unter der auch bei langfristiger Exposition keine Gesundheitsschäden zu erwarten sind. Daneben wurden auch für Toluol, Xylol und Styrol die BAT-Werte festgelegt (Biologischer Arbeitstoff-Toleranz Wert), welche die höchsten Konzentrationen einer Substanz bzw ihres Metaboliten in biologischem Material (z.B. Urin, Blut) nennt, bei der im allgemeinen die Gesundheit des Arbeitnehmers nicht beeinträchtigt wird. Ziel von arbeitsmedizinischen Untersuchungen ist die Kontrolle der Schadstoffaufnahme, um die Belastung der einzelnen Personen abzuschätzen und um so die damit verbundenen Gesundheitsrisiken minimieren zu können. Für die vorliegende Analytik ist die Bestimmung der Metabolite im Urin am besten geeignet, da durch die hohe Metabolisierungsrate mehr als 95% der auf-

genommenen Substanzen innerhalb von 24h wieder ausgeschieden werden und dadurch die Blutwerte sehr niedrig sind. Zusätzlich korrelieren Urinwerte mit der Schadstoffexposition am besten.

Seit November 2003 bietet Chromsystems einen neuen Reagenzienkit zum spezifischen Monitoring von Hippursäure, Methylhippursäuren, Mandelsäure und Phenylglyoxylsäure im

Urin in einem HPLC-Lauf an. Der Kit zeichnet sich durch eine sehr einfache Probenvorbereitung sowie hohe Präzision aus. Für die Aufarbeitung werden nur 10ml Urin benötigt. Der Urin wird zuerst stabilisiert und ein Interner Standard hinzugefügt, danach wird der enthaltene Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Die so erhaltene Probe kann an einer isokratischen HPLC-Anlage mit UV-Detektion analysiert werden. Durch die Verwen-

dung des internen Standards werden analytische Schwankungen minimiert und die hohe Präzision und Zuverlässigkeit der Ergebnisse sicher gestellt. Das Chromatogramm auf Seite 5 demonstriert die einwandfreie chromatographische Auftrennung. Innerhalb von 20 Minuten können alle Metaboliten analysiert werden. Zwei unterschiedliche Levels von Kontrollen und ein Urin-Kalibrationsstandard komplettieren diesen Kit.

Literatur

- (1) Drug Safety, 1990, 5, 359-383. An introduction to the clinical toxicology of volatile substances, R. J. Flanagan, M. Ruprah, T. J. Meredith, J. D. Ramsey,
- (2) Medical Hypotheses, 2000, 54, 619-623. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure - a working hypothesis, B. Marczynski, M. Peel, X. Baur
- (3) Pathology, 1994, 26, 301-309. Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance, J. L. Langman
- (4) Toxicology Letters 1995, 77, 85-91. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring, M. Ikeda

Determination of solvent Metabolites in Urine

Dr. Claudio Minoia,
Laboratory for Environmental
and Toxicological Testing,
"Salvatore Maugeri" Foundation, Pavia, Italy

Aromatic solvents, such as toluene, xylene and styrene, are widely used in several applications, including industrial solvents and chemical intermediates. Since these compounds are often used in combination with each other, workers are usually exposed to a mixture of solvents, which can also be due to the presence of significant amounts of contaminants. Occupational exposure is commonly evaluated by biological monitoring with simultaneous measurement of the working environment. Since solvents are mainly absorbed by inhalation, air concentrations of these compounds are measured, and urinary metabolites are also determined. The results from both environmental and biological monitoring are then compared for example with the corresponding Threshold Limit Values (TLVs) and Biological Exposure Indexes (BEIs) developed by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).

Nevertheless, detectable concentrations of some of these metabolites, such as hippuric acid, can be found in the urine of non-exposed subjects. The Reference Values in the general population should be therefore taken into account, and the influence of different variables (diet, lifestyle, etc.) on the urinary levels of these substances should be evaluated.

The main end products of styrene metabolism are urinary mandelic acid (MA) and phenylglyoxylic acid (PGA). In the occupational studies, end-of-shift and next-morning MA + PGA are used as indicators of chronic styrene exposure. According to the ACGIH, the air level of styrene should not exceed 20 ppm (86 mg/m³). This value is strictly related to the next-morning urinary mandelic acid and



phenylglyoxylic acid, which should be less than 300 mg/g creatinine and 100 mg/g creatinine, respectively. As far as end-of-shift urinary levels are concerned, the mandelic and phenylglyoxylic acid concentrations should not be higher than 800 mg/g creatinine and 240 mg/g creatinine, respectively. In contrast, in the general population, average levels of 3.8 mg mandelic acid/g creatinine and 4.3 mg phenylglyoxylic/g creatinine are measured.

Toluene is commonly used as an industrial solvent for the manufacturing of paints, chemicals, pharmaceuticals, and rubber and a TLV-TWA of 50 ppm (188 mg/m³) has been established by the ACGIH. Toluene exposure levels can be determined from urinary hippuric acid levels, which is its major urinary metabolite. Nevertheless, when workers are exposed to low levels of airborne toluene (short exposures or TWA concentrations below 10 ppm), correlation coefficients between end-of-shift levels of hippuric acid and toluene concentrations in

air, are not statistically significant. Urinary hippuric acid levels are in this case very close to those measured in the general population (average levels 300-400 mg/g creatinine, ranging from 50 to 2000 mg/g creatinine). This means that there are a number of hippuric acid precursors in the environment, such as benzoic acid in food (e.g. plums, preserved food containing fish or eggs), which makes diet one of the major confounding factors.

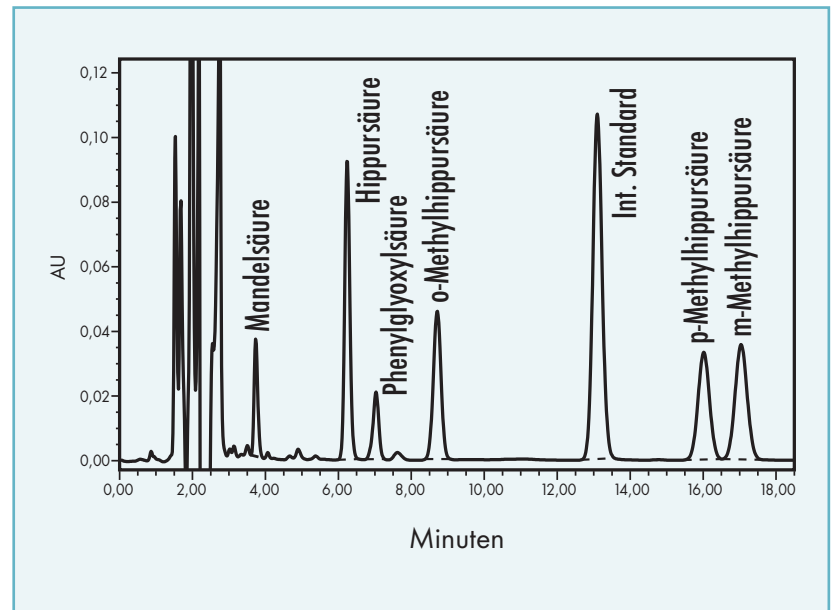
Xylene is a colourless liquid that catches on fire easily. Commercial or mixed xylenes are composed of three isomers (meta-, ortho- and para-xylene) and are extensively used in the chemical industry. Occupational exposure to xylene can be assessed by determining urinary concentrations of its metabolites, m-, o- and p-methylhippuric acids. The ACGIH has established a TLV-TWA for airborne xylene of 100 ppm (350 mg/m³), whereas end-of-shift level of the three acids should be less than 1500 mg/g creatinine. The reference values in

the general population are 0.59, 18.9, and 0.43 mg/g creatinine for meta-, ortho-, and para-methylhippuric acid, respectively. Since, as mentioned above, both general population and workers are usually exposed to mixtures of solvents, a simple and sensitive method for the quantification of even low urinary levels of their major metabolites is needed.

A reagent kit for the simultaneous determination of mandelic, hippuric, phenylglyoxylic, ortho-, meta-, para-methylhippuric acids has been developed by Chromsystems – Diagnostic by HPLC. The sample preparation is very simple and just 10 ml of urine sample are required. A chromatographic run of 18 minutes allows the separation of six metabolites which can be quantified by the inclusion of the internal standard. The results can be then compared with the BEIs established by the ACGIH.

This reagent kit is a time- and cost-saving tool for risk assessment related to the exposure to toluene, xylene, and styrene.

Chromsystems Reagenzienkit für die HPLC-Analytik von Hippursäure, Methylhippursäuren, Mandelsäure & Phenylglyoxylsäure im Urin



- > **Nur 10 µl Probenvolumen**
- > **Interner Standard**
- > **Einfache Probenvorbereitung**

Spezifikationen

Bestimmungsgrenze:	15 mg/l
Intraassay:	Vk < 2,5 %
Wiederfindung:	100 %
Analysendauer:	20 min.
Probenmaterial:	Urin
Probenstabilität:	bis 64 h (Raumtemp.)

	Bestimmungsgrenze:	Linearität:
Hippursäure	15	bis 18000 mg/l
Methylhippursäuren	15	bis 7000 mg/l
Mandelsäure	15	bis 4000 mg/l
Phenylglyoxylsäure	15	bis 1700 mg/l

BAT-Werte	
Hippursäure:	1500 mg/l
Σ Methylhippursäuren:	2000 mg/l
Mandelsäure:	400 mg/l
Phenylglyoxylsäure:	100 mg/l

Für die Chromsystems-HPLC-Analytik der arbeitsmedizinischen Parameter im Urin eignet sich jedes gängige isokratische HPLC-System mit UV-Detektion.

Probenvorbereitung

- > 1000 µl Internal Standard in ein beschriftetes Reaktionsgefäß vorlegen.
- > 10 µl Urin zugeben und kurz mischen (vortexen).
- > 5 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugieren.
- > 20 µl des Überstandes in das HPLC-System injizieren.

Bestellinformationen

Best.-Nr. Produkt

43000 Reagenzienkit für die HPLC-Analytik von Hippursäure, Methylhippursäuren, Mandelsäure und Phenylglyoxylsäure im Urin. Für 100 Bestimmungen.

Chromsystems-Kontrollen (lyoph.):

- 0141 Occupational Medicine Urine Control, Bi-level (I + II), 2 x 5 x 0,5 ml
- 0142 Occupational Medicine Urine Control, Level I, 5 x 0,5 ml
- 0143 Occupational Medicine Urine Control, Level II, 5 x 0,5 ml

Olanzapin, Quetiapin und Promazin: HPLC-Analytik von Neuroleptika

Neuroleptika sind Psychopharmaka, die hauptsächlich zur Behandlung von Schizophrenien und Manien eingesetzt werden, wobei es sich nicht um eine Therapie im eigentlichen Sinne handelt, sondern um die Linderung der Psychosesymptome. Dadurch soll den Betroffenen auch eine soziale Reintegration ermöglicht werden. 1952 trat diese Substanzgruppe mit der Entdeckung des Chlorpromazins auf die Bühne der Psychopharmaka und hat durch intensive Forschung eine substantielle Bereicherung erfahren. Der Wirkungsmechanismus der Neuroleptika beruht auf der Manipulation der synaptischen Erregungsübertragung (1,2,3).

Im zentralen Nervensystem spielen sieben synaptische Botenstoffe die größte Rolle: Dopamin, Noradrenalin, Serotonin, Acetylcholin, γ -Aminobuttersäure sowie Glutaminsäure und Glycin. Anhand der Hemmung unterschiedlicher Botenstoffe und unterschiedlicher Nebenwirkungen werden die Neuroleptika u.a. in zwei Klassen geteilt (4):

Zum einen die älteren, „klassischen“ Neuroleptika, welche ihre Wirkung vornehmlich durch die Blockade prä- und postsynaptischer Dopamin-Rezeptoren entfalten; zum anderen die jüngeren, „atypischen“ Neuroleptika, deren erster Vertreter Clozapin Anfang der 70er Jahre als Konsequenz der Suche nach weniger nebenwirkungsreichen Substanzen entdeckt wurde. Für die atypischen Neuroleptika spielen die Rezeptoren für Serotonin (ferner für Noradrenalin und Histamin) eine größere Rolle als die Dopamin-Rezeptoren (4).

Muskeln und Muskelgruppen gehen auf die Blockade der dopaminergen Rezeptoren zurück. Neben schnellen Nebenwirkungen wie Zungenkrämpfen sind auch allmählich auftretende Behinderungen der Beweglichkeit ähnlich dem Morbus Parkinson beschrieben. In den Tests mit dem Prototyp atypischer Neuroleptika Clozapin fiel auf, dass diese extrapyramidale Störungen minimal waren, vergleichbar mit dem Placebo-Niveau. Ferner schien man mit Clozapin die sogenannte Minussymptomatik von akuten Psychosen wie z.B. Antriebs- und Kommunikationsarmut effektiver zu reduzieren. Vor diesem Hintergrund boten sich die atypischen Neuroleptika in den ersten Jahren als ideale Mittel ohne nennenswerte Nebenwirkungen an (5,6).

Im Laufe der Zeit aber zeigte sich, dass auch atypische Neuroleptika ernstzunehmende Nebenwirkungen

bewirkt die gleichzeitige Gabe von Carbamazepin ebenso wie Rauchen eine Erniedrigung des Olanzapinspiegels durch Induktion des metabolisierenden Enzyms CYP1A2. Um die Effi-

mungsgrenzen, welche signifikant unter dem therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich liegen. Das Produkt befindet sich seit Mai 2004 auf dem Markt.

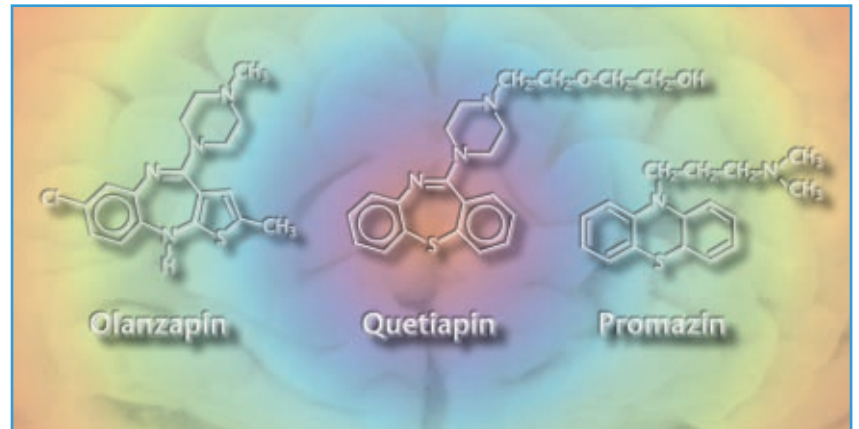


Abbildung: Strukturformeln von Olanzapin, Quetiapin und Promazin

Strukturell leiten sich Olanzapin und Quetiapin vom Clozapin ab, sie gehören also zur Gruppe der trizyklischen Neuroleptika. Quetiapin hat statt des Dibenzodiazepins einen Dibenzodiazepinring, Olanzapin besitzt einen Thienobenzodiazepinring als Grundkörper. Promazin ist ebenfalls ein Neuroleptikum aus der Gruppe der trizyklischen Neuroleptika und wird zu den Phenothiazinen gezählt.

zienz einer Psychopharmaka-Therapie für den Patienten zu steigern und gleichzeitig deren Sicherheit zu erhöhen, ist das Therapeutische Drug Monitoring der atypischen Neuroleptika notwendig. Darüber hinaus wird die Compliance des Patienten überprüft und so ein optimaler Therapieerfolg gewährleistet.

Der Chromsystems Reagenzienkit zur HPLC-Analytik von Olanzapin, Quetiapin und Promazin im Serum/Plasma zeichnet sich aus durch eine Probenvorbereitung mittels hochspezifischer Festphasenextraktion. Im Gegensatz zur online-Probenvorbereitung gelangt hier ein hochaufgereinigtes Eluat auf Vorsäule und Trennsäule. Dadurch ist nicht nur das Risiko von Interferenzen und unterlagernden Peaks reduziert, sondern die Säulenstandzeiten erhöhen sich erheblich. Darüber hinaus bietet die Festphasenextraktion optimale Voraussetzungen zur Automatisierung der Probenvorbereitung durch den ASPEC™ der Firma Gilson®, was einen hohen täglichen Probendurchsatz ermöglicht. Das Chromsystems-Produkt ist bislang der einzige kommerziell erhältliche Reagenzienkit, welcher auch die zuverlässige Messung des Olanzapin-Metaboliten Desmethylolanzapin ermöglicht. Chromsystems bietet neben dem im Kit enthaltenen Kalibrator auch zwei Gruppen von Kontrollen für die Qualitätssicherung an. Die robuste UV-Methode bietet Bestim-

Literatur:

- (1) Curr Med Chem. 2004 Feb;11(3):343-58. New antipsychotics and schizophrenia: a review on efficacy and side effects. Serretti A, De Ronchi D, Lorenzi C, Berardi D.
- (2) Curr Med Chem. 2004 Feb;11(3):279-96. Atypical antipsychotics: pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring and pharmacological interactions. Raggi MA, Mandrioli R, Sabbioni C, Pucci V.
- (3) J Clin Psychiatry. 2004 Sep;65 Suppl 9:3-8. Historical perspective on movement disorders. Friedman JH.
- (4) www.klein-kreienkamp-oehler.de/FG_Psychiatrie.htm, Neuroleptika, ihre Indikation, Wirkung, Risiken und Nebenwirkungen, Wirkungsweise
- (5) JAMA. 2003 Nov 26;290(20):2693-702. Effectiveness and cost of olanzapine and haloperidol in the treatment of schizophrenia: a randomized controlled trial. Rosenheck R, Perlick D, Bingham S, Liu-Mares W, Collins J, Warren S, Leslie D, Allan E, Campbell EC, Caroff S, Corwin J, Davis L, Douyon R, Dunn L, Evans D, Frecka E, Grabowski J, Graeber D, Herz L, Kwon K, Lawson W, Mena F, Sheikh J, Smelson D, Smith-Gamble V.
- (6) Pro Mente Sana. 2003 Jan, 16-18. Atypische Neuroleptika: Unwahrheiten für schlichte Gemüter. Lehmann P. www.antipsychiatrie.berlinet.de/artikel/gesundheit/atypische.htm
- (7) Int Clin Psychopharmacol. 2004 Jul;19(4):251-253. Weight gain during long-term treatment with olanzapine: a case series. Haberer EM, Rittmannsberger H.
- (8) Can J Psychiatry. 2004 May;49(5):343. Tardive dyskinesia associated with olanzapine in a neuroleptic-naïve patient with schizophrenia. Bhanji NH, Margolese HC.
- (9) Pharmacopsychiatry. 2004 May;37(3):131-4. Olanzapine- and clozapine-induced stuttering. A case series. Bar KJ, Hager F, Sauer H.
- (10) World J Biol Psychiatry. 2004 Apr;5(2):73-82. Atypical antipsychotics and diabetes mellitus. Schwenkreis P, Assion HJ.

Klassische Neuroleptika

Haloperidol (Haldol®)
Flupentixol (Fluanxol®)
Fluspirilen (Imap®)
Chlorprotixen (Truxal®)
Levomeprazin (Neurocil®)
Sulpirid (Dogmatil®)
Promazin (Sparine®)

Atypische Neuroleptika

Clozapin (Leponex®)
Olanzapin (Zyprexa®)
Risperidon (Risperdal®)
Ziprasidon (Zeldox®)
Amisulpirid (Solian®)
Quetiapin (Seroquel®)

Häufig verabreichte Neuroleptika

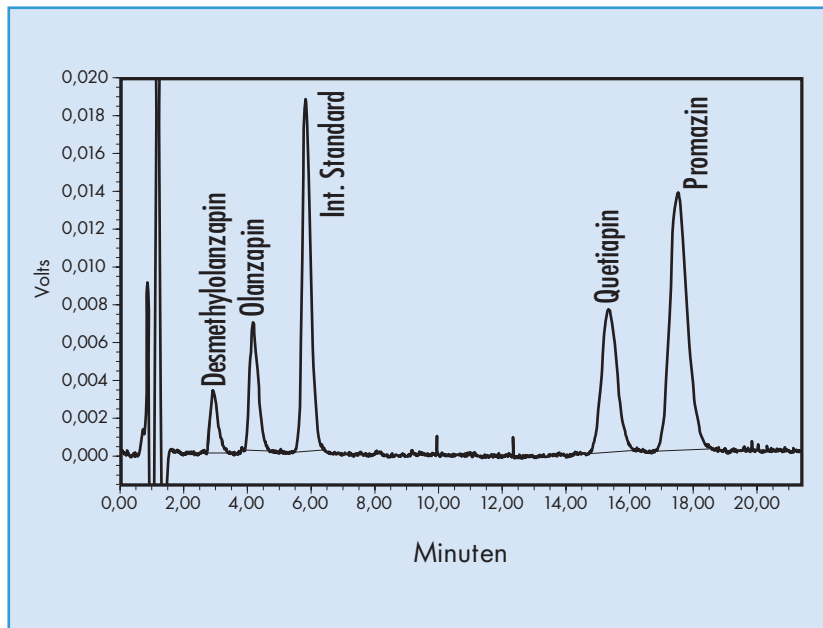
Die Psychiatrie unterscheidet die schnelle Wirkung von Neuroleptika, die sich als angstlösend und sedativ zeigt, von der nach Tagen und Wochen einsetzenden Wirkung gegen psychotische Symptome wie Halluzinationen, Wahnvorstellungen und Denkstörungen.

Zu den bekanntesten Nebenwirkungen der klassischen Neuroleptika gehören Probleme bei Bewegungsabläufen im Muskelsystem, die sogenannten extrapyramidalen Störungen. Diese unwillkürlichen Bewegungen (z.B. Akathisie/„Sitzunruhe“) bis hin zu krampfartigen Anspannungen von

auslösen können. Je nach Substanz handelte es sich hier um signifikante Gewichtszunahme während der Medikationeneinnahme, Veränderungen des Blutbildes (Agranulozytose) und das mit dem Anstieg des Prolaktinspiegels verbundene erhöhte Brustkrebsrisiko. Auch ist bekannt, dass nach langandauernder Verabreichung atypischer Neuroleptika die Gefahr psychotischer Erkrankung potenziert sein kann (7,8,9,10).

Der Plasmaspiegel der Neuroleptika streut z.T. individuell sehr stark und kann durch Comedikation oder andere Umstände beeinflusst sein; so

Chromsystems Reagenzienkit für die HPLC-Analytik von Olanzapin, Quetiapin und Promazin im Serum/Plasma



- > **Niedrige Bestimmungsgrenze**
- > **Robuste UV-VIS-Bestimmung**
- > **Metabolitenanalyse inbegriffen**

Spezifikationen

Olanzapin/Desmethylolanzapin
 Bestimmungsgrenze: 5 µg/l
 Linearität: bis 1000 µg/l (therapeut. Bereich: 20–80 µg/l)
 Intraassay: Vk = 3,5 %
 Wiederfindung: 95 %

Quetiapin

Bestimmungsgrenze: 10 µg/l
 Linearität: bis 3000 µg/l (therapeut. Bereich: 40–400 µg/l)
 Intraassay: Vk = 3,0 %
 Wiederfindung: 90 %

Promazin

Bestimmungsgrenze: 5 µg/l
 Linearität: bis 3000 µg/l (therapeut. Bereich: 100–500 µg/l)
 Intraassay: Vk = 4,0 %
 Wiederfindung: 80 %
 Analysendauer: < 20 min

Für die Chromsystems-HPLC-Analytik von Olanzapin im Serum/Plasma eignet sich jedes gängige isokratische HPLC-System mit UV-VIS-Detektor.

- säule geben. Probe vollständig durchzentrifugieren/-saugen, Durchlauf verwerfen.
- > Nacheinander 1 ml Wash Buffer 1 und Wash Buffer 2 durch die Probenvorbereitungssäule zentrifugieren/-saugen, Durchlauf verwerfen.
 - > Mit 400 µl Elution Buffer eluieren.
 - > 50 µl Eluat in das HPLC-System injizieren.

Bestellinformationen

Best.-Nr. Produkt
 26000 Reagenzienkit für die HPLC-Analytik von Olanzapin, Quetiapin und Promazin im Serum/Plasma, für 100 Bestimmungen

Probenvorbereitung

- > Die Probenvorbereitungssäule mit jeweils 1 ml Equilibration Buffer 1 und Equilibration Buffer 2 konditionieren.
- > 100 µl Internal Standard und 1 ml Probe auf die Probenvorbereitungssäule geben.

Chromsystems-Kontrollen (lyoph.):

0147 Olanzapine Serum Control, Bi-Level (I + II), 2 x 5 x 5 ml
 0148 Olanzapine Serum Control, Level I, 10 x 5 ml
 0149 Olanzapine Serum Control, Level II, 10 x 5 ml

Porphyrien

Die Notwendigkeit zum Porphyrin-profiling

Das Häm-Molekül ist eine eisenhaltige prosthetische Gruppe vieler Proteine wie z.B. des Hämoglobins, Myoglobins und der Cytochrome, seine Bedeutung liegt in der Sauerstoff-Bindungs-kapazität. Häm wird in einer achtstufigen Reaktionskette aus Succinyl-Coenzym A und Glycin gebildet. Die beiden Hauptorte der Häm-Biosynthese sind erythroide Zellen (Vorstufen der Erythrozyten) und die Hepacyten der Leber. An der Synthese im eigentlichen Sinne sind acht Enzyme beteiligt, welche die Häm-Vorstufemoleküle, die als Porphyrine bezeichnet werden, sukzessive in Häm überführen. Die Synthese dieser Enzyme kann durch genetische Defekte beeinträchtigt sein, wobei diese Mutationen erblich sind. Fällt eines der Enzyme aus, kommt es zur Anhäufung von Porphyrinen. Diese krankhafte Akkumulation wird als Porphyrie bezeichnet und hat unterschiedliche Formen (Tabelle).

Die häufigste akute Porphyrie geht auf Uroporphyrinogen-Synthase-Mangel zurück. Symptome dieser

KRANKHEIT	ENZYMSTÖRUNG	VERLAUF
Porphobilinogensynthase-Defekt-Porphyrie	Porphobilinogen-Synthase	akut
Akute intermittierende Porphyrie	Uroporphyrinogen-Synthase	akut
Kongenitale erythroetische Porphyrie (Morbus Günther)	Uroporphyrinogen-Cosynthase	
Porphyria cutanea tarda	Uroporphyrinogen-Decarboxylase	chronisch
Hereditäre Coproporphyrie	Coproporphyrinogen-Oxidase	akut
Porphyria variegata	Protoporphyrinogen-Oxidase	akut
Protoporphyrie	Ferrochelatase	

Die primären erblichen Porphyrien

Krankheit sind anfallsartige Koliken und neurologische Funktionsstörungen. Andere Porphyrien betreffen die Haut (z.B. Photodermatose) oder erzeugen neuroviszerale Symptome (z.B. Bauchkrämpfe, Herz- Kreislaufstörungen, Neuropathien).

Da sich die Krankheitsbilder stark ähneln, ist eine exakte Diagnosestellung notwendig. Die Identifizierung des Porphyrietyps ist möglich durch

eine Differentialdiagnose, die feststellt, welches Porphyrin akkumuliert wird. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass vor allem in akuten Situationen, therapeutisch richtig eingegriffen wird.

Der Chromsystems-HPLC-Reagenzienkit zur Analytik der Porphyrine im Urin dient zur Erstellung des kompletten Profils aller, für eine Differentialdiagnostik relevanten urinären

Porphyrine. Dazu ist ein binäres Gradienten-HPLC-System mit Fluoreszenz-Detektion notwendig. Mit einer Analysenzeit von 18 Minuten ermöglicht das Kit eine hochspezifische und schnelle Untersuchung. Das Produkt zeichnet sich ferner aus durch den internen Standard, der nach ca. 9 Minuten mittig im Chromatogramm eluiert. Damit können analytische Schwankungen besser kompensiert werden, als bei Verbindungen, die erst nach Ablauf des Gradienten eluieren. Eine Oxidation des Probenurins ist nicht notwendig, da die Porphyrinogene bereits spontan durch den Luft-sauerstoff in die fluoreszierenden Porphyrine oxidiert werden. Zwei unterschiedliche Levels von Kontrollen zur Qualitätssicherung komplettieren das Produkt.

Bestellinformationen

Best. Nr. Produkt
 44000 Reagenzienkit
 44100 HPLC-Säule
 0145 Kontrolle Level I
 0146 Kontrolle, Level II

Einblicke Chromsystems

Teil 1: Die Abteilung Lager/Versand



Liebe Leserinnen und Leser, mit unserer neuen Artikelreihe „Einblicke Chromsystems“ wollen wir Ihnen Chromsystems und auch einiges von den Vorgängen in unserer Firma näher bringen. In jeder Ausgabe des DIALOG wird eine unserer Abteilungen näher betrachtet werden, von der Auftragsbearbeitung, Versand/Lager, der Forschung und Entwicklung, über die Produktion und das Qualitätsmanagement bis zu Vertrieb und Marketing. Kurzum, wir laden Sie ein zu einem Rundgang durch unsere Firma.

Willkommen bei Chromsystems.

Die Abteilung Versand/Lager

Im Souterrain der Heimbürgstrasse 3 befinden sich Lager und Versand der Firma Chromsystems. Als letzte Instanz aller Prozesse des Unternehmens ist der Versand für die korrekte Zusammenstellung des Produkts und seine Auslieferung zuständig und prägt dadurch das Erscheinungsbild der Firma mit. In sechzig Länder liefert Chromsystems seine Produkte, und der Versand hat sich in dreizehn Jahren viel Erfahrung zueigen gemacht, um Rücksicht zu nehmen auf verschiedene nationale Details. Eine korrekte und pünktliche Lieferung steht für uns im Vordergrund, man-

nigfaltige Einfuhrbestimmungen auf unterschiedlichen Kontinenten müssen befolgt werden, und dabei spielt Organisation eine wichtige Rolle. Ein ankommender Auftrag wird in 95% der Fälle am selben Tag bearbeitet, das heißt gepackt und verschickt, und darauf ist unsere Versandabteilung stolz.

Frau Ursula Kuc leitet die Aktivitäten des Lagers seit sieben Jahren, sie kennt jedes Produkt und jede Verpackungseinheit, und wenn Chromsystems sein Versprechen hält, Sondergrößen und abweichende Abfüllmengen termingerecht in Europa oder Übersee abzuliefern, dann steckt meistens die Organisation von Frau Kuc und ihren Kollegen dahinter. Dass eine straffe, zeitlich kalkulierte Routine, bei der es auf verantwortliches Arbeiten ankommt, das Arbeitsklima nicht belastet, zeigen die Lagerkollegen jeden Tag, denn jede Anfrage wird freundlich empfangen und ist willkommen, auch wenn einmal über die Tageskapazität hinaus gearbeitet werden muss. Mit ihren Kolleginnen und Kollegen ist Frau Kuc über die Kitkonfektionierung und den Versand hinaus auch für eine Reihe weiterer Aufgaben verantwortlich: hausinterne Warenannahme

und Warenverteilung werden genauso bewerkstelligt wie der Einkauf, die Führung des hauseigenen Rohstofflagers, Gerätewartung sowie Produktion.

Der Umzug in die neuen Räumlichkeiten im Juli 2002 hat auch für das Lager viele Vorzüge mit sich gebracht. Die Aufbewahrungskapazitäten für fertige Produkte wurden vervierfacht, auch das Rohstofflager bietet mehr Raum. Es stehen doppelt so viele Ablagen zur Kitkonfektionierung zur Verfügung, die Mitarbeiter sind besser an das EDV-Netz der Firma angeschlossen, die Räume sind hell und freundlich und für jeden Mitarbeiter stehen persönliche Ablageschränke bereit. Auch in der Zukunft erwartet die Abteilung Neuerungen, weitere Automatisierung und Ausweitung der elektronischen Datenverarbeitung.

Wenn Sie in der nächsten Zeit ein Paket mit Ihrer neuesten Chromsystems-Lieferung erhalten, wissen Sie jetzt, wer dahinter steckt.



Termine

Im 2. Halbjahr 2004 ist Chromsystems auf folgenden internationalen und nationalen Messen vertreten:

8.–11. Juni 2004
MedLab 2004,
Padova, Italien

27.–29. Juli 2004
AACC Clinical Lab Expo 2004,
Los Angeles, USA

1.–3. September 2004
TDM and Pharmacogenetics of Psychotropic Drugs,
Lausanne, Schweiz

13.–15. September 2004
International Conference on Vitamins 2004, Pardubice, Tschechien

7.–9. Oktober 2004
II. Nationales HPLC Symposium,
Ankara, Türkei

4.–6. November 2004
Journées International de Biologie,
Paris La Défense, Frankreich

24.–27. November 2004
Medica 2004, Messe Düsseldorf

News

Chromsystems wird bis August 2004 die Zertifizierung gemäß DIN EN ISO 9001: 2000 und DIN EN ISO 13485: 2003 erhalten.

Impressum

Herausgeber:
Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH
Heimbürgstrasse 3
81243 München

Telefon: +49 (0) 89 189 30 200
Telefax: +49 (0) 89 189 30 299
eMail: mailbox@chromsystems.de

Redaktion:
Gabriel Erlenfeld

Gestaltung:
Fred Lengnick

Druck:
OrtmannTeam, München

Ausgabe Juli 2004