

DIN 58989

ICS 11.100.30

**Hämostaseologie –
HPLC-MS-Methoden zur Quantifizierung von direkten oralen
Antikoagulanzen (DOAC) –
Rivaroxaban;
Text Deutsch und Englisch**

Haemostaseology –
HPLC-MS methods for the quantification of direct oral anticoagulants (DOAC) –
Rivaroxaban;
Text in German and English

Hémostase –
Méthodes HPLC-MS pour la quantification des anticoagulants oraux directs (AOD) –
Rivaroxaban;
Texte en allemand et anglais

Gesamtumfang 24 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich.....	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Symbole und Abkürzungen.....	6
5 Allgemeines	6
5.1 Alternative Messverfahren	6
6 Quantifizierung von Rivaroxaban in Plasma durch HPLC-MS/MS.....	7
6.1 Allgemeines	7
6.2 Physikochemische Eigenschaften von Rivaroxaban.....	7
6.3 Referenzpräparat	7
6.4 Blutentnahme, Transport, Prozessierung und Aufbewahrung	8
6.5 Stabilität.....	8
6.6 Qualitätskontrolle und Kalibrierungsproben.....	9
6.7 Probenvorbereitung.....	9
6.8 Kalibrierung und Datenauswertung.....	10
6.9 Präzision und Genauigkeit.....	10
6.10 Spezifität und Interferenz	10
Literaturhinweise.....	11

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-05 AA „Hämostaseologie“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed) erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Einleitung

Rivaroxaban [rINN] ist ein oraler, hoch-selektiver, direkter Faktor Xa (FXa) Inhibitor. FXa ist ein wichtiges Zielmolekül zur Prophylaxe und Therapie von thromboembolischen Erkrankungen, da es eine zentrale Komponente der Blutgerinnungskaskade ist und eine Schlüsselrolle bei zahlreichen Phasen des Gerinnungssystems spielt [1], [2]. Die Inhibition von FXa unterbricht den intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Blutgerinnungskaskade und hemmt sowohl die Bildung von Thrombin als auch die Entstehung von Thromben. Der gerinnungshemmende Effekt von Rivaroxaban wurde in zahlreichen klinischen Studien belegt [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9].

Aufgrund ihrer vorhersagbaren pharmakokinetischen (PK)/pharmakodynamischen (PD) Profile benötigen Rivaroxaban und andere erhältliche orale direkte Gerinnungshemmer keine routinemäßige Koagulationsüberwachung. Allerdings gibt es bestimmte Situationen, bei denen eine Messung der Plasmakonzentrationen dieser Medikamente notwendig oder wünschenswert ist [10], [11].

Dieses Dokument stellt die Methode zur Quantifizierung von Rivaroxaban in humanen Plasmaproben vor. Die Anweisungen dienen als Referenzmethode für diesen Zweck.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt Methoden zur Konzentrationsbestimmung des oralen direkten Gerinnungshemmers (en: direct oral anticoagulant, DOAC) Rivaroxaban in humanen Plasmaproben fest.

Dieses Dokument gilt sowohl für Entwickler und Hersteller von Rivaroxaban-spezifischen Assays, medizinische Labore, als auch für Institute und kommerzielle Organisationen im Bereich biomedizinischer Forschung.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: unter <https://www.din.de/go/din-term>
- DKE-IEV: unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Umgebungstemperatur

unregulierte Temperatur der Umgebungsluft

[QUELLE: DIN 58905-1:2016-12, 3.1]

3.2

Raumtemperatur

Temperatur, die für die Anwendung dieses Dokuments als 18° C bis 25° C definiert ist

[QUELLE: DIN 58905-1:2016-12, 3.4]

3.3

Probe

ein Teil oder mehrere Teile, das (die) einer Primärprobe entnommen wird (werden)

[QUELLE: DIN EN ISO 15189:2014-11, 3.24, modifiziert — Das Beispiel wurde nicht übernommen.]

3.4

Primärprobe

Untersuchungsmaterial

entnommene Teilmenge einer Körperflüssigkeit (hauptsächlich Blut und Plasma), die zur Untersuchung, Studie oder Analyse einer oder mehrerer Werte oder Eigenschaften dient, damit die Ergebnisse für die Gesamtmenge angenommen werden können

[QUELLE: DIN EN ISO 15189:2014-11, 3.16, modifiziert — Die Worte „Atemluft“, „Haare“ und „Gewebe“ in der Definition wurden ersetzt durch „(hauptsächlich Blut und Plasma)“ und die drei Anmerkungen zum Begriff wurden gelöscht.]

3.5

Stabilität

Fähigkeit eines Probenmaterials, unter bestimmten Lagerungsbedingungen, einen festgelegten Eigenschaftswert innerhalb spezifischer Grenzwerte für einen definierten Zeitraum beizubehalten

[QUELLE: ISO Guide 30:2015, 2.1.15, modifiziert — das Wort „Referenzmaterial“ wurde ersetzt durch „Probenmaterial“ und die Anmerkung 1 zum Begriff wurde gelöscht.]

4 Symbole und Abkürzungen

CAS	Chemical Abstracts Service
DOAC	oraler direkter Gerinnungshemmer
FXa	Faktor Xa
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LLOQ	untere Quantifikationsgrenze (en: lower limit of quantification)
MW	Molekulargewicht
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
QC	Qualitätskontrolle (en: quality control)
rINN	Empfohlener Internationaler Freiname (en: recommended international non-proprietary name)

5 Allgemeines

In gesunden Probanden kann die Plasmakonzentration von Rivaroxaban oberhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) normalerweise bis zu 48 h bis 72 h nach Verabreichung gemessen werden, abhängig von der verabreichten Dosis [4]. Die Konzentration erreicht ihr Maximum nach 2 h bis 4 h nach Verabreichung (Mittelwert t_{max}) mit anschließendem biphasischen Abklingen.

Zur Bestimmung der humanen Plasmaspiegel von Rivaroxaban ist ein sensitives und spezifisches analytisches Messverfahren notwendig. Das Verfahren sollte die Quantifizierung des unveränderten Medikaments erlauben, sowohl alleine als auch in Anwesenheit gleichzeitig verabreichter Arzneimittel. Im klinisch relevanten Dosierungsbereich liegt die Plasmakonzentration von Rivaroxaban bei bis zu 500 µg/l [12]. Proteinpräzipitation in Plasmaproben mit anschließender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (en: High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) erscheint als Assay-Technologie der Wahl, um einen ausreichend sensitiven und robusten Hochdurchsatz von Probenmessungen bei höchster Spezifität zu erreichen.

5.1 Alternative Messverfahren

Das in Abschnitt 6 beschriebene Messverfahren wurde im relevanten klinischen Konzentrationsbereich validiert, unter Beachtung der aktuellen Richtlinien zur bioanalytischen Assayvalidierung [13]. Außerdem wurde sie im klinischen Entwicklungsprogramm von Rivaroxaban durchgehend eingesetzt und diente somit als Grundlage zur Etablierung des pharmakokinetischen (PK)-Profils [12]. Infolgedessen kann sie als Referenzstandard zur Bestimmung von Rivaroxaban Plasmaspiegeln angesehen werden.

Alternative Bestimmungsmethoden (z. B. chromogene anti-FXa Assays mit spezifischen Kalibratoren und Kontrollen) dürfen ebenfalls eingesetzt werden, sollten jedoch gegen den hier vorgestellten Ansatz validiert werden: Anderenfalls sollte deren klinische Relevanz in separaten Studien gezeigt werden.

6 Quantifizierung von Rivaroxaban in Plasma durch HPLC-MS/MS

6.1 Allgemeines

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Blutplasma und der physikochemischen Eigenschaften von Rivaroxaban muss besondere Sorgfalt aufgewendet werden, um eine geeignete Probenvorbereitungs-/Aufreinigungsmethode erfolgreich mit einer passenden Separations- und Detektionsmethode zu kombinieren. Eine detaillierte Beschreibung der HPLC-MS/MS-basierten Referenzmethode zur Bestimmung von Rivaroxaban in Plasma bietet die Publikation von Rohde et al., 2008 [14]. Diese Methode basiert auf einer einfachen und kostengünstigen Präzipitation von Plasmaproteinen mit anschließender Zentrifugation und direkter Injektion des Plasmaüberstands in das HPLC-MS/MS System. In den folgenden Abschnitten werden einige Details zu diesem Ansatz bereitgestellt, in Bezug auf den Umgang mit Probenmaterial, Probenstabilität und Qualitätskontrolle. Andere technische Messanordnungen dürfen ebenfalls angewendet werden, sollten jedoch durch geeignete Validierungsstudien überprüft werden.

6.2 Physikochemische Eigenschaften von Rivaroxaban

Rivaroxaban (CAS Registrierungsnummer 0366789-02-8, siehe Bild 1) ist eine weiße bis gelbliche, kristalline Substanz, die praktisch unlöslich in Wasser, Pufferlösung pH 7, 0,1 M HCL, 2-Propanol, Toluol und n-Heptan ist. In Ethylacetat, Methanol und Ethanol ist Rivaroxaban sehr wenig löslich; während es in Aceton, Acetonitril, Dichlormethan und Polyethylenglykol 400 wenig löslich, jedoch in N,N-Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidon und Dimethylsulfoxid löslich ist. Eine Bestimmung des Rivaroxaban pKa-Wertes ist aufgrund der mangelnden Wasserlöslichkeit nicht möglich. Eine gesättigte Lösung in Wasser hat einen pH-Wert von 5,2. Der Verteilungskoeffizient in Octanol/Wasser bei Umgebungstemperatur ist $\log P_{o/w} = 1,5$.

6.3 Referenzpräparat

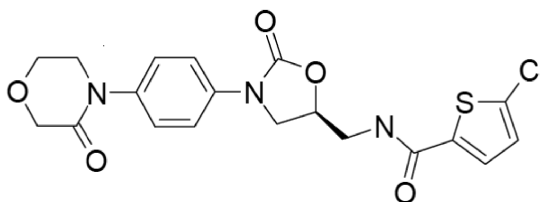


Bild 1 — Chemische Struktur von Rivaroxaban

5-Chlor-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophen-2-carboxamid

CAS Nr. 0366789-02-8, MW 435,9 g/mol

Ein Isotop-markiertes Präparat sollte als interner Standard benutzt werden, z. B. [2H5,15N]rivaroxaban, MW 441,9 g/mol, siehe Bild 2.

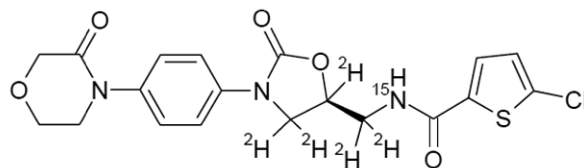


Bild 2 — Chemische Struktur von [2H5,15N]rivaroxaban

[2H5,15N]5-Chlor-N-(((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)-thiophen-2-carboxamid

6.4 Blutentnahme, Transport, Prozessierung und Aufbewahrung

Wie von Rohde [14] beschrieben, sollte die Gesamtdauer zwischen Blutprobenentnahme bei Raumtemperatur und finaler Probenaufbewahrung einen Zeitraum von 120 min nicht überschreiten. Für aufgestockte (gespikte) Proben sind zusätzliche Bedingungen beschrieben (siehe Tabelle 1). Blutproben werden in Lithium Heparin-Röhrchen gesammelt, für 10 min bei $1\,600 \times g$ und Umgebungstemperatur zentrifugiert, anschließend wird das Plasma in ein neues Röhrchen überführt (Polypropylen) und bei $\leq -15\text{ °C}$ gelagert. Andere Bedingungen dürfen verwendet werden, sollten jedoch durch Validierungsstudien belegt werden.

6.5 Stabilität

Rivaroxaban ist in vielen unterschiedlichen Matrizen und unter verschiedenen Bedingungen stabil. Die Stabilität wurde bestätigt indem die Konzentrationsveränderung während eines Beobachtungszeitraums im Falle von biologischen Matrixproben weniger als $\pm 15\%$ betrug, und im Falle von Vorrats- und Arbeitslösungen weniger als $\pm 5\%$ betrug. Alle Matrizes sollten in Polypropylenröhrchen gelagert werden, während Plasmaüberstände, Vorratslösungen und Arbeitslösungen, in Glasflaschen- oder Röhrchen gelagert werden sollten.

Tabelle 1 — Rivaroxaban Stabilität in aufgestockten/gespikten Proben

Matrix	Temperatur	Lagerbedingungen	Zeitraum	Konzentration ^a µg/l	Ergebnis
Plasmaüberstand Protein- präzipitation	ungefähr 9 °C	Autosampler	7 Tage	1,4; 267 ^a	stabil
Vorratslösung in Acetonitril	$\leq 8\text{ °C}$	Kühlschrank	5 Monate	275 mg/l ^b	stabil
Arbeitslösung in Acetonitril	$\leq 8\text{ °C}$	Kühlschrank	5 Monate	5; 500	stabil
Vollblut (Citrat)	Umgebungs- temperatur	Tageslicht (Fensterbank)	24 h	10; 100	stabil
	$\leq 8\text{ °C}$	Tiefkühler	24 h	10; 100	stabil
Vollblut (Heparin)	Umgebungs- temperatur	Tageslicht (Fensterbank)	24 h	10; 100	stabil
	$\leq 8\text{ °C}$	Kühlschrank	24 h	10; 100	stabil
Plasma (Citratplasma)	Umgebungs- temperatur	Tageslicht (Fensterbank)	24 h	12; 720	stabil
	$\leq 8\text{ °C}$	Kühlschrank	24 h	12; 720	stabil