

Aus dem Zentrum der Pharmakologie, Therapeutische Wirkspiegelbestimmung /
Pharmakologie im Laborzentrum der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dietmar Fischer
Kommissarische Leitung Therapeutisches Drug Monitoring:
Prof. Dr. Thomas Streichert

Therapeutisches Drug Monitoring der Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Canrenon und Hydrochlorothiazid bei Patienten mit therapieresistenter arterieller Hypertonie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jan-Ole Johannsen
aus Leer

promoviert am 08. Oktober 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. U. Fuhr
2. Gutachter: Professor Dr. med. C. Müller

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller,

Herrn Dr. med. Martin Wiesen,

sowie

Herrn Professor Dr. med. Hannes Reuter,

Herrn Fabian Hoffmann

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller von mir selbst ausgeführt worden.

Die ausgewerteten klinischen Plasmaproben wurden vom Herzzentrum der Klinik für Innere Medizin der Universität Köln unter Prof. Dr. Hannes Reuter und in Zusammenarbeit mit Fabian Hoffmann akquiriert und zur Verfügung gestellt.

Die Verarbeitung und Auswertung der Plasmaproben ist nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller und unter Aufsicht von Herrn Dr med. Martin Wiesen von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.08.2023

Unterschrift:

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carsten Müller bedanken, der mir diese Promotion unter seiner Anleitung überhaupt erst ermöglicht hat und in den letzten Jahren stets mit Rat und Tat duldsam zur Seite stand.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hannes Reuter, welcher das Dissertationsthema zusammen mit Herrn Prof. Dr. med. Carsten Müller initiiert und die Zusammenarbeit mit der medizinischen Klinik zur klinischen Anwendung der Methode möglich gemacht hat. An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei Fabian Hoffmann für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Anbindung der Patienten.

Auch bei Prof. Dr. med. Thomas Streichert als Leiter des Labors für Therapeutisches Drug Monitoring, sowie bei Priv. Doz. Dr. med. Martin Wiesen als kompetenten Ansprechpartner und der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für den herzlichen Empfang, die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und vielen wertvollen Anregungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt schlussendlich meiner Familie, meiner Verlobten und meinen Freunden für die dauerhafte und uneingeschränkte Unterstützung und immerwährenden Zuspruch über den gesamten Zeitraum der Doktorarbeit. Danke!

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	7
2. EINLEITUNG	9
2.1 Arterielle Hypertonie	9
2.2 Therapieprinzipien der arteriellen Hypertonie	10
2.3 Pharmakokinetische Eigenschaften der Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Canrenon und Hydrochlorothiazid	12
2.4 Therapieresistente Arterielle Hypertonie	15
2.4.1. Definition, Prävalenz, Ätiologie der therapieresistenten Hypertonie	15
2.4.2. Pseudoresistenter Hypertonus	16
2.4.3. Diagnostik der resistenten Hypertonie	17
2.4.4. Therapie der resistenten arteriellen Hypertonie:	19
2.5 Medikamenten-Adhärenz	20
2.6 Therapeutisches Drug Monitoring	21
2.7 Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrikopplung: LC-MS/MS	22
2.7.1. Flüssigkeitschromatographie	23
2.7.2. Massenspektrometrie	24
2.7.3. Methodvalidierung	27
2.7.4. Reduktion und Kompensation von Matrixeffekten: Probenvorbereitung und Interne Standardisierung	29
2.8 Problemstellung und Zielsetzung Arbeit	30
3. PUBLIKATION	32
3.1 Zusammenfassung	32
3.2 Originalpublikation	33
4. DISKUSSION	43
4.1 Therapeutisches Drug Monitoring von Antihypertensiva	43

4.2	Methoden der Adhärenz-Kontrolle	47
4.3	Multianalytische LCMS/MS Methoden - ein Vergleich	52
5.	QUELLENVERZEICHNIS	56
6.	ANHANG	66
6.1	Tabellenverzeichnis	66
6.2	Supplement zur Publikation	66

Abkürzungsverzeichnis

ABPM	ambulante Blutdruckmessung, engl. ambulatory blood pressure monitoring
AML	Amlodipin
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
CAN	Canrenon
CI	Chemische Ionisation
CKD	Chronische Nierenerkrankung
CV	Variationskoeffizient, engl. coefficient of variation
CYP	Cytochrom P450
DOT	Direkte Beobachtung der Medikamenteneinnahme, engl. Direct observed Therapy
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
EI	Elektronenstoßionisation
ESC	European Society of Cardiology
ESI	Elektrospray-Ionisation
FDA	Food and Drug Administration
HBPM	häusliche Blutdruckmessung, engl. home blood pressure monitoring
HCT	Hydrochlorothiazid
IS	Interner Standard
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LLE	Flüssig Flüssig Extraktion, engl. Liquid Liquid Extraction
LLOQ	Untere Bestimmungsgrenze, engl. lower limit of quantification
LOD	Untere Nachweisgrenze, engl. limit of detection
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MAQ	Morisky-Adhärenz-Fragebogen
MEMS	Medikamenten-Ereignis-Überwachungssysteme, engl. Medication Event Monitoring Systems
MET	Metoprolol
MMAS	Morisky-Medikations-Adhärenz-Skala
MPR	Anzahl der Tage mit ausgegebener Medikation im Verhältnis zur Zahl der Tage der Beobachtungsdauer, engl. Medication Possession Ratio
MRA	Mineralokortikoid-Rezeptorantagonist
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ Cl ⁻	Natriumchlorid
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OBP	Praxisblutdruck, engl. office blood pressure
p.o.	peroral
POEMS	Polypharmazie-Überwachungssysteme
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RR	Blutdruck
SB	Systolischer Blutdruck
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Festphasenextraktion, engl. solid phase extraction
SRM	Selected reaction monitoring
T ½	Halbwertszeit
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography

1. Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie beschreibt eine Erkrankung, bei der es zur chronischen Erhöhung des Blutdruckes im arteriellen Gefäßsystem mit systolischen Blutdruckwerten über 140 mmHg sowie diastolischen Werten über 90 mmHg kommt. Sie ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit, mit steigender Prävalenz bei alternder Bevölkerung und gilt als eine der Erkrankungen in Deutschland mit der höchsten Morbidität und Mortalität. Somit besteht eine dringende Notwendigkeit der optimalen Therapie.

Neben diätetischen Ansätzen mit Lifestyleänderung und Sport, kommt der medikamentösen Therapie eine große Bedeutung zu. In vielen Fällen jedoch gestaltet sich trotz bestehender Mehrfachtherapie mit mehr als drei Wirkstoffen eine Einstellung des Blutdruckes schwierig, so dass von einer Therapieresistenz gesprochen wird. Die Folge ist neben einer Erweiterung der Therapie um Reservepräparate wie Spironolacton die Durchführung chirurgischer Interventionen mittels renale Sympathikusdenervation oder Barorezeptoraktivierungstherapie. Von der Therapieresistenz abzugrenzen ist ein pseudoresistenter Hypertonus mit vermeidbar hohen Blutdruckwerten. Eine mangelnde Medikamentenadhärenz ist eine der Hauptursachen für eine Pseudotherapieresistenz. Ihre Prävalenz wird im Rahmen der antihypertensiven Therapie in verschiedenen Studien auf ca. 30-50% geschätzt.

Es gibt verschiedene direkte und indirekte Methoden zur Überprüfung der Adhärenz. Indirekte Methoden gelten als leichter in der Anwendung und weniger zeitaufwendig, direkte Methoden hingegen als objektiv und präziser. Als eine der genauesten und verlässlichsten Methoden gilt die Messung von Medikamentenspiegeln im Blut. Die quantitative Bestimmung von Medikamentenspiegeln mittels Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wird hierfür als Goldstandard gewertet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer robusten und sensitiven multi-analytischen LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Canrenon als Metabolit von Spironolacton sowie Hydrochlorothiazid in humanem Plasma, welche sich durch einfache Probenvorbereitung, kurze Analysezeiten und geringen Materialaufwand für die Integration in den klinischen Alltag eignet. Besonderheiten der vorliegenden Methode beziehen sich auf die Identifikation von Ionensuppressionseffekten und deren Kompensation durch Verwendung unterschiedlicher isotope markierter interner Standards sowie die Integration von Canrenon als Analyt.

Die Methode konnte erfolgreich in den klinischen Alltag der Universitätskliniken Köln integriert werden. Es erfolgten 81 Messungen von Plasmakonzentrationen aus einer Patientengruppe mit schwer einstellbaren Blutdruckwerten. Anhand der erhobenen Werte konnte ein signifikanter Anteil der Patienten als non-adhärenz identifiziert werden. Der Prozentsatz von Patienten

mit einem non-adhärenten Einnahmeverhalten lag bei 25% und korreliert weitestgehend mit in anderen Studien beschriebenen Ergebnissen.

Um unnötige Eskalationen der medikamentösen Therapie sowie gegebenenfalls sogar operative Interventionen zu vermeiden, kann die Durchführung von Medikamentenspiegelbestimmungen zur Adhärenz-Kontrolle sinnvoll sein. Die erhobenen Daten liefern wichtige Hinweise zur Verbesserung der Therapieadhärenz und zur Optimierung der antihypertensiven Behandlung. Erfolgt eine Besserung der Blutdruckwerte durch Steigerung der Adhärenz, können invasive Behandlungen, medikamentöse Therapieintensivierungen sowie zusätzliche Arztkontakte und Krankenhausaufenthalte aufgrund kardiovaskulärer Komplikationen vermieden und Kosten eingespart werden

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der vorgestellten Methodik liegen in der Integration in künftige klinische Studien zur Identifizierung von therapeutischen Referenzbereichen für Antihypertensiva sowie in der Erweiterung der Methodik um zusätzliche Analyten für eine noch kosteneffektivere Nutzung des TDM.

2. Einleitung

Zum Einstieg in die Thematik werden die theoretischen Grundlagen zur Arbeit erklärt. Ziel hierbei ist es, den Begriff der therapieresistenten Hypertonie im Kontext der arteriellen Hypertonie zu beleuchten. Hierfür wird zunächst das Krankheitsbild der arteriellen Hypertonie erläutert und die therapeutischen Möglichkeiten der arteriellen Hypertonie aufgeführt. In diesem Zuge werden exemplarisch die Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Hydrochlorothiazid und Spironolacton vorgestellt. Anschließend wird der Begriff der therapieresistenten arteriellen Hypertonie definiert und Ursachen sowie Behandlungsmöglichkeiten beschrieben. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Medikamentenadhärenz sowie dem Therapeutischen Drug Monitoring. Folgend wird die Funktionsweise der Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, als Goldstandard in der quantitativen Arzneimittelanalytik, erläutert und Aufbau sowie Validierung analytischer Massenspektrometrie-Methoden vorgestellt.

2.1 Arterielle Hypertonie

Die Arterielle Hypertonie beschreibt eine Erkrankung, bei der es zur chronischen Erhöhung des Blutdruckes im arteriellen Gefäßsystem kommt. Dies kann einerseits auf ein erhöhtes Herzzeitvolumen, andererseits auf einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand oder ein Zusammenspiel beider Faktoren zurückzuführen sein. Gemäß den Leitlinien der „European Society of Hypertension“ liegt eine manifeste arterielle Hypertonie bei systolischen Blutdruckwerten über 140 mmHg sowie diastolischen Werten über 90 mmHg vor ¹. Die arterielle Hypertonie hat eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung ² und ist die häufigste internistische Erkrankung ³. Die Prävalenz bei Erwachsenen in Europa liegt zwischen 30-45%, wobei bereits mehr als 60% der über 60-Jährigen betroffen sind ⁴. Dies zeigt eine zunehmend höhere Verbreitung der Erkrankung mit steigendem Alter. Dabei ist die arterielle Hypertonie in Deutschland die Erkrankung mit der höchsten Morbidität und Mortalität ⁵⁻⁷ und gilt als Hauptrisikofaktor für Herz-Kreislauf- und Nieren-Erkrankungen. Wesentliche Endorganschäden umfassen cerebrale ischämische und hämorrhagische Insulte, Herzinfarkte, Herzinsuffizienz sowie fortgeschrittene Niereninsuffizienz ⁸.

Definitionsgemäß wird in primäre (90%) sowie sekundäre (10%) arterielle Hypertonie unterteilt. Die primäre arterielle Hypertonie bezeichnet einen erhöhten Blutdruck, welcher nicht auf sekundäre Erkrankungen zurückzuführen ist und stellt somit eine Ausschlussdiagnose dar. Die Genese der primären arteriellen Hypertonie ist noch nicht geklärt, dennoch sind begünstigende Risikofaktoren bekannt, die vermehrt mit der Entstehung einer primären arteriellen Hypertonie einhergehen. Hierzu zählen vor allem ein höheres Lebensalter, Tabak- sowie Alkoholkonsum, Adipositas, eine hohe Kochsalzzufuhr, eine positive Familienanamnese sowie eine übermäßige psychische Belastung ³.

Die sekundäre arterielle Hypertonie tritt als Begleiterscheinung im Rahmen anderer Erkrankungen auf, beispielsweise beim Apnoe-Syndrom, endokrinen Störungen sowie strukturellen

Veränderungen der Niere, welche mit einer verringerten Nierenfunktion einhergehen. Auch als Nebenwirkung verschiedener Medikamente kann eine sekundäre Hypertonie entstehen. Die Therapie der primären arteriellen Hypertonie zielt auf eine langfristige Einstellung des Blutdruckes mittels Änderung der Lebensgewohnheiten sowie antihypertensiver Therapie ab. Bei der sekundären arteriellen Hypertonie hingegen steht die Therapie der Grunderkrankung im Vordergrund.

Tabelle 1: Einteilung der arteriellen Hypertonie gemäß ESC-Leitlinien 2018¹

	Systolisch (mmHg)	Diastolisch (mmHg)
Optimal	<120	<80
Normal	120–129	80–84
Hoch normal	130–139	85–89
Grad 1	140–159	90–99
Grad 2	160–179	100–109
Grad 3	≥180	≥110
Isolierte systolische Hypertension	≥140	<90

Grenzwerte gelten bei klinischer Messung am sitzenden, ruhenden Patienten. Die Klassifikation kann für alle Patienten älter als 16 Jahre verwendet werden.

2.2 Therapieprinzipien der arteriellen Hypertonie

Das Therapieregime der arteriellen Hypertonie ist abhängig vom Grad der Hypertonie, dem kardiovaskulären Risiko des Patienten sowie bereits bestehenden hypertensiven Organschäden.

Das individuelle kardiovaskuläre Risiko kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Zur Einschätzung des 10-Jahres-Risikos stehen daher verschiedene Risikokalkulatoren zur Verfügung, beispielsweise der PROCAM- sowie der ESC-Score³. Der PROCAM-Score bezieht sich auf das Risiko für sowohl tödliche als auch nicht tödliche kardiovaskuläre Ereignisse und umfasst die Parameter Alter, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, systolischen Blutdruck, Gamma-GT, Rauchen, Diabetes und familiäre Belastung⁹. Der ESC-Score hingegen prognostiziert nur arteriosklerotisch bedingte, tödliche Ereignisse in Abhängigkeit von systolischem Blutdruck, Diabetes, Alter, Geschlecht, Rauchverhalten und Cholesterin-Spiegel¹⁰. Generell werden jedoch Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen, einer höhergradigen

arteriellen Hypertonie (ab Grad 3), chronischen Nierenerkrankungen (CKD 3-5) sowie Diabetes Mellitus Typ 1 oder Typ 2, als Hoch- bis sehr Hochrisikopatienten eingestuft, was einer kardiovaskulären 10-Jahres-Mortalität von 5-10%, beziehungsweise $\geq 10\%$ entspricht.

Hypertensive Organschäden treten sehr mannigfaltig auf. Sie umfassen zum einen cerebrovaskuläre Erkrankungen (ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle, transitorische ischämische Attacken) sowie koronare Herzerkrankungen (Herzinfarkt, Angina Pectoris), Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und das Vorhandensein atheromatöser Plaques. Zum anderen kann es auch zu Einschränkungen der Nierenfunktion mit Mikroalbuminurie und verringerter extraglomerulärer Filtrationsrate kommen¹.

Gemäß den aktuellen ESC-Leitlinien liegt der primäre Zielblutdruck unter antihypertensiver Therapie bei $<140/90$ mmHg. Sollte dieser gut toleriert werden, ist in Folge eine Senkung $<130/80$ mmHg anzustreben, wohingegen ein Blutdruck $<120/80$ mmHg nicht empfohlen wird¹. Diese Grenzwerte können jedoch in Abhängigkeit von Begleiterkrankungen variieren. Studien zeigen, dass eine Senkung des systolischen Blutdruckes um 10 mmHg das Schlaganfallrisiko um bis zu 60%¹¹ und die Gesamtmortalität durch Hypertonie bedingte Ereignisse um 13% reduzieren kann¹².

Die Basistherapie jedes Hypertonie-Patienten umfasst eine Änderung des Lebensstils. Eine gesunde und bewusste Lebensweise kann das Auftreten einer arteriellen Hypertonie hinauszögern und verhindern, sowie bei Grad 1 Hypertonie eine therapeutische Alternative für den Einsatz von Medikamenten darstellen. Ausschlaggebend sind eine Restriktion der Salzzufuhr¹³, ein auf moderate Mengen beschränkter Alkoholkonsum sowie der ausgiebige Verzehr von Gemüse und Obst. Das Körpergewicht sollte auf Idealgewicht reduziert und dieses gehalten werden¹⁴. Physische Aktivität hat ebenfalls einen Blutdruck senkenden Effekt^{15,16}.

Zur medikamentösen Behandlung der arteriellen Hypertonie stehen fünf verschiedene Medikamentenklassen zur Verfügung. Diese beinhalten Beta-Blocker, Calciumkanal-Inhibitoren, Diuretika der Thiazid-Gruppe, sowie Thiazid-ähnliche Diuretika, ACE-Hemmer und Angiotensinrezeptor-Antagonisten. Je nach Schweregrad der Hypertonie und Risikoprofil erfolgt der Einsatz eines oder mehrerer Antihypertensiva in Kombination. Randomisierte Kontrollstudien haben gezeigt, dass, mit Ausnahme von ACE-Hemmern und Angiotensinrezeptor-Antagonisten, alle fünf Stoffklassen miteinander kombiniert werden können, ohne an therapeutischer Effektivität hinsichtlich der Blutdrucksenkung zu verlieren¹. Gemäß den ESC-Leitlinien 2018 sind dennoch Kombinationen zwischen ACE-Hemmern oder Angiotensin-Antagonisten mit Calciumkanalblockern oder Thiazid-Diuretika zu bevorzugen, da diese als sogenannte „single pill“ in verschiedensten Dosierungen zur Verfügung stehen. Somit werden zum einen Verschreibung, Therapie und Dosissteigerung vereinfacht, zum anderen die Anzahl der

einzunehmenden Tabletten reduziert. Dies hat wiederum einen positiven Effekt auf die Compliance des Patienten und die Therapieeffektivität.

Patienten mit einem hoch-normalen arteriellen Blutdruck sowie einem niedrig-moderaten kardiovaskulären Risiko sollten keine medikamentöse Therapie erhalten. Hauptaugenmerk liegt in dieser Patientengruppe auf der Änderung der Lebensgewohnheiten. Liegt jedoch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko vor, ist eine antihypertensive Monotherapie in Erwägung zu ziehen. Die Therapie der arteriellen Hypertonie Grad 1 mit einem geringen Risikoprofil umfasst anfänglich eine Anpassung der Lebensgewohnheiten. Führt dies innerhalb von drei bis sechs Monaten nicht zu einer adäquaten Blutdruckreduktion, ist zusätzlich eine duale, medikamentöse Therapie anzustreben. Liegt bereits zu Beginn ein hohes kardiovaskuläres Risiko vor, sollte initial begleitend eine duale, blutdrucksenkende Therapie begonnen werden. Bei einer vorliegenden arteriellen Hypertonie Grad 2 oder Grad 3 ist das therapeutische Spektrum um ein drittes Antihypertensivum zu erweitern.^{1,3}

2.3 Pharmakokinetische Eigenschaften der Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Canrenon und Hydrochlorothiazid

Amlodipin zählt zu den langwirksamen Calciumkanalblockern vom Dihydropyridin-Typ. Generell erfolgt eine Unterteilung in die drei Gruppen Dihydropyridin-, Diltiazem- und Verapamil-Typ, welche sich primär durch die Wirkorte sowie –Effekte unterscheiden. Alle Calciumantagonisten entfalten ihre Wirkung, indem sie den transmembranösen Einstrom von Calcium-Ionen in Herz- und Gefäßmuskelzellen blockieren. Während jedoch Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ ihre negativ chrono-, dromo- und inotrope Wirkung vor allem am Myokard und der Erregungsleitung am Herzen entfalten, wirken Medikamente der Dihydropyridin-Gruppe primär relaxierend auf die glatte Muskulatur und senken somit den Gefäßtonus. Die Gruppe der Diltiazeme nimmt eine Zwischenstellung ein und hat gleichermaßen einen Effekt auf Myokard, Erregungsleitung sowie Gefäßtonus^{3,17}. Im Rahmen der antihypertensiven Therapie finden größtenteils Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ Anwendung, da diese durch Dilatation der Gefäße den peripheren Widerstand im Gefäßsystem verringern und somit effektiv den Blutdruck senken können.

Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ umfassen kurz ($T_{1/2} < 2h$), mittellang ($T_{1/2} 8-12h$) und langwirksame ($T_{1/2} > 24h$) Wirkstoffe. Mit einer Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von 35-50h zählt Amlodipin zur letzteren Gruppe. Die Verabreichung erfolgt per oral, in einer Dosierung von 5-10mg, einmal täglich. Die höchsten Plasmaspiegel (T_{max}) werden nach 6-12h erreicht, während für stabile Plasmaspiegel eine konsequente Gabe über mindestens sieben Tage erforderlich ist. Die absolute Bioverfügbarkeit liegt schätzungsweise zwischen 64-90%. Amlodipin wird zu 90% in der Leber zu inaktiven Metaboliten verstoffwechselt und über die Niere ausgeschieden. Eine eingeschränkte Nierenfunktion hat jedoch keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Amlodipin.¹⁸

Metoprolol ist ein Vertreter der Medikamentengruppe der Beta-Blocker. Letztere entfalten ihre Wirkung durch einen kompetitiven Antagonismus an den Beta-1- und Beta-2-Rezeptoren der verschiedenen Organe im menschlichen Körper und hemmen somit die Wirkung adrenerger Substanzen wie Adrenalin und Noradrenalin.

Die Hemmung von Beta-1-Rezeptoren am Herzen hat eine negativ chrono-, dromo- und inotrope Wirkung und senkt den Blutdruck. Hierdurch wird außerdem der Sauerstoffverbrauch des Herzens reduziert, was einen antiischämischen Effekt hat. Des Weiteren resultiert die Hemmung von Beta-1-Rezeptoren an den Nieren in einer verminderten Reninausschüttung, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) inhibiert, die renale Perfusion vermindert und der Blutdruck gesenkt wird. Die Blockade von Beta-2-Rezeptoren hingegen verringert die vasodilatatorische Wirkung adrenerger Substanzen, und wirkt somit vasokonstriktorisch auf die glatte Muskulatur peripherer Gefäße. Des Weiteren wird die Glykogenolyse in den Leber- und Skelettmuskelzellen sowie die Insulinsekretion im Pankreas gehemmt.

Die Unterscheidung der verschiedenen Gruppen der Beta-Blocker erfolgt anhand ihrer Selektivität und Affinität bezüglich der Beta-Rezeptoren. Metoprolol zählt zu den beta-1-kardioselektiven Beta-Blockern. Es wirkt in niedriger Dosierung vornehmlich an den Beta-1-Adrenorezeptoren der Herzmuskelzellen. Bei höherer Dosierung inhibiert Metoprolol jedoch ebenfalls die Beta-2-Rezeptoren der glatten Muskulatur der peripheren Gefäße sowie der Bronchien. Die antihypertensive Wirkung erfolgt zum einen über den kompetitiven Antagonismus von Katecholaminen an den peripheren und kardialen adrenergen Rezeptoren, wodurch das Herz-Zeit-Volumen reduziert wird, zum anderen durch zentrale Effekte, welche in einer Reduktion der Sympathikus-Aktivierung resultieren sowie mittels Inhibierung der Renin-Aktivität.

Die Applikation von Metoprolol kann sowohl peroral als auch intravenös erfolgen, wohingegen die perorale Gabe bevorzugt wird. Die Standarddosierung liegt bei 25 mg p.o. einmal täglich, kann jedoch auf bis zu 200 mg p.o. einmal täglich gesteigert werden. Außerdem ist es möglich, die Tagesdosis auf zwei Einzeldosen aufzuteilen. Metoprolol unterliegt nach oraler Applikation einem hohen Firstpass-Effekt von ca. 50%. Die Bioverfügbarkeit variiert mit der Dosis und nimmt nicht proportional mit steigender Dosierung zu. Innerhalb einer Dosierung zwischen 50 bis 400 mg täglich liegt die relative Bioverfügbarkeit bei 77% der eingenommenen Medikamentenmenge. Im Körperkreislauf liegen etwa 12% des Wirkstoffes an Plasmaproteine gebunden vor. Die maximalen Plasmaspiegel werden nach 1,5-2h ($T_{max}[h]$) erreicht. Die Metabolisierung von Metoprolol erfolgt größtenteils in der Leber in Abhängigkeit von der CYP2D6-Aktivität. Anschließend werden die Metabolite zu 95% renal ausgeschieden. Die Plasma-Halbwertszeit ($T_{1/2}$) liegt bei 3-7h. ¹⁹

Thiaziddiuretika steigern die Diurese durch Hemmung des Na^+Cl^- -Ko-Transporters. Die Thiazide werden aktiv im proximalen Tubulus sezerniert und entfalten anschließend ihre Wirkung im frühen distalen Tubulus. Die Rückresorption von Natrium- und Chlorid-Ionen wird durch Hemmung des Ko-Transporters blockiert, was zu einer vermehrten Na^+Cl^- - sowie sekundär zu

einer erhöhten Wasserausscheidung führt. Es wird vermutet, dass der blutdrucksenkende Effekt hierbei unter anderem auf eine Reduktion des Kochsalzgehaltes sowie des extrazellulären Wasser- und Plasmavolumens zurückzuführen ist. Weitere Wirkmöglichkeiten stellen eine Änderung des renalen Gefäßwiderstandes und des Ansprechens auf Angiotensin II dar.²⁰

Eines der am häufigsten verwendeten Thiaziddiuretika ist Hydrochlorothiazid. Die Applikation erfolgt peroral, die Standarddosierung liegt bei 12,5 mg einmal täglich und kann auf bis zu 25 mg gesteigert werden, sofern keine Einschränkungen der Nierenfunktion bestehen.³

Hydrochlorothiazid wird zu ca. 95% über die Niere ausgeschieden, hierbei besteht eine enge Korrelation zwischen der Kreatinin-Clearance und der renalen Ausscheidung von Hydrochlorothiazid. Ab einer Kreatinin-Clearance von unter 30 ml/min ist Hydrochlorothiazid laut Fachinformation weitestgehend unwirksam²⁰, wohingegen gemäß Herold auch bei einer Glomerulumfiltration <30 ml/min zumindest eine Restwirkung besteht³.

Die Plasma-Halbwertszeit ($T_{1/2}$ [h]) beträgt bei normaler Nierenfunktion 6-8h, kann jedoch im Rahmen einer Nierenfunktionseinschränkung auf bis zu 20h ansteigen. Die höchsten Plasmaspiegel (T_{max}) sind nach 2-5h messbar. Die Wirkdauer kann zwischen 6-12h variieren, das Wirkmaximum wird nach 3-6h erreicht. Die Bioverfügbarkeit von Hydrochlorothiazid beträgt 70%, die Plasmaproteinbindung 64%²⁰.

Spironolacton zählt zur Gruppe der Aldosteron-Antagonisten und somit zu den kaliumsparenden Diuretika. Diese entfalten ihre Wirkung durch kompetitive Blockade der Bindung von Aldosteron an die zytoplasmatischen Rezeptoren der Zellen im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr und hemmen somit die Expression von Na^+ -Kanälen. Hieraus resultiert eine verminderte Natriumrückresorption sowie sekundär eine reduzierte Kaliumsekretion über die sogenannten ROMK-Kanäle. Da der Wirkmechanismus auf einem kompetitiven Antagonismus basiert, kann die Wirkung durch ansteigende Aldosteron-Spiegel aufgehoben werden. Die Anwendung von Spironolacton erfolgt ausschließlich in Tablettenform peroral. Die initiale Therapie im Rahmen der therapieresistenten arteriellen Hypertonie beginnt meist mit einer Dosierung von 50 mg p.o. einmal täglich und ist steigerbar auf bis zu 200 mg p.o. täglich³. Spironolacton wird nach oraler Gabe zu bis zu 73% resorbiert, unterliegt jedoch einem ausgeprägten Firstpass-Effekt und wird in Leber und Niere unter anderem zu den Metaboliten Canrenon, 7- α -Thiospironolacton sowie 7- α -Thiomethylspironolacton verstoffwechselt²¹. Durch gleichzeitige Zufuhr von Nahrung kann die Resorption jedoch gesteigert und möglicherweise der Firstpass-Effekt verringert werden²².

25-30% des Wirkstoffes Spironolacton werden nachweislich zu Canrenon metabolisiert. Canrenon ist der dethioacetylierte Metabolit von Spironolacton und vermutlich verantwortlich für die therapeutische pharmakologische Wirkung. Laut Studien ist Canrenon nach Einzeldosis und multipler Gabe, für ein Zehntel bzw. ein Viertel der antimineralocorticoiden Aktivität verantwortlich²³. Dem Metaboliten 7- α -Thiomethylspironolacton wird jedoch ebenfalls ein Anteil an der antimineralocorticoiden und kaliumsparenden Wirkung zugeschrieben²⁴.

Die maximale Plasmakonzentration (T_{max} [h]) von Spironolacton wird nach 1–2 Stunden erreicht, nach etwa 2–3 Stunden die der Metaboliten. In einem Dosierungsintervall zwischen ca. 50-200 mg Spironolacton besteht eine lineare Korrelation zwischen Spironolacton-Dosis und der Serumkonzentration von Canrenon, höhere Dosierungen führen dagegen zu relativ niedrigeren Canrenon-Serumspiegeln. Dies ist vermutlich auf eine geringere enzymatische Umwandlung von Spironolacton in seine Metabolite zurückzuführen. Der Steady-State-Spiegel von Canrenon wird nach drei bis acht Tagen täglicher Gabe erreicht und liegt zwischen 50 und 188 ng/ml. Bei kontinuierlicher Gabe besteht das Wirkmaximum nach 2-3 Tagen, die Plasma-proteinbindung liegt zwischen 90-98%. Die Ausscheidung von Spironolacton erfolgt über den Urin und partiell über Galle und Stuhl in Form seiner Metaboliten. Spironolacton selbst ist kaum mehr nachzuweisen. Die Eliminationshalbwertszeit ($T_{1/2}$ [h]) für Spironolacton liegt bei 2 Stunden, wohingegen die von Canrenon 20 Stunden, 6- β -Hydroxy-7- α -Thiomethylspironolacton 10 Stunden und die von 7- α -Thiomethylspironolacton etwa 3 Stunden beträgt, und folglich die Metabolite deutlich langsamer ausgeschieden werden. ²¹

Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften

	Amlodipin ²⁵	Metoprolol ²⁶	Hydrochlorothiazid ²⁷	Spironolacton/ Canrenon ²⁸
T_{max} (h)	6-12h	1,5-2h	2-5h	1-2h/2-3h
$T_{1/2}$ (h)	35-50h	3-7h	6-8h	2h / 20h
Plasmaproteinbindung	94%	12%	64%	90-98%
Bioverfügbarkeit	64-80%	77%	70%	73%
Ausscheidung	renal	90%renal	95%renal	renal / Galle

T_{max} (h): Zeit bis zum Erreichen der Spitzenspiegel im Plasma; $T_{1/2}$ (h): Halbwertszeit

2.4 Therapieresistente Arterielle Hypertonie

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Definition, Prävalenz und Ätiologie der therapieresistenten arteriellen Hypertonie erläutert. Nach thematischer Abgrenzung zum pseudo-resistenten Hypertonus, werden anschließend die Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten einer therapieresistenten Hypertonie beschrieben.

2.4.1. Definition, Prävalenz, Ätiologie der therapieresistenten Hypertonie

Die therapieresistente arterielle Hypertonie ist gemäß den aktuellen ESC-Leitlinien definiert als ein erhöhter systolischer Blutdruck >140mmHg und/oder diastolischer Blutdruck >90mmHg trotz adäquater Therapie. Letztere umfasst dabei angemessene Lebensstiländerungen sowie eine an der tolerierten Maximaldosis orientierte, medikamentöse Therapie mit drei oder mehr antihypertensiven Medikamenten unterschiedlicher Stoffklassen. Diese Triple-Therapie sollte möglichst ein Diuretikum, einen ACE-Hemmer sowie einen Calciumkanalblocker enthalten.

Des Weiteren müssen sekundäre Ursachen sowie ein pseudo-resistenter arterieller Hypertonus, beispielsweise im Rahmen des Weißkittel-Effekts, aufgrund mangelnder Adhärenz oder fehlerhafter Blutdruckmessungen, ausgeschlossen werden. ^{1,29-31}

Entsprechend dieser Definition werden Patienten mit einem kontrollierten Blutdruck (SB <140mmHg) unter Anwendung einer Vierfachtherapie ebenfalls als therapieresistent bezeichnet. Daher muss zwischen kontrollierter und nicht-kontrollierter therapieresistenter arterieller Hypertonie unterschieden werden. Die exakte Prävalenz der Erkrankung ist, auch aufgrund fehlender einheitlicher Definitionen, nicht bekannt. In klinischen Studien variiert die Prävalenz zwischen ca. 10-30% ^{1,30,32}, nach Eingrenzung entsprechend einer engeren Definition wie oben genannt jedoch eher bei <10% ^{1,33}.

Kürzlich wurde zudem der Begriff der „refraktären“ arteriellen Hypertonie geprägt, der im deutschen Sprachgebrauch bisher synonym für die therapieresistente arterielle Hypertonie verwendet wurde und in den aktuellen Leitlinien der ESC zur arteriellen Hypertonie noch keine Verwendung findet. Calhoun et al., Siddiqui et al. sowie Dudenbostel et al. definieren die refraktäre Hypertonie als einen extremen Phänotyp des antihypertensiven Therapieversagens, bei dem trotz der Verwendung von fünf oder mehr Antihypertensiva, inklusive der Therapie mit Spironolacton und Chlorthalidon, keine Blutdruckkontrolle erreicht wird ³⁴⁻³⁶.

Die Ätiologie der therapieresistenten arteriellen Hypertonie ist meist multifaktorieller Genese und nicht schlussendlich geklärt ³⁰. Nach Ausschluss sekundärer Ursachen, wie beispielsweise eines Schlafapnoe-Syndroms, chronischen Nierenerkrankungen, Nierenarterienstenosen oder primärem Hyperaldosteronismus (seltener auch: Phäochromozytom, Cushing-Syndrom, Hyperparathyreodismus, Fibromuskuläre Dysplasien), gilt es ebenfalls blutdrucksteigernde Medikamente als Krankheitsauslöser zu identifizieren. Diese umfassen unter anderem orale Kontrazeptiva, Sympathomimetika, NSAID's, Cyclosporin, Erythropoetin sowie Steroide ^{1,30,31,33}.

Des Weiteren gibt es verschiedene Charakteristika, die mit einer therapieresistenten arteriellen Hypertonie assoziiert sind. Die zwei größten Risikofaktoren sind hierbei ein hohes Alter sowie Übergewicht. Weiterhin vergesellschaftet mit einer Therapieresistenz sind ein bei Diagnose initial deutlich erhöhter Blutdruck, eine hohe Kochsalzzufuhr, Diabetes Mellitus, chronische Nierenerkrankungen, schwarze Hautfarbe sowie eine linksventrikuläre Hypertrophie. Bezüglich des Geschlechts unterscheiden sich die Studien der American Heart Association, welche das weibliche Geschlecht als Risikofaktor beschreiben ³⁰, von den ESC-Guidelines zur arteriellen Hypertonie, die den resistenten Hypertonus mit dem männlichen Geschlecht assoziieren ¹.

2.4.2. Pseudo-resistenter Hypertonus

Von der therapieresistenten Hypertonie abzugrenzen ist ein pseudo-resistenter Hypertonus, bei dem vermeidbar hohe Blutdruckwerte oder fälschlich erhöht gemessene Blutdruckwerte

vorliegen und somit letztlich keine Therapieresistenz besteht. Wichtige mögliche Ursachen hierfür sind:

1. Fehlerhafte Messtechnik: Die Bestimmung des Blutdruckes mittels eines Quecksilber-Blutdruckmessgerätes und eines Stethoskops anhand der Korotkoff-Geräusche verbleibt der aktuelle Goldstandard der Blutdruckmessung. Diese Technik ist jedoch anspruchsvoll und dementsprechend eine mögliche Fehlerquelle^{37,38}. Beispielsweise eine zu schmale Manschette, eine Messung kurz nach körperlicher Aktivität und ohne vorherige Pause im Sitzen führen zu fälschlich erhöhten Blutdruckwerten.
2. Weißkittel-Effekt: Dieser bezeichnet erhöhte Blutdruckwerte bei der Messung im Krankenhaus oder beim Arzt durch medizinisches Fachpersonal im Vergleich zu ambulanten Messungen oder Messungen zu Hause. Studien zeigen, dass dieser Effekt bei Patienten mit therapieresistenter Hypertonie durchaus üblich ist, die Prävalenz beträgt hierbei ungefähr zwischen 30-40%^{34,39-41}.
3. Inadäquate Therapie: Die Dosierung oder Kombination antihypertensiver Medikamente erfolgt aufgrund ärztlichen Versagens nicht bestmöglich, wodurch keine adäquate Blutdruckeinstellung erreicht wird^{1,42}.
4. Mangelnde Medikamentenadhärenz: Adhärenz kann als Befolgen der diätetischen sowie medikamentösen Empfehlungen sowie Einhaltung entsprechender Lebensstiländerungen definiert werden⁴³. Werden diese Empfehlungen nicht eingehalten, spricht man von Non-Adhärenz. (Siehe Medikamenten-Adhärenz)

2.4.3. Diagnostik der resistenten Hypertonie

Aufgrund der multifaktoriellen Genese der therapieresistenten Hypertonie, gilt es im Rahmen der Diagnosefindung alle ursächlichen Faktoren zu erfassen. Daher ist zunächst zu bestätigen, ob es sich tatsächlich um eine Therapieresistenz gemäß oben genannter Definition handelt³⁰.

Sollten sich OBP-Werte von >140/90 mmHg, bzw. >130/80 mmHg bei Patienten mit Diabetes oder chronischer Nierenerkrankung unter Therapie mit drei oder mehr Antihypertensiva zeigen oder ein kontrollierter Blutdruck nur unter Vierfachtherapie möglich sein, ist ein Pseudoresistenter Hypertonus auszuschließen. Durch ambulante Blutdruckmessung oder die Selbstmessung durch den Patienten zu Hause (ABPM oder HBPM) können erhöhte Blutdruckwerte bestätigt und der Anteil, der durch das Weißkittel-Phänomen fälschlich erhöhten Blutdruckwerte, reduziert werden. Zur möglichst objektiven Bestimmung kann daher die ambulante 24h-Blutdrucklangzeitmessung eine adäquate Maßnahme darstellen^{30,40}. Hier gelten ein durchschnittlicher Tageswert von >135/85 mmHg sowie ein durchschnittlicher 24h-Wert von >130/80 mmHg als erhöht⁴⁴. Des Weiteren können neue, automatisierte und standardisierte Verfahren der ambulanten oder häuslichen Blutdruckmessung helfen, durch Messfehler bedingte und überschätzte Blutdruckwerte der Praxismessung aufzudecken³⁷. Eine mangelnde

Medikamenten-Adhärenz als Ursache einer scheinbar resistenten Hypertonie muss ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Maßnahmen zur Compliance-Kontrolle stellen unter anderem das therapeutische Drug Monitoring aus dem Urin oder Blut des Patienten ⁴⁵, standardisierte Fragebögen sowie die Blutdruckmessung nach beobachteter Medikamenteneinnahme dar ¹ (siehe 2.5).

Weiterhin muss die bisher erfolgte antihypertensive Therapie des Patienten bezüglich optimaler Dosierung und Medikamentenkombination evaluiert werden, um eine nach aktuellen Leitlinien bestmögliche antihypertensive Therapie zu gewährleisten und erhöhte Blutdruckwerte aufgrund mangelnder therapeutischer Einstellung auszuschließen. Hierbei gilt es auch, mögliche Unverträglichkeiten zu erfragen, sowie durch Verwendung der „Single Pill“ mit kombinierter Einnahme verschiedener antihypertensiver Medikamente das Therapiekonzept zu vereinfachen, um somit die Medikamentenadhärenz zu steigern und eine optimale Blutdruckeinstellung zu erreichen ⁴⁶⁻⁴⁹.

Darüber hinaus ist es wichtig, mögliche Risikofaktoren für einen resistenten Hypertonus zu erfassen und zu beurteilen. Sowohl Übergewicht wie auch ein übermäßiger Salz- und Alkoholkonsum sind mit einem erhöhten Risiko behaftet, an Bluthochdruck zu erkranken und einen resistenten Hypertonus zu entwickeln. Neben oben genannten potentiell blutdrucksteigernden Medikamenten (siehe 2.4.1), muss auch die Einnahme von Drogen wie Kokain, Amphetaminen oder Steroiden erfragt werden. Eine ausführliche Anamnese sowie eine körperliche Untersuchung liefern zusätzlich Hinweise auf Anzeichen von Diabetes, sowie Herz- und Nierenerkrankungen.

Die Durchführung von Anamnese und körperlicher Untersuchung sind außerdem wegweisend für die Identifikation möglicher sekundärer Ursachen. Lautes Schnarchen mit Atemaussetzern, ausgeprägte Tagesmüdigkeit und morgendliche Kopfschmerzen können hinweisend für ein Schlafapnoe-Syndrom sein. Relativ stärker erhöhte diastolische Blutdruckwerte treten unter anderem im Rahmen von Nierenarterienstenosen auf, gleichsam mit abdominellen Strömungsgeräuschen epigastrisch, paraumbilikal oder im Bereich der Flanken. Ein Hyperaldosteronismus kann sowohl primär wie auch in Folge einer Nierenarterienstenose vorkommen. Wegweisend sind vor allem Symptome der konsekutiven Hypokaliämie, beispielsweise Adynamie, Muskelschwäche, Herzrhythmusstörungen, Obstipation oder Polyurie. Kopfschmerzen, Tachykardien, Palpitationen, Unruhe, Angst und ggfs. Hypertensive Krisen können Anzeichen für ein Phäochromozytom sein, wohingegen Striae rubrae typisch für Cortisonabusus oder ein bestehendes Cushing-Syndrom sind.

Diagnostisch hilfreich sind außerdem ergänzende, laborchemische Kontrollen der Nierenfunktion, der Elektrolyte, insbesondere des Kaliums, sowie des Blutzuckers. Die Duplex-Sonographie gibt Aufschlüsse über mögliche arterielle Stenosen. Bei begründetem Verdacht können Nierenarterienstenosen sowie Adenome der Nebenniere oder auch ein Phäochromozytom mithilfe von Magnetresonanz- oder Computertomographie dargestellt werden.

2.4.4. Therapie der resistenten arteriellen Hypertonie:

Der Therapieansatz der resistenten arteriellen Hypertonie ist multimodal. Lebensstiländerungen, wie ein reduzierter Salzkonsum, viel Bewegung und Gewichtsverlust sollten intensiviert betrieben werden. Des Weiteren wird empfohlen, mit der antihypertensiven Therapie und Blutdruckregulation interferierende Medikamente, wie beispielsweise NSAID's, abzusetzen³⁰. Kann hierdurch keine bessere Blutdruckeinstellung erreicht werden, besteht die Möglichkeit, die medikamentöse Therapie auf eine Single-Pill-Therapie umzustellen. Somit kann die Anzahl der einzunehmenden Tabletten reduziert und die Therapie vereinfacht werden, um eine verbesserte Adhärenz des Patienten zu erreichen¹. In einer Pilot-Studie der Charité Berlin hat sich gezeigt, dass durch Umstellung der Therapie von drei einzelnen Antihypertensiva auf eine Single-Pill-Therapie mit begleitenden TDM-Kontrollen, bei 9 aus 13 Patienten eine adäquate Blutdruckeinstellung (RR <135/80mmHg) erreicht werden konnte⁵⁰.

Sollte die medikamentöse Therapie mit drei Antihypertensiva keinen ausreichenden Effekt erzielen, kann die Hinzunahme eines vierten antihypertensiven Medikaments zur bestehenden Therapie erwogen werden. In aktuellen Studien sowie Metaanalysen zeigt sich eine signifikante Blutdruckreduktion durch Verwendung niedrigdosierter Mineralokortikoid-Rezeptorantagonisten (MRA's), wie beispielsweise Spironolacton⁵¹⁻⁵⁶. Die Pathway-2-Studie, eine randomisierte, doppelverblindete Crossover-Studie an 314 Patienten in England, stellt eine Verbindung zwischen Aldosteron-Überschuss, welcher zu vermehrter Salzurückresorption führt, und einer verminderten Blutdruckkontrolle her. Hierzu passend wird ein Zusammenhang zwischen einer resistenten Hypertonie, vermehrter Aldosteron-Sekretion und einem erhöhten intravasculären Flüssigkeitsvolumen vermutet⁵⁷⁻⁵⁹.

Bei Unverträglichkeit von Spironolacton aufgrund hormoneller Nebenwirkungen, empfehlen die ESC-Leitlinien einen Therapieversuch mit Amilorid oder Eplerenon, welche im Rahmen der Pathway-2-Studie einen ähnlich blutdrucksenkenden Effekt gezeigt haben,⁵¹ und seltener antiandrogene Nebenwirkungen, wie Gynäkomastie bei Männern, Brustschmerzen bei Frauen oder sexuelle Dysfunktionen aufweisen^{60,61}. Allen drei Medikamenten gemein ist jedoch das Risiko von Hyperkaliämien, weshalb eine Anwendung nur bei Patienten mit einer eGFR \geq 45 ml/min und einer Kaliumkonzentration \leq 4.5 mmol/L erfolgen sollte. Weiterhin werden begleitend regelmäßige laborchemische Elektrolytkontrollen empfohlen.¹

Als Alternative zur Gabe von Mineralokortikoid-Rezeptorantagonisten, können zunächst ein Aufdosieren der diuretischen Therapie wie auch die Hinzunahme oder ein Wechsel des Diuretikums erwogen werden^{1,30}. Calhoun et al. schlussfolgern in der Stellungnahme der American Heart Association, dass die Therapieresistenz unter anderem auf ein erhöhtes intravasculäres Blutvolumen zurückzuführen ist, betonen die Bedeutung einer suffizienten diuretischen Therapie und empfehlen die Verwendung von langwirksamen Thiaziddiuretika³⁰. So konnte in Studien gezeigt werden, dass unter Therapie mit Chlorthalidon eine signifikant höhere Blutdrucksenkung in der 24h ambulanten Blutdruckmessung im Vergleich zur Therapie mit Hydrochlorothiazid erreicht werden kann^{62,63}. Bei einer eGFR \leq 30ml/min im Rahmen einer

chronischen Niereninsuffizienz sollte dagegen eine Therapie mit Schleifendiuretika wie Furosemid oder Torasemid erfolgen, da die Wirkung von Thiaziddiuretika mit abnehmender Nierenfunktion ebenfalls nachlässt^{1,30}.

Eine weitere Möglichkeit zur Blutdruckregulation bei resistenter arterieller Hypertonie stellt die Therapie mit Bisoprolol oder Doxazosin dar. Zwar wird der Blutdruck laut einer Metaanalyse der London School of Hygiene and Tropical Medicine durch MRAs effektiver gesenkt als durch Bisoprolol, Doxazosin oder Furosemid⁶⁴, dennoch konnte im Rahmen der Pathway-2-Studie eine signifikante Blutdrucksenkung durch Bisoprolol und Doxazosin gegenüber dem Placebo nachgewiesen werden⁵¹. Daher wird bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen einer Therapie mit Spironolacton in den ESC-Leitlinien 2018 die Gabe von Bisoprolol oder Doxazosin empfohlen¹.

2.5 Medikamenten-Adhärenz

Adhärenz kann als Befolgen der diätetischen sowie medikamentösen Empfehlungen sowie Einhaltung entsprechender Lebensstiländerungen definiert werden⁴³. Werden diese Empfehlungen nicht eingehalten, spricht man von Non-Adhärenz. Die Prävalenz mangelnder Medikamentenadhärenz im Rahmen der antihypertensiven Therapie wird in verschiedenen Studien auf ca. 30-50% geschätzt^{48,65-67}. Gupta et al. konnten in einer Gruppe aus 238 Patienten mit therapieresistenter Hypertonie mittels therapeutischem Drug Monitoring 73 Patienten als non-adhärenz nachweisen, entsprechend ca. 30%⁴⁵. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit geringerer Adhärenz nicht vorhersagbare Schwankungen des Blutdruckes bei ärztlicher Vorstellung entstehen⁶⁸, wodurch Blutdruckkontrollen sowie die medikamentöse Einstellung zusätzlich erschwert werden. Die medikamentöse Non-Adhärenz des Patienten resultiert in Medikamenten-Serumspiegeln außerhalb des therapeutischen Fensters und kann zu unerwünschten Nebenwirkungen sowie Komplikationen bis hin zu Therapieversagen mit schweren, gesundheitlichen Schäden führen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine geringe Adhärenz mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist^{69,70}. Außerdem steigen die Kosten für das Gesundheitssystem durch die zusätzliche Nutzung medizinischer Ressourcen aufgrund von vermeidbaren Arztbesuchen, unnötigen Zusatzbehandlungen, Labortests und ungeplanten klinischen Aufenthalten im Falle von Komplikationen⁷¹.

Mögliche Ursachen non-adhärenz Verhaltens seitens des Patienten umfassen ein von Misstrauen geprägtes Arzt-Patienten-Verhältnis, Glaubensansichten, Analphabetismus, widersprüchliche medizinische Informationen durch Ärzte, Internet und andere Medien, Vergesslichkeit, Depressionen sowie die Angst vor Nebenwirkungen der Therapie⁷². Auch ergaben verschiedene Studien, dass die Medikamentenadhärenz in einem direkten Verhältnis zur Anzahl der verordneten Tabletten⁴⁷, der Häufigkeit und dem Zeitpunkt der täglichen Einnahme^{46,48} und der Verträglichkeit unterschiedlicher Medikamentenklassen⁴⁹ steht. Mangelnde Medikamentenadhärenz wurde in weniger als 10% der Fälle bei Einnahme von einer

Monotherapie beobachtet, in 20% bei zwei Tabletten, in 40% bei drei Tabletten und sehr hoher bis totaler Non-Compliance ab einer Multimedikation von fünf Tabletten ^{45,73}.

Die medikamentöse Einstellung des Patienten ist ohne eine konsequente Einnahme der Medikamente nicht möglich. Im Falle schlechter klinischer Ergebnisse ist es für die weitere Therapieplanung daher notwendig zu wissen, ob der Patient die Medikamente wie vorgeschrieben eingenommen hat. Medikamentöse Non-Adhärenz muss hierbei als Ursache immer in Erwägung gezogen werden, wenngleich sie im klinischen Alltag schwer zu identifizieren ist ⁷⁴. Erfassungsmöglichkeiten zur Bewertung der Medikamentenadhärenz können in direkte und indirekte Methoden unterschieden werden. Indirekte Bewertungsmethoden beinhalten Fragebögen, Patiententagebücher, Pillenzähler, die Erfassung der Anzahl erfolgter Rezeptierungen sowie das klinische Ansprechen. Direkte Methoden umfassen die Überwachung des Patienten bei der Medikamenteneinnahme, die Bestimmung der Medikamentenspiegel im Blut oder Urin sowie die Bestimmung von nicht verdaulichen Medikamentenmarkern im Blut, die mit dem Medikament gegeben werden ^{72,75}.

2.6 Therapeutisches Drug Monitoring

Therapeutisches Drug Monitoring bezeichnet die Messung und Interpretation von Medikamentenspiegeln. Ziel ist es, anhand der Medikamentenkonzentrationen das Therapieregime eines Patienten individuell anzupassen, um Wirkung und Ergebnis der Pharmakotherapie zu optimieren ⁷⁶. Hierbei werden Medikamentenspiegel innerhalb der therapeutischen Breite angestrebt, um toxische oder subtherapeutische Dosierungen zu vermeiden ⁷⁷. Als Goldstandard gilt die Messung von Medikamentenspiegeln im Blutplasma oder Serum. Darüber hinaus wird in aktuellen Studien auch die Verwendung anderer Matrices wie beispielsweise Muttermilch, Liquor, Urin oder Trockenblut untersucht und etabliert ⁷⁸.

Die Einsatzmöglichkeiten des TDM gestalten sich vielseitig. Zu Forschungszwecken ermöglichen Wirkspiegeluntersuchungen Rückschlüsse auf pharmakokinetische Eigenschaften wie Resorption und Elimination von Arzneimitteln zur Erstellung von pharmakokinetischen Modellen ⁷⁹. In der Forensik und Toxikologie können medikamentöse Überdosierungen oder Vergiftungen detektiert werden ⁸⁰. Im klinischen Alltag erlaubt die Wirkspiegelbestimmung von Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite ein Erreichen des optimalen Wirkspiegels sowie der individuellen Arzneimitteldosierung ⁷⁶. Bei ausbleibender Wirkung von Medikamenten bietet das Therapeutische Drug Monitoring außerdem die Möglichkeit neben einer durch Medikamenteninteraktionen oder CYP-Enzym bedingten veränderten Pharmakokinetik auch mangelnde Medikamentenadhärenz zu detektieren ⁷⁵.

Grundvoraussetzung des Therapeutischen Drug Monitorings ist die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen verabreichter Medikamentendosis und dem gemessenen Medikamentenspiegel besteht und der Medikamentenspiegel Einfluss auf die resultierenden klinischen Effekte hat. Schwankende Medikamentenspiegel trotz feststehender Medikamentendosis entstehen aufgrund der pharmakokinetischen Variabilität. Einfluss hierauf nehmen Absorption,

Verteilung, Metabolisierung und Elimination eines Medikaments⁷⁶. Die pharmakodynamische Variabilität bezeichnet variierende klinische Effekte trotz feststehender Medikamentenspiegelkonzentrationen aufgrund von unterschiedlichen Rezeptor- und Enzyminteraktionen sowie -empfindlichkeiten. Diese werden beeinflusst von Faktoren wie Alter, Genetik, Ernährung oder Krankheitszustand des Patienten sowie Veränderungen der Plasmaproteinbindung, Vorhandensein aktiver Metaboliten oder Arzneimittelinteraktionen im Rahmen von Komedikationen^{76,77}. Die laborchemische Kontrolle der Blutspiegel erfolgt bestenfalls im Steady-State-Status. Dieser wird nach mehrfacher Applikation eines Medikaments erreicht, wenn die Wirkstoffaufnahme der Wirkstoffelimination entspricht und somit eine Gleichgewichtskonzentration erreicht wird. Der Steady-State ist abhängig von der Eliminationshalbwertszeit eines Medikaments und wird schätzungsweise nach fünf Halbwertszeiten erreicht. Um eine künstliche Erhöhung der durchschnittlichen Plasmakonzentration durch eine kürzlich eingenommene Dosis zu vermeiden, sollte die Bestimmung der Plasmakonzentration am Ende eines Dosierungsintervalls als Talspiegelkontrolle erfolgen⁸¹.

Nach Bestimmung der Medikamentenkonzentration sind zur Interpretation und Dosisanpassung daher zusammenfassend folgende Informationen notwendig: Demographische Daten des Patienten (Alter, Geschlecht, Ethnie, Begleiterkrankungen), Komedikationen, Pharmakokinetik des Medikaments, Therapieschema (Dosis, Darreichungsform, Dauer der Einnahme) und Zeitpunkt der letzten Medikamenteneinnahme sowie der Blutabnahme⁷⁶. Hierfür ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit aller beteiligten Parteien unabdingbar.

Um den hohen Anforderungen an Genauigkeit, Richtigkeit und standardisierten Messungen gerecht zu werden, wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt, von denen sich zuletzt vor allem Immunassays sowie Tandem-Massenspektrometrie-Methoden wie die LC-MS/MS etabliert haben^{75,82}.

2.7 Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometriekopplung: LC-MS/MS

LC-MS/MS gehört zu den Methoden der Wahl bei der Bestimmung von komplexen biologischen Proben⁸³ und gilt somit als Goldstandard in der quantitativen Arzneimitteldiagnostik⁸⁴. Die Flüssigkeitschromatographie weist eine geringe Spezifität auf, reduziert durch die chromatographische Trennung jedoch die Komplexität der Proben und kann somit Matrixeffekte und Hintergrundrauschen durch Probenverunreinigungen in der nachfolgenden Massenspektrometrie verringern, um die Sensitivität sowie Qualität der Analyse zu verbessern⁸³. Des Weiteren sind mit technisch fortgeschritteneren Geräten wie der Ultra-High-Pressure-Liquid-Chromatographie (UHPLC) kurze Laufzeiten von ungefähr zwei Minuten möglich.

Die nachfolgend gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht eine hohe Sensitivität sowie Spezifität, da durch Fragmentierungsreaktionen der Ionen des Analyten hochcharakteristische Messdaten erzeugt werden. Kurze Analysezeiten sowie eine einfache

Probenvorbereitung erlauben einen hohen Probensatz, während zusätzlich die simultane Messung mehrerer Analyten möglich ist.

2.7.1. Flüssigkeitschromatographie

Die Flüssigkeitschromatographie dient der Trennung verschiedener Komponenten in Stoffgemischen und basiert auf dem Adsorptionsgleichgewicht zwischen einer flüssigen, mobilen Phase und einer stationären Phase ⁸⁵.

Als stationäre Phase können sowohl Platten mit einer Schicht der stationären Phase (Dünnschichtchromatographie) wie auch Säulen dienen, welche mit der stationären Phase gefüllt sind (Säulenchromatographie). Die Säule beinhaltet als stationäre Phase meist ein Kieselgel, welches das Eluat, eine Mischung aus mobiler Phase und der darin transportierten Probe, der Schwerkraft folgend durchläuft. Die mobile Phase wird auch als Laufmittel bezeichnet. Die Trennung der Substanzen im Eluat erfolgt aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Die Effektivität der Trennsäulen kann gesteigert werden, je feinkörniger das Trägermaterial der stationären Phase ist ⁸⁶. Da dem Laufmittel somit ein erhöhter Strömungswiderstand entgegengesetzt wird, muss die Lösung der zu trennenden Stoffe mit einem hohen Druck aktiv durch die Säule gepumpt werden, um einen Flüssigkeitsstrom dennoch aufrecht zu erhalten. Hierfür hat sich die UHPLC etabliert. Diese arbeitet mit Partikelgrößen von wenigen Mikrometern (<2 µm) und Druckwerten über 1000 bar ^{86,87}.

Man unterscheidet zwischen Normalphasen- und Umkehrphasenchromatographie. Bei der Normalphasenchromatographie besteht die stationäre Phase aus polaren Kieselgelen / Silicagelen. Die Trennung der Substanzen erfolgt aufgrund ad- und desorbierender Wechselwirkungen in Abhängigkeit von ihrer Polarität. Unpolare Substanzen fließen schneller durch die Säule als polare Substanzen, da letztere mit den OH-Gruppen der Silicagele auf der Kieseloberfläche der stationären Phase wechselwirken. Es werden in der Regel unpolare Laufmittel wie Hexane, Heptane oder Essigester verwendet. Die Durchflussrate kann durch den Zusatz polarer Laufmittel, welche mit den gelösten polaren Stoffen um die adsorptive Bindung an das Kieselgel konkurrieren und die Elutionskraft steigern, erhöht werden. ⁸⁸

Im Rahmen der Umkehrphasenchromatographie wird als stationäre Phase ein mit unpolaren Alkanen überzogenes (z.B. C-18-Ketten) Kieselgel verwendet und die Polaritätsverhältnisse somit umgekehrt. Für polare Substanzen werden zur Trennung polare Lösungsmittel, meist aus Wasser in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel wie Methanol, verwendet. Unpolare Substanzen werden mit einem Laufmittel auf Basis von Acetonitril und Wasser getrennt. Der chromatographische Trennmechanismus beruht auf einer Verteilung entsprechend der Van-der-Waals-Kräfte. Je besser der Analyt in der stationären Phase gelöst wird, desto länger hält er sich darin auf und desto langsamer wird er durch die mobile Phase retiniert. Die Elutionskraft steigt, je mehr organisches Lösungsmittel im Verhältnis zu Wasser verwendet wird ⁸⁸. Die Umkehrphasenchromatographie eignet sich somit universell für polare sowie für unpolare Stoffe ^{85,88,89}.

Die Bestandteile des zu untersuchenden Stoffgemisches werden im Strom des Lösungsmittels durch die Säule kontinuierlich voneinander getrennt und zu unterschiedlichen Zeiten eluiert. Mögliche variable Faktoren, welche neben der Eluentenzusammensetzung die Trennleistung, Retention sowie Selektivität der Flüssigkeitschromatographie beeinflussen, sind Länge, Durchmesser und Partikelgröße der Säule sowie die Temperatur der Säule⁸⁸. Je nach Komplexität des Stoffgemisches, kann die Zusammensetzung der mobilen Phase angepasst werden. Bei einer geringen Anzahl an Analyten und entsprechend weniger komplexen Stoffgemischen ist die Verwendung einer isokratischen Elution ausreichend, das Verhältnis der organischen Lösungsmittel bleibt über das gesamte Trennverfahren konstant. Für das Trennverfahren von Stoffgemischen mit einer Vielzahl an Analyten ist es häufig notwendig, einen Lösungsmittelgradienten zu verwenden und die Polarität der mobilen Phase während der Trennung zu verändern. Hierdurch werden die benötigte Länge der Säule verringert, schmalere Peaks sowie kürzere Analysezeiten erreicht⁹⁰.

Die Zeit, die eine Substanz zum Durchlaufen der Säule benötigt, ist die Retentionszeit. Sie bleibt bei unveränderten chromatographischen Bedingungen stets konstant und ist daher charakteristisch für den Analyten⁸⁶. Die graphische Darstellung der Messung erfolgt als Chromatogramm. Hierbei wird das Detektorsignal der eluierten Substanz als Peak gegen die jeweilige Retentionszeit aufgetragen. Die Fläche unterhalb des Peaks korreliert mit der Konzentration des Analyten⁸⁸.

2.7.2. Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer setzt sich typischerweise aus einer Ionenquelle, dem Massenanalysator sowie einem Detektor zusammen. Die Ionenquelle transferiert die Moleküle aus der Flüssigkeitschromatographie in Ionen, welche anschließend im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) selektiert und mittels eines Inertgases in hochspezifische Bruchstücke gespalten werden. Der Detektor erzeugt dann ein elektrisches Signal, welches der Intensität des eingehenden Ionenstroms entspricht.

Die Ionenquelle konvertiert das Flüssigkeitsgemisch der Probenmoleküle in einen gasförmigen Ionenstrom. Da sich neutrale Teilchen im isolierten Zustand in der Gasphase zufällig in alle Raumrichtungen bewegen, müssen sie, um eine kontrollierte und gerichtete Bewegung zu erzielen, ionisiert werden. Die Probenmoleküle werden dabei in Ionen umgewandelt. Dies geschieht, indem Protonen, Elektronen oder andere Ionen vom Molekül abstrahiert oder dazu addiert werden.⁸⁶ Es gibt verschiedene Formen der Ionisation. Am häufigsten Anwendung finden die Elektronenstoßionisation (EI) sowie die chemische Ionisation (CI). Beide Verfahren setzen jedoch eine Verdampfbarkeit im Ultrahochvakuumbereich voraus und sind daher nicht mit der vorgeschalteten Flüssigkeitschromatographie vereinbar. In der Tandem-Massenspektrometrie mit Flüssigkeitschromatographie sind die Verwendung der Elektrospray-Ionisation (ESI) sowie die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) am weitesten verbreitet. Die APCI eignet sich hervorragend für nicht-polare Verbindungen und thermostabile Analyten

^{91,83}. Die Analytlösung wird bei einer Temperatur von ca. 500°C in einer Heizpatrone verdampft. Der dabei entstehende Lösemitteldampf strömt an einer Nadelelektrode vorbei, an welche eine Gleichspannung angelegt ist. Durch Korona-Entladung kommt es dann zur chemischen Ionisation und es entstehen Ionen in der Gasphase. ⁸⁶

Die Elektrospray-Ionisation erfolgt ebenfalls bei Atmosphärendruck und ist eine besonders sanfte Form der Ionisation. Dies bedeutet, dass die Überschussenergie der frisch gebildeten Ionen unterhalb der Aktivierungsenergie für Fragmentierungsreaktionen gehalten wird und die Ionen somit stabil bleiben. In Folge können auch komplexere Gemische direkt massenspektrometrisch analysiert werden, da alle Signale im Spektrum durch Molekül-Ionen verursacht werden. Daher ist die ESI die Methode der Wahl in metabolomischen Studien ⁸³. Sie eignet sich für Substanzen mit hoher Polarität sowie ionische Analyten. Die verdünnte Lösung des Analyten aus der Flüssigkeitschromatographie wird hierbei durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes zu einem hoch geladenen Aerosol versprüht ⁸⁶. Hierfür fließt die Analytlösung durch eine geladene Kapillare. Je nach Ladung der Kapillare wird zwischen einem positiven oder negativen Ionisationsmodus unterschieden. Durch Anlegen einer Hochspannung mit einer Potentialdifferenz von 3-5 kv zwischen Sprühkapillare und der ihr gegenüberliegenden Gegenelektrode, kommt es an der Spitze der Kapillare zu einer Ladungstrennung der Elektrolytlösung. Aufgrund des Zusammenspiels von elektrostatischen Kräften auf die Ionen und der Oberflächenspannung der Lösung, verformen sich austretende Tropfen zur Gegenelektrode hin zu einem Kegel, dem so genannten Taylor-Konus. Zieht dieser weiter Richtung Gegenelektrode, wird am Rayleigh-Limit die Oberflächenspannung überschritten und der Kegel zerstäubt in einen feinen Strahl kleiner Tropfen ^{92,93}. Durch Wiederholung dieses Prozesses aufgrund nachströmender Flüssigkeit wird der Strahl aufrechterhalten und elektrostatisch geladen. Im Rahmen der aus der elektrischen Ladung resultierenden, abstoßenden Coulomb-Kräfte, kommt es zu den sogenannten Coulomb-Explosionen, so dass aus den sehr kleinen Tropfen des Strahls ein feines, elektrisch geladenes Aerosol entsteht ^{86,93}. Hierbei werden die Ionen freigesetzt, während die Tröpfchen in das Interface des Massenanalysators im Massenspektrometer gelangen. Somit stellt die ESI eine optimale Möglichkeit der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie dar.

Im Massenanalysator werden die Ionen entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt. Hierfür stehen verschiedenste Massenanalysatoren mit unterschiedlichen Wirkprinzipien zur Verfügung. Diese wären unter anderem das Sektorfeld-, das Quadrupol-, das Flugzeit- sowie das Ionenfallen-Massenspektrometer. Allen gemein ist der Einsatz statischer und/oder variabler elektromagnetischer Felder ⁸⁶.

Der in Kombination mit einer Flüssigkeitschromatographie am häufigsten genutzte Massenanalysator ist das elektrische Quadrupol-Massenspektrometer. Es besteht aus vier, zur Innenseite möglichst hyperbol geformten Stabelektroden, deren Achsen entsprechend der Zylinderachse an den vier Ecken eines Quadrats parallel zueinander verlaufen. An die Stabelektroden werden sowohl eine Wechselspannung wie auch eine Gleichspannung angelegt, wobei die

jeweils gegenüberliegenden Elektroden gleich geladen sind. Hieraus entsteht ein oszillierendes elektrisches Feld, welches die Ionen entlang der z-Achse durchwandern. Sie werden entsprechend ihrer Ladung von den Stäben angezogen, um bei einem passenden Verhältnis von Frequenz zu Spannung umgepolt und wieder abgestoßen zu werden. Durch die zusätzlich angelegte Gleichspannung erfolgt eine Selektion der Ionen entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis, da nur Ionen mit einem bestimmten m/z-Wert eine stabile oszillierende Flugbahn erreichen und am Ende des Analysators auf den Detektor treffen. Der einzelne Quadrupol ermöglicht folglich die Bestimmung von Ionen anhand des m/z-Wertes sowie ihrer molekularen Masse^{83,94}.

Um die Selektivität und Sensitivität einer Quantifizierungsmethode zu verbessern, ist es möglich, mehrere Analysatoren sequentiell hintereinander zu schalten. In diesem Fall wird von Tandem-Massenspektrometrie, auch MS/MS gesprochen. Zusätzlich zum m/z-Wert sowie der molekularen Masse, ermöglicht diese Methode die zusätzliche Identifizierung von Ionen anhand ihrer Metaboliten, sog. Fragment-Ionen, welche durch Ionenfragmentierung im Rahmen kollisionsinduzierter Dissoziation entstehen⁸³.

Ein Beispiel hierfür wäre der Triple-Quadrupol. Dabei werden zwischen zwei Quadrupole Kollisionszellen eingebaut, in denen die Ionen mittels eines Inertgases (Stickstoff bzw. Argon) in Bruchstücke gespalten werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Fragmentierung. Im ersten Quadrupol erfolgt die Selektion der Ionen (Parent-Ion), welche im zweiten Quadrupol, der Kollisionszelle, fragmentiert werden. Der dritte Quadrupol detektiert anschließend die Produkte der Fragmentierungsreaktionen (Produkt-Ionen). Dabei wird in der Analyse das Produkt-Ion mit der höchsten Intensität zur Quantifizierung (Quantifier-Ion) und das Produkt-Ion mit der zweithöchsten Intensität zur Identifizierung (Qualifier-Ion) verwendet. Somit ergeben sich aus der MS/MS-Kopplung verschiedene Möglichkeiten der Analyse und entsprechende Betriebsmodi der Analysatoren. Mittels eines Produkt-Ionen-Scans werden für ein vorab selektiertes Parent-Ion alle Fragment-Ionen entsprechend ihrem m/z-Verhältnisses detektiert. Im Vorläufer-Ionen-Scan hingegen werden für ein Produkt-Ion bei bekanntem Masse-zu-Ladungsverhältnis alle möglichen Vorläufer-Ionen (Parent-Ions) ermittelt. Durch die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Tandem-Massenspektrometrie werden die Messparameter m/z-Verhältnis, Metaboliten-Screening sowie die exakte Masse um die Retentionszeit ergänzt. Diese vierdimensionale Analyse ermöglicht eine hohe Selektivität der Messung mit erweiterten Betriebsmodi.⁸⁶

Im sog. Full Scan Modus werden alle Bestandteile und Metaboliten des zu analysierenden Stoffgemisches dargestellt, ohne dass zuvor eine Selektion des Vorläufer-Ions erfolgt ist. Er dient der qualitativen Analyse und Strukturbestimmung. Im Modus Selected-Ion-Monitoring (SIM) wird der m/z-Wert des Vorläufer-Ions vorgegeben und alle daraus entstehenden Produkt-Ionen ermittelt. Eine höhere Selektivität wird im Modus Selected-Reaction-Monitoring (SRM) erreicht, welches den charakteristischen Zerfall eines Ions darstellt. Voraussetzung ist eine genaue Kenntnis über Molekulargewicht und -struktur sowie die exakte Masse des zu

untersuchenden Analyten. Gemessen wird das Signal eines spezifischen, selektierten Vorläufer-Ions und seines definierten Fragment-Ions. Das hochspezifische, definierte Paar eines Vorläufer-Ions mit dem zugehörigen Fragment-Ion wird als SRM-Übergang bezeichnet^{89,94}. Das SRM ist somit eine hoch sensitive und selektive Methode, die eine gezielte, quantitative Analyse von spezifischen Proteinen in komplexen biochemischen Proben erlaubt und daher viele potentielle Anwendungen in der Bewertung sowie Identifizierung von Proteinen und Biomarkern in medizinischen Screenings ermöglicht⁹⁵.

Nachdem die Ionen im Analysator entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis separiert wurden, werden sie im Detektor erfasst. Dieser erzeugt ein elektrisches Signal, welches der Intensität des Ionenstroms entspricht. Es gibt verschiedene Detektoren, deren Auswahl sich an den Anforderungen des jeweiligen Messproblems orientiert: Fotoplatten, Array-Detektoren, Faraday-Auffänger, Sekundärelektronenvervielfacher (kontinuierlich, diskontinuierlich).

Am häufigsten wird jedoch der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) eingesetzt, da dieser aufgrund seines hohen Verstärkungsfaktors (von 10^4 bis 10^8) auch für geringe Ionenströme anwendbar ist und die Anzahl der Ionen, die den Massenanalysator verlassen, meist sehr gering ist. Dafür wird, im Anschluss an den Massenanalysator, der Ionenstrom von einer Konversionsdynode in einen Elektronenstrom umgewandelt. Die Konversionsdynode hat ein hohes Potential (bis zu ± 30 kV) und ist der Polarität der Ionen entgegengesetzt. Die auftreffenden Ionen lösen Elektronen aus der Konversionsdynode heraus, welche entlang eines Potentialgefälles zur gegenüberliegenden Dynode beschleunigt werden und dort weitere Elektronen herausschlagen. Es sind mehrere Beschleunigungsdynoden gegenüber angeordnet, so dass sich der Vorgang wiederholt und es zu einer kaskadenartigen Zunahme der Elektronenanzahl kommt. In der Auffanganode wird dann ein elektrisches Signal erzeugt, welches der Intensität des Ionenstroms entspricht.⁹⁴

2.7.3. Methodvalidierung

Die Methodvalidierung ist ein wichtiges Instrument in der Qualitätssicherung. Die Validierung einer analytischen Methode beschreibt den dokumentierten Nachweis, dass die Methode für den geplanten Verwendungszweck geeignet ist, ihre Leistungsdaten dem gewünschten Verwendungszweck angemessen sind und die Methode somit robuste, aussagekräftige und richtige Ergebnisse liefert.⁹⁶

Die Validierung bioanalytischer Methoden erfolgt unter Einsatz spezifischer Laboruntersuchungsverfahren, welche zur Standardisierung in verschiedenen Leitlinien festgehalten wurden. Von besonderer Bedeutung ist hier unter anderem die Leitlinie der Food and Drug Administration (FDA) „Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation“. Gemäß dieser Leitlinie hat eine Methode hierbei die folgenden Charakteristika zu erfüllen: Linearität, Richtigkeit, Präzision, Sensitivität, Selektivität, Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsrate, Matrixeffekte und Stabilität.

Die Linearität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, welche direkt proportional zur Konzentration des Analyten sind. Direkt proportional bedeutet in diesem Zusammenhang nicht zwangsweise eine lineare Korrelation zwischen Messsignal und Analytkonzentration. Es besteht jedoch eine durch eine Funktion beschreibbare Korrelation zwischen den Messwerten und der zu bestimmenden Konzentration des Analyten.⁹⁷

Präzision und Richtigkeit der Methode werden im Rahmen der Inter- sowie Intraday-Experimente durch wiederholte Messung von Standard- und Kontrollproben ermittelt. Somit wird ebenfalls die Reproduzierbarkeit der Methode erwiesen. Das Intraday-Experiment umfasst sieben Messungen an einem Tag, während beim Inter-Day Doppelbestimmungen an sieben aufeinanderfolgenden Tagen erfolgen. Die Präzision ist dabei ein Maß für die Streuung der Analysenwerte und kann als relative Standardabweichung ausgedrückt werden ($CV [\%] = \text{Standardabweichung} / \text{arithmetischer Mittelwert}$). Die Richtigkeit beschreibt die Abweichung des Mittelwertes vom richtigen, „wahren“ Wert aufgrund eines systematischen Fehlers (Bias [%]). Eine ausreichende Präzision liegt bei einem Variationskoeffizienten $\leq 15\%$ vor. Der Bias als Maß für die Richtigkeit einer Methode sollte innerhalb von $\pm 15\%$ liegen.⁹⁸

Grundvoraussetzung für die Prüfung auf Richtigkeit ist die Selektivität der Methode. Bleibt der Bias innerhalb der vorgegebenen $\pm 15\%$ für die jeweilige Analyten, ist die Methode ausreichend selektiv. Die Selektivität bezeichnet hierbei die Qualifikation einer analytischen Methode, verschiedene, gleichzeitig zu bestimmende Bestandteile ohne wechselseitige Interferenzen zu erfassen.⁹⁸

Die Wiederfindungsrate, auch Recovery, beschreibt, mit welcher Effizienz der zu analysierende Analyt aus der Probenmatrix in die Analytlösung überführt werden kann. Somit wird geprüft, ob ein Teil des Analyten bei der Probenaufbereitung verloren geht. Der experimentelle Nachweis erfolgt durch vergleichende Messung einer vor der Extraktion gespikten Probe mit einer im Anschluss an die Extraktion in gleicher Konzentration gespikten Probe. Die Recovery wird anschließend aus dem Quotienten beider Messwerte berechnet.⁹⁷

Linearität, Präzision, Sensitivität und Selektivität sowie Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate einer Methode können durch Matrixeffekte beeinflusst werden. Die Internationale Union für reine und angewandte Chemie definiert Matrixeffekte als „Gesamtheit der Einflüsse aller Probenbestandteile auf die Messung des Analyten mit Ausnahme des Analyten selbst“. Diese interferierenden Substanzen können das Antwortsignal des Analyten verstärken (Ionenenhancement) oder abschwächen (Ionensuppression)⁹⁹. Geeignete Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Matrixeffekten sind unter anderem die Methode der kontinuierlichen Nachsäulen-Infusion von Bonfiglio et al. sowie das Verfahren der Addition nach Extraktion von Buhrman et al.^{100,101}. Im Rahmen der Addition nach Extraktion wird eine vorbekannte Analytkonzentration sowohl in matrixfreier Lösung als auch nach Zugabe zu einem bereits

extrahierten Probenextrakt gemessen. Zeigen sich bei der vergleichenden Messung unterschiedliche Signalintensitäten, ist von einem Matrixeffekt bei der Messung des extrahierten Probenextrakts auszugehen¹⁰¹. Der Vergleich ermöglicht eine quantitative Analyse der Matrixeffekte, erfasst jedoch keine Matrixeffekte zu anderen Retentionszeiten. Das Verfahren der kontinuierlichen Nachsäuleninfusion bildet dagegen den zeitlichen Verlauf der Matrixeffekte über die gesamte chromatographische Trennung ab. Hierfür wird eine Analytlösung mittels Perfusorspritze über ein zwischengeschaltetes T-Stück zwischen chromatographischer Säule und Ionisationsquelle des Massenspektrometers mit kontinuierlicher Flussrate injiziert, so dass ein gleichbleibendes Signal entsteht. Wird nun zusätzlich biologische Matrix infundiert, können hierdurch bedingte Signalschwankungen detektiert und chromatographisch dargestellt werden¹⁰⁰.

2.7.4. Reduktion und Kompensation von Matrixeffekten: Probenvorbereitung und Interne Standardisierung

Um die Qualität der Messergebnisse zu verbessern, gilt es mögliche Matrixeffekte zu reduzieren oder zu kompensieren. Eine Reduktion der Matrixeffekte wird erreicht, indem der Analyt von seiner Matrix getrennt oder der Anteil interferierender Probenbestandteile verringert wird⁸³.

Die chromatographische Trennung in der Flüssigkeitschromatographie ermöglicht über die zeitliche Variation der Laufmittelzusammensetzung eine selektive Trennung der Zielkomponenten sowie die Abtrennung von Verunreinigungen. Matrixeffekte und Hintergrundrauschen im Massenspektrometer können somit durch die zeitliche Trennung der Elution der Probenbestandteile reduziert werden¹⁰².

Neben der chromatographischen Trennung, dient die Probenvorbereitung dazu, die Komplexität einer Probe zu verringern. Zwei Möglichkeiten der Probenvorbereitung sind die Proteinfällung und die Extraktion einer Probe. Ziel der Verfahren ist es, möglichst viele Störfaktoren zu entfernen und die Konzentration des Analyten zu erhalten.

Die Extraktion erfolgt als Adsorptions-, Lösungs- oder Verteilungsprozess zwischen nicht mischbaren Phasen. Diese können flüssig, fest oder gasförmig sein und je nach Bedarf kombiniert werden. Die gängigsten Methoden sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und die Festphasenextraktion (SPE). Die LLE nutzt die unterschiedlichen Löslichkeiten von Stoffen in zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln. Die Probe wird zu einer Flüssigkeit bestehend aus einer hydrophilen Phase (meist Wasser als Lösungsmittel) und einer hydrophoben Phase (organisches Lösungsmittel) gegeben. Dabei geht der Analyt in die Phase über, in welcher er besser löslich ist. Anschließend können beide Phasen getrennt, das überschüssige Lösungsmittel verdampft und somit der Analyt gewonnen werden. Bei der SPE wird die Probe in einem Lösungsmittel durch eine feste Phase (Sorbens) geleitet. Je nach Auswahl des Sorbens, werden polare, unpolare oder ionischen Verbindungen aus der Probe absorbiert. Das

Lösungsmittel dagegen kann das Sorbens ungehindert passieren. Anschließend kann der Analyt mithilfe eines Lösungsmittels vom Sorbens gelöst und weiter analysiert werden ¹⁰³.

Neben der Extraktion stellt die Proteinfällung von Proben in humanem Plasma mittels eines organischen Lösungsmittels eine häufig genutzte und einfache Methode der Probenvorbereitung dar. Das organische Lösungsmittel beeinflusst durch Herabsetzen der Solvationskraft des Wassers hierbei die elektrostatischen Interaktionen zwischen den Proteinen und erleichtert somit deren Aggregation. Nach erfolgter Fällung können die Proteine mittels Zentrifugation getrennt und der klare Überstand mit dem Analyten weiter analysiert werden. Weitere Möglichkeiten zur Reduktion von Matrixeffekten sind die Probenverdünnung sowie geringere Injektionsvolumina, da in beiden Fällen die Menge interferierender Substanzen reduziert wird.

Die Verwendung von Internen Standards (IS) stellt eine Möglichkeit dar, sowohl mögliche Matrixeffekte als auch Variabilitäten durch die Probenvorbereitung, Wiederfindungsrate und weitere Fehlerquellen zu kompensieren. Beim IS handelt es sich um strukturverwandte Substanzen mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften oder um isotoopenmarkierte Analoga mit den identischen physikochemischen Eigenschaften. Isotoopenmarkierte Analoga haben gegenüber strukturverwandten Substanzen als IS den Vorteil, dass sie aufgrund der identischen Eigenschaften denselben Extraktions-, chromatographischen und massenspektrometrischen Trennbedingungen unterliegen. Im Massenspektrometer ist aufgrund der unterschiedlichen Molekülmasse dennoch eine vom Analyten differenzierte Analyse möglich.

Die Kalibratoren, die Qualitätskontrollen und die Proben selbst werden vor der Probenvorbereitung mit einer konstanten Konzentration des IS versehen. Somit durchlaufen sie im Anschluss den gleichen Arbeitsprozess und unterliegen den gleichen Fehlerquellen wie der Analyt. Das Verhältnis der Peakflächen von IS und dem Analyten der Kalibratorstandards ergibt eine Funktion, welche zur Bestimmung der unbekanntes Analytkonzentration einer Probe verwendet werden kann, um mögliche Matrixeffekte sowie Fehler in der Probenvorbereitung und im Messablauf zu kompensieren.

2.8 Problemstellung und Zielsetzung Arbeit

Die arterielle Hypertonie stellt eine schwere Erkrankung mit der höchsten Morbidität und Mortalität in Deutschland und anderen westlichen Ländern dar. Wesentliche Organschäden umfassen dabei zerebrale Insulte, Herzinfarkte oder chronische Erkrankungen wie Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz und neurologische Erkrankungen. In 20-30% der Fälle zeigt sich jedoch eine Therapieresistenz. Diese Patienten qualifizieren sich aufgrund ihres signifikanten kardiovaskulären Risikoprofils und der Therapieresistenz für interventionelle Therapien der arteriellen Hypertonie. Zuvor gilt es jedoch, eine Therapieresistenz sicher zu diagnostizieren. Denn das fehlende Ansprechen der Therapie kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Neben einer Änderung der Pharmakokinetik aufgrund von Medikamenteninteraktionen oder einer veränderten Rezeptor- oder Enzymaktivität, kann auch eine reduzierte Medikamentenadhärenz für Plasmaspiegelveränderungen verantwortlich sein. Diese muss zunächst

ausgeschlossen werden. Therapeutisches Drug Monitoring hat sich hierbei bereits als nützliches Instrument erwiesen.

In dieser Arbeit wird die Rolle des TDM in der Diagnostik der therapieresistenten arteriellen Hypertonie im klinischen Alltag beleuchtet und diskutiert. Ein besonderes Augenmerk gilt der Detektion mangelnder Medikamentenadhärenz als Ursache der refraktären Hypertonie. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zur simultanen Plasmaspiegelbestimmung der vier Antihypertensiva Metoprolol, Amlodipin, Canrenon als Metabolit von Spironolacton sowie Hydrochlorothiazid. Die Methode soll sich durch robuste, präzise Ergebnisse auszeichnen und aufgrund von kurzen Messzeiten sowie einfacher Probenaufbereitung gut in den klinischen Alltag integrieren lassen. Leistung und Anwendbarkeit der Methode werden daher mit bereits publizierten Nachweisverfahren verglichen. Des Weiteren soll die Methode als validiertes Messverfahren zur Quantifizierung der oben genannten Antihypertensiva am Universitätsklinikum Köln zum Einsatz kommen. In Zusammenarbeit mit dem Herzzentrum der Klinik für Innere Medizin werden Plasmaproben von Patienten mit klinischem Verdacht einer refraktären arteriellen Hypertonie gemessen, um den Mehrwert des TDM in dieser spezifischen Patientengruppe zu evaluieren.

3. Publikation

3.1 Zusammenfassung

Im vorliegenden Artikel wurde eine Multi-Analyt-LC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung der vier antihypertensiven Medikamente Metoprolol, Amlodipin, Canrenon als Hauptmetabolit von Spironolacton sowie Hydrochlorothiazid in humanem Plasma entwickelt.

Zur Probenvorbereitung erfolgte eine Proteinfällung mit Acetonitril. Anschließend wurden die Proben mit einem Mix aus isotopenmarkierten internen Standards für jeden der Analyten versetzt, welche ebenfalls in der internen Standardisierung Anwendung fanden ([²H₇]-MET, [¹³C₆]-AML, [²H₄]-CAN, [¹³C₆]-HCT). Die Kalibratoren sowie Qualitätskontrollen wurden in humanem Plasma vorbereitet. Die chromatographische Trennung erfolgte unter Verwendung einer Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UHPLC) mit einer C₁₈-Säule (50x2,1mm) und einer Partikelgröße von 1.9 µm. Zur isokratischen Elution wurde ein Laufmittelstoffgemisch aus Acetonitril sowie 0,1%-iger Ameisensäure in Ultrapur-Wasser mit einer Laufzeit von 270 µl/min genutzt. Detektion und Selektion der Analyten erfolgte im Quadrupol-Massenspektrometer unter Verwendung einer Elektrospray-Ionisationsquelle, welche für die Analyten AML, MET und CAN im positiven Ionenmodus und für HCT im negativen Ionenmodus betrieben wurde. Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer wurde im Selected-Reaction-Monitoring Modus betrieben, die SRM-Übergänge der Analyten lagen bei m/z 268.2 → 74.1 für MET, m/z 409.1 → 238.0 für AML, m/z 341.2 → 91.0 für CAN und m/z 296.0 → 205.1 für HCT.

Die Elution aller Analyten erfolgte innerhalb von 2,5 Minuten. Die Nachweisgrenzen (LOD) sowie die unteren Bestimmungsgrenzen (LLOQ) lagen bei 0.08 und 0.23; 0.05 und 0.15; 2.82 und 8.54; sowie 0.02 und 0.05 µg/l für MET, AML, CAN und HCT. Der Kalibrierungsbereich zeigte sich linear für MET zwischen 5–750 µg/l, für AML zwischen 1–50 µg/l, für CAN zwischen 10–500 µg/l und für HCT zwischen 5–500 µg/l. Die Interday- und Intraday-Experimente ergaben eine Präzision (CV) zwischen 1.7-14% sowie Richtigkeit mit einem Bias zwischen -2,5 bis 7,1% und lagen somit innerhalb des Akzeptanzkriteriums von ±15%. Die Kurzzeitstabilitätsexperimente ergaben für alle Analyten eine gute Stabilität.

Die Methode konnte bereits erfolgreich im klinischen Alltag erprobt und integriert werden. Es erfolgten 81 Blutspiegelkontrollen aus einer Gruppe von 60 Patienten mit einem Verdacht auf Therapieresistenz. Wenngleich das TDM von antihypertensiven Medikamenten in den Leitlinien zur Behandlung der therapierefraktären arteriellen Hypertonie noch nicht etabliert ist, konnte anhand der Messungen gezeigt werden, dass die Methode eine effektive Möglichkeit zur Detektion von Non-Adhärenz und Blutspiegelschwankungen in der antihypertensiven Pharmakotherapie darstellt.

3.2 Originalpublikation

Mit freundlicher Genehmigung durch den Verlag Elsevier wurde die Originalpublikation mit dem Titel

„Reliable and easy-to-use LC–MS/MS-method for simultaneous determination of the antihypertensives metoprolol, amlodipine, canrenone and hydrochlorothiazide in patients with therapy-refractory arterial hypertension“

auf den folgenden Seiten abgedruckt. In der Publikation werden die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit beschrieben und dargelegt.

Der Artikel wurde am 05. November 2018 im Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis online veröffentlicht.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Reliable and easy-to-use LC–MS/MS-method for simultaneous determination of the antihypertensives metoprolol, amlodipine, canrenone and hydrochlorothiazide in patients with therapy-refractory arterial hypertension

Jan-Ole Johannsen^a, Hannes Reuter^b, Fabian Hoffmann^b, Cornelia Blaich^a,
Martin H.J. Wiesen^a, Thomas Streichert^c, Carsten Müller^{a,*}

^a Center of Pharmacology, Therapeutic Drug Monitoring, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

^b Department of Internal Medicine III, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

^c Institute of Clinical Chemistry, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2018

Received in revised form 31 October 2018

Accepted 1 November 2018

Available online 5 November 2018

Keywords:

Liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry
Antihypertensive drug
Therapeutic drug monitoring
Amlodipine
Canrenone

ABSTRACT

Background: Therapy-refractory arterial hypertension is defined as a blood pressure (BP) in a subset of patients who fail to achieve BP control despite a three-drug regimen (including a diuretic). Various factors have impact on loss of therapy response. Drug-drug-interactions (DDIs) may cause altered pharmacokinetics (PK) of antihypertensive drugs. Upregulation of activity and expression of cytochrome P450 (CYP) enzymes can result in decreased plasma drug levels. Besides these PK considerations a significant problem could be nonadherence to drug therapy. In this regard Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is a useful tool for detecting nonadherence. Therefore a LC–MS/MS-method for determination of Metoprolol (MET), Amlodipine (AML), Canrenone (CAN) and Hydrochlorothiazide (HCT) was developed.

Methods: An UHPLC-MS/MS method was developed and validated for simultaneous determination of MET, AML, CAN and HCT in plasma matrix. Extraction of serum samples consisted of simple protein precipitation using acetonitrile. Stable isotope labeled analogues for each antihypertensive were obtained for internal standardization and quantitative analysis ($[^2\text{H}_7]$ -MET, $[^{13}\text{C}_6]$ -AML, $[^2\text{H}_4]$ -CAN, $[^{13}\text{C}_6]$ -HCT). Calibrators and quality controls were prepared in plasma matrix of normal individuals. Sample preparation: protein precipitation with acetonitrile and addition of internal standard-mix.

Results: All analytes were eluted within a runtime of 2.5 min. Linearity experiments were demonstrated in plasma over following concentration ranges: MET: 5–750 $\mu\text{g/l}$, AML: 1–50 $\mu\text{g/l}$, CAN: 10–500 $\mu\text{g/l}$, HCT: 5–500 $\mu\text{g/l}$ ($R^2 > 0.993$).

Chromatographic separation was achieved using a C18 column (50 \times 2.1 mm, 1.9 μm particle size) and an isocratic elution. LC–MS/MS analyses were performed on a triple quadrupole mass spectrometer using positive and negative electrospray ionization in selected reaction monitoring (SRM) mode. Ion transitions monitored for quantitation were m/z 268.2 \rightarrow 74.1 for MET, m/z 409.1 \rightarrow 238.0 for AML, m/z 341.2 \rightarrow 91.0 for CAN and m/z 296.0 \rightarrow 205.1 for HCT. For all analytes, inter- and intra-day precision (CV, %) varied between 1.7 and 14.0 and inter- and intra-day accuracy values ranged from -2.5 to 7.1%. The lower limits of detection and quantification were: 0.08 and 0.23; 0.05 and 0.15; 2.82 and 8.54; and 0.02 and 0.05 $\mu\text{g/l}$ for MET, AML, CAN and HCT, respectively. Results of stability experiments were within the required range of $\pm 15\%$.

Conclusions: Although the level of recommendation of TDM of antihypertensive drugs in patients with refractory hypertension is not yet established, the present LC–MS/MS-method can serve as an effective tool for detection of PK-alterations/nonadherence and may help to monitor antihypertensive pharmacotherapy.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Center of Pharmacology, Therapeutic Drug Monitoring, University Hospital of Cologne, Gleueler Str. 24, 50931 Cologne, Germany.
E-mail address: c.mueller@uni-koeln.de (C. Müller).

1. Introduction

Almost one-third of the adult population of western countries is affected by arterial hypertension. Non-invasive treatment options consist of lifestyle modification and antihypertensive pharmacotherapy [1]. A subset of patients who fail to achieve blood pressure (BP) control despite a three-drug regimen (including a diuretic) is diagnosed with therapy-refractory arterial hypertension [2]. Various factors have impact on loss or failure of therapy response. Drug-drug-interactions (DDIs) may cause altered pharmacokinetics (PK) of antihypertensive drugs. Upregulation of activity and expression of cytochrome P450 (CYP) enzymes can result in decreased plasma drug levels.

The mechanism of action of MET is explained as a beta-adrenergic antagonism with selective affinity to beta-1 adrenoceptors - located mainly in cardiac muscles. At higher doses, MET also inhibits beta-2 adrenoceptors of bronchial and vascular smooth muscles. Possible mechanisms of antihypertensive effects of MET include: competitive antagonism of catecholamines at peripheral and cardiac adrenergic receptors (resulting in decreased cardiac output), a central effect leading to reduced sympathetic outflow, and suppression of renin activity. The exact mechanism for the beneficial effects of MET in heart failure is unknown. Due to its comparatively short elimination half-life of 3–7 h [3] a sensitive and robust method is a basic requirement for therapeutic drug monitoring.

AML is a long-acting dihydropyridine calcium channel blocker that exerts its effect by blocking the transmembrane influx of calcium ions into cardiac and vascular smooth muscles. It also reduces peripheral vascular resistance and lowers blood pressure by causing a direct vasodilatation in the peripheral arteries of the vascular smooth muscle. Its therapeutic effect on angina may be through a decrease in peripheral resistance (exertional angina) and inhibition of coronary spasm (vasospastic angina) [4].

CAN is the dethioacetylated (non-sulfur containing) metabolite of spironolactone. This metabolite is considered to be primarily responsible for the drug's therapeutic effects. Approximately 25%–30% of an administered dose of spironolactone is converted to CAN. CAN is reported to account for one-tenth to one-fourth of the antimineralocorticoid activity, after single and multiple doses, respectively [5].

The primary action of the thiazides is to increase diuresis by blocking the reabsorption of sodium and chloride in the distal tubule and therefore an accompanying amount of water. The thiazides are actively secreted at the proximal tubule into the lumen of the nephron and travel through the loop of Henle to the distal tubule. In the early distal tubule the thiazides compete at the sodium chloride co-transporter which actively pumps sodium and chloride, against its concentration gradient, out of the tubule. Diuresis occurs because the blockage of electrolyte reabsorption also stops the reabsorption of water and therefore increases urine output.

Besides these PK considerations a significant problem could be nonadherence to drug therapy. In this regard Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is a powerful tool for detecting of non-adherence to medication. Therefore, an easy-to-use LC-MS/MS-method for the determination of Metoprolol (MET), Amlodipine (AML), Canrenone (CAN) and Hydrochlorothiazide (HCT) in plasma was developed. In addition, isotopically labeled internal standards (ISTD) were used for each analyte to compensate for possible matrix effects as a potential source for analytical imprecision. The present method was implemented into a clinical TDM service to help guide decision makings related to pharmacotherapy in patients with therapy-refractory arterial hypertension.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Acetonitrile (ACN) and formic acid, used for precipitation and chromatographic separation, were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol (MeOH), used for stock and working solutions, was purchased from Roth (Karlsruhe, Deutschland). UHPLC grade, deionized water was produced by a Milli-Q Plus ultrapure water system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

The internal standards [²H₇]-MET-hydrochloride, [²H₄]-CAN, [¹³C₆]-HCT were purchased from Alsachim (Graffenstaden, France). The ISTD [¹³C₆]-AML-benzenesulfonate as well as the analytes AML-besylate, HCT, MET-tartrate, CAN were obtained from Sigma Aldrich (Schnellendorf, Germany).

Different blank plasma used for method validation, were kindly provided by the Department of Transfusion Medicine of the University Hospital of Cologne.

2.2. Instrumentation and LC-MS conditions

The analysis was achieved using an ultrahigh-pressure-liquid-chromatography (UHPLC) with a Hypersil Gold column (Thermo Scientific, 50 × 2.1 mm, 1.9 μm particle size) for separation of analytes, coupled with a Tandem TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer from ThermoFisher Scientific (San Jose, CA, USA) for detection. The tandem-LC-MS/MS consists of an Accela 1250 UHPLC Pump and an Accela Autosampler.

Detection and selection of analytes occurred by heated positive electrospray ionization (HESI) for AML, MET and CAN. HCT was measured in a negative ion mode. Spray voltage was adjusted to 3.5 kV, with a capillary temperature of 300 °C and a vaporizer temperature of 350 °C. Pure nitrogen was applied as sheath- and auxiliary gas using 25 and 5 arbitrary units.

The HPLC-column was thermostatted at 45 °C using isocratic conditions (50% A/50% B) of two mobile phases consisting of 100% acetonitrile (Elution A) and 0.1% formic acid in ultrapure water (Elution B), with a flow-rate of 270 μl/min, resulting in a column pressure of about 260 bar. The injection volume was 5 μl, runtime of analysis was set to 2.5 min. Thermo Scientific software LCQuan (version 2.6) was used for evaluation of chromatograms and integration of peak areas.

2.3. Stock solutions, calibration standards and quality controls

Separate primary stock solutions for calibration standards (CS: CS1–CS7) and for internal quality controls (IQC: IQC1–IQC3) for AML, HCT, MET and CAN were prepared in various compositions of ultra-pure water and/or methanol depending on individual solubility properties of the analytes indicated on the certificates of analyses. Working stock solutions were prepared by diluting the individual primary stock solutions in methanol/water (50/50%; v/v) for AML, HCT and MET. The primary stock solution for CAN was diluted in 100% MeOH as well as the separate working stock solution. Different blank plasma lots, provided by the Department of Transfusion Medicine, University Hospital of Cologne, were spiked with working stock solutions to obtain seven CS and three IQC (IQC1: low concentration, IQC2: middle concentration, IQC3: high concentration, see Table 1) concentrations. Relations of working stock solution volumes to blank plasma volumes were kept constant at 2%. IQC samples contained all analytes in low, medium and high concentration. All CS and IQC samples were prepared in 25 ml blank plasma, aliquoted 500 μl each and stored at –18 °C. A mixture of all internal standards was prepared in methanol/water (100%

Table 1
Validation of linearity according to Kromidas⁵.

Analyte	Concentration ranges (µg/l)	Test value $F_{\text{calc}} = Ds^2/S_{yQ}^2$	F_{tab} value	Proof of linearity
MET	5.0–750.0	3.77	21.20	yes: $y = 0.03170x + 0.2704$, $R^2 = 0.9939$
AML	1.0–50.0	0.46	21.20	yes: $y = 0.0151x - 0.00247$, $R^2 = 0.9952$
CAN	10.0–500.0	1.45	21.20	yes: $y = 0.0257x - 0.0281$, $R^2 = 0.9995$
HCT	5.0–500.0	0.28	21.20	yes: $y = 5.19E-06x + 5.71E-06$, $R^2 = 0.9949$

Ds^2 : variance difference, S_{yQ}^2 : variance of quadratic regression fit, MET: metoprolol, AML: amlodipine, CAN: canrenone, HCT: hydrochlorothiazide.

MeOH). The concentrations of the analytes of CS and IQC samples are shown in Supplemental data (Table 1).

2.4. Sample preparation

Aliquots of CS and IQC were thawed at $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ and briefly vortexed (Bender and Hobein, Zurich, Switzerland). Residual material of the aliquots was discarded after each single experiment, only fresh aliquots were used for validation procedures. Volumes of $V_{\text{plasma}} = 100 \mu\text{l}$ plasma were mixed with $V_{\text{STD}} = 50 \mu\text{l}$ of internal standards and precipitated with acetonitrile $V_{\text{ACN}} = 200 \mu\text{l}$. After homogenization by vortexing for $t = 30\text{ s}$ and centrifugation at $\vartheta = 4^\circ\text{C}$, $15,000\text{ g}$ for $t = 10\text{ min}$ (Eppendorf, Hamburg, Germany), $V = 140 \mu\text{l}$ of the supernatants were transferred to LC–MS glass vials (Macherey–Nagel) and subjected to LC–MS/MS analysis.

2.5. Method validation

Validation steps were the comparison between serum and plasma, linearity experiment, intra-day- and inter-day accuracy and precision, determination of limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ), carryover, stability and recovery as well as matrix effects. Amongst others, linearity experiments were verified according to Kromidas [6], LOD and LLOQ were calculated according to ICH [7], matrix effects were assessed and stability experiments were conducted for various conditions (freeze–thaw, post-preparative, bench). Finally, the validated method was used to simultaneously determine the concentration of all four analytes exemplary in a patient with therapy-refractory hypertension. In addition, a subset of 60 patients with refractory hypertension and was monitored with a focus on antihypertensive drug level analysis.

2.6. Linearity

Linearity of the method was proven for all analytes by plotting peak area ratios of AML, MET, CAN, HCT and the corresponding internal standard signals versus the nominal concentrations of the 7 CS concentrations (CS1–CS7, see supplemental Table 2) in heptaplicates ($n = 7$). Linearity was evaluated according to Mandel [6] comparing residual SDs of linear regression and a quadratic

regression to investigate whether quadratic regression resulted in a significantly better fit. Calculated F values (F_{calc}) found at the 99% confidence level were then compared with the tabulated limit F_{tab} . F_{calc} values lower than those reported in the tabulated limit indicate a significantly better fit for linear regression.

Calibration curves within a sample set for determination of IQC samples were obtained by using weighted linear least squares regression analysis. Weighting factor for MET, HCT and CAN was $1/\chi^2$ and $1/\chi$ for AML. Requirement for calculated intra-day and inter-day difference between calculated and nominal concentration of each analyte concentration was based on relative standard deviation (RSD) $\leq 15\%$.

IQC1, IQC2 and IQC3 as well as blank samples were analyzed with each calibration curve ($n = 2$). CS concentrations for AML were 1, 10, 15, 25, 35, 45 and $50 \mu\text{g/l}$, for MET 5, 50, 125, 250, 375, 500 and $750 \mu\text{g/l}$, for HCT 5, 75, 150, 250, 350, 450 and $500 \mu\text{g/l}$ and for Can 10, 75, 150, 250, 350, 450 and $500 \mu\text{g/l}$.

2.7. Limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ) and carryover

Six individual blank plasma samples were extracted with and without internal standard ($n_{\text{total}} = 24$) and the standard deviations of the blank responses were determined. Additionally, a calibration curve was generated to determine the slopes of the regression lines. The LOD was calculated according to ICH [7] by dividing 3.3 times the standard deviation of the blank response (sigma) by the slope of the regression line (S) ($\text{LOD} = 3.3 \times \text{sigma}/S$) and the LLOQ was calculated by dividing 10 times the standard deviation by the slope of the regression line ($\text{LLOQ} = 10 \times \text{sigma}/S$). Carryover was assessed by alternately injecting the highest calibration standard mix and six different lots of blank plasma samples. Carryover was calculated as the analyte peak area ratio of blank sample and the preceding calibration standard sample.

2.8. Accuracy and precision

Extracted blank plasma with and without internal standards was analyzed prior to each calibration in order to show the absence of any significantly interfering signals at baseline. Intra-

Table 2
Precision and accuracy at the three IQC levels for the intra-day- and inter-day-assay.

Analyte	IQC level	Specified concentration (µg/l)	INTRA-DAY (N = 7)		INTER-DAY (N = 7)	
			Precision, RSD (%)	Accuracy, bias (%)	Precision, RSD (%)	Accuracy, bias (%)
MET	IQC1	10.0	2.92	6.76	5.90	8.10
	IQC2	225.0	2.81	0.98	4.47	1.66
	IQC3	600.0	1.68	4.55	3.84	4.45
AML	IQC1	5.0	6.01	6.85	4.04	4.17
	IQC2	30.00	2.19	−0.17	3.76	−2.18
	IQC3	48.00	4.32	1.06	3.04	0.36
CAN	IQC1	10.0	8.34	7.08	11.29	1.93
	IQC2	225.0	5.25	−2.46	2.50	−1.58
	IQC3	480.0	4.17	0.78	4.20	2.67
HCT	IQC1	10.0	12.67	4.77	14.01	−0.48
	IQC2	225.0	5.57	2.81	4.32	0.39
	IQC3	480.0	2.44	4.11	6.28	2.05

day variability was determined by repeated measurements of IQC specimens at lower (IQC1), middle (IQC2) and high (IQC3) concentration on the same day ($n = 7$). Inter-day variability of the method was assessed by measuring the IQC (low, middle, high concentration) samples in duplicate on seven different days. Precision was calculated as ratio of the concentration standard deviation and the mean concentration, expressed as relative standard deviation (RSD). Accuracy was calculated as ratio of mean and specified concentration, expressed as bias (%). Within-run and between-run accuracy and precision should not exceed 20% (within $\pm 20\%$ of the nominal value or within CV value $<20\%$).

2.9. Serum-plasma-comparison

Pooled human serum ($n = 6$) as well as pooled citrate plasma ($n = 6$) were spiked with stock solution containing a mix of all analytes to obtain concentrations within the working range of the CS samples: [AML] = 25 $\mu\text{g/l}$, [HCT] = 250 $\mu\text{g/l}$, [MET] = 250 $\mu\text{g/l}$ and [CAN] = 250 $\mu\text{g/l}$. A total of $n = 10$ samples of the spiked serum and of the spiked plasma were extracted and analyzed. The results were then evaluated using a Student's t -test (differences were calculated based on mean t -test). If the calculated t was larger than the critical one, the difference was considered to be significant.

2.10. Recovery and suppression-enhancement-ionization-experiment (SEI-experiment)

Extraction recovery was determined by comparing the peak area ratios of extracted QC samples (pre-spike) at low, middle and high concentration to those of post-extracted (spiked after precipitation) plasma blanks, using six different plasma units at each concentration for freshly preparing all samples ($n = 6$). Extracted and post-extracted assays were prepared at equal concentrations by spiking with working stock solutions, similar to the assembly of QC's and the ISTD-mixture of all internal standards.

To assess relative matrix effects, results were evaluated by comparing the mean value of total area ratios of extracted and post-extracted plasma samples as well as the quotients of the analyte peak area ratios and the referring ISTD peak area ratios.

To visualize suppression-ionization- (SI) and/or enhancement-ionization-effects (EI), a post-column-infusion-experiment was performed, constantly infusing a prepared working solution containing all analytes at concentrations similar to CS7, with syringe pump function connecting to a tee union, while injecting six different extracted blank plasma samples. The flow rate of the mobile phase was set to 250 $\mu\text{l/min}$, combined with a syringe pump flow of 20 $\mu\text{l/min}$, resulting in an overall flow rate of 270 $\mu\text{l/min}$, equal to the original method setting.

2.11. Stability

For bench stability QC's were thawed and kept at room temperature for 24 h, then precipitated and analyzed ($n = 4$).

Autosampler stability was proved by placing extracted QC samples at low and high concentration in the LC-MS autosampler at an average temperature of 20 °C for 24 h ($n = 4$). Freeze-thaw stability was performed by thawing IQC1-, IQC2- and IQC3-samples for one hour at room temperature followed by refreezing at $\vartheta = -18\text{ }^\circ\text{C}$. This cycle was repeated four times. Samples were extracted and analyzed, and obtained results compared to response obtained using freshly extracted QC samples within one day ($n = 3$).

2.12. Clinical management and application

A subgroup of 60 patients treated and monitored at the Heart Center of the University Hospital of Cologne who are considered to have refractory hypertension underwent assessment of anti-hypertensive pharmacotherapy using LC-MS/MS detection. The non-detection of an expected antihypertensive drug ($<\text{LLOQ}$) was defined as non-adherence to the prescribed antihypertensive medication lasting at least as long as its four half-lives. As an example, the absence of amlodipine in blood (half-lives about 35–70 h; 4 half-lives about 140–280 h) means that the medication was not taken for at least 6 days prior to the sample collection [8].

In addition, MET, AML, CAN and HCT plasma concentrations were determined in a clinical case of a 56-year-old male patient with a history of severe coronary heart disease, three cerebral insults within 30 years, therapy-refractory hypertension. Drug concentrations of all relevant antihypertensives and patient's data were then processed by a commonly used pharmacokinetic program MWPharm++ [9]. Simulations of time-concentration-profile as well as the observed data were fitted and pharmacokinetic parameters were investigated based on a compartmental modeling and a Bayesian fitting procedure.

3. Results

3.1. LC-MS/MS and optimization

Specificity and selectivity were optimized by direct infusion experiments, yielding determined SRM transitions for each analyte. Full scans for AML, MET and CAN were conducted in positive electrospray ionization mode, whereas HCT was optimized in negative ESI mode with a maximum of signal intensity.

The mean retention times were as follows: $R_t = 0.60$ min for AML, $R_t = 0.49$ min for MET, $R_t = 0.51$ min for HCT and $R_t = 1.39$ min for CAN. The related internal standard peaks equally appeared at the assigned time, respectively.

The following selected reaction monitoring transitions were found during method optimization (quantifier/qualifier): AML m/z 409.1 \rightarrow 238.0/294.1; MET m/z 268.2 \rightarrow 74.1/116.1; HCT m/z 296.0 \rightarrow 205.1/269.0 and CAN m/z 341.2 \rightarrow 91.0/107.1; stable isotope labeled analogues for each antihypertensive for internal standardization and quantitative analysis: [$^2\text{H}_7$]-MET m/z 275.2 \rightarrow 123.2; [$^{13}\text{C}_6$]-AML m/z 415.1 \rightarrow 244.1; [$^2\text{H}_4$]-CAN m/z 345.2 \rightarrow 107.1; [$^{13}\text{C}_6$]-HCT m/z 302.0 \rightarrow 275.1.

Chemical structures and representative chromatograms are depicted in Figs. 1 and 2.

3.2. Linearity

Linearity experiments were demonstrated in plasma over the following concentration ranges:

MET: 5–750 $\mu\text{g/l}$, AML: 1–50 $\mu\text{g/l}$, CAN: 10–500 $\mu\text{g/l}$, HCT: 5–500 $\mu\text{g/L}$. The regression coefficient (R^2) for each analyte was >0.993 . The most accurate calibration was achieved using the weighting factor $1/\chi^2$ for MET, HCT, CAN and $1/\chi$ for AML.

3.3. Precision, accuracy and LOD/LOQ

Results from the intra-day assay and inter-day assays for AML, MET, CAN and HCT, both, inter- and intra-day precision (CV, %), ranged from 1.7 to 14.0% and accuracy values ranged from -2.5 to 7.1% (see Table 1). Precision and accuracy for all analytes remained within the acceptable range of $\pm 15\%$ in accordance with the standards of US FDA guidance [10].

The determined lower limits of detection and quantification were: 0.08 and 0.23 $\mu\text{g/l}$ for MET, 0.05 and 0.15 $\mu\text{g/l}$ for AML, 2.82

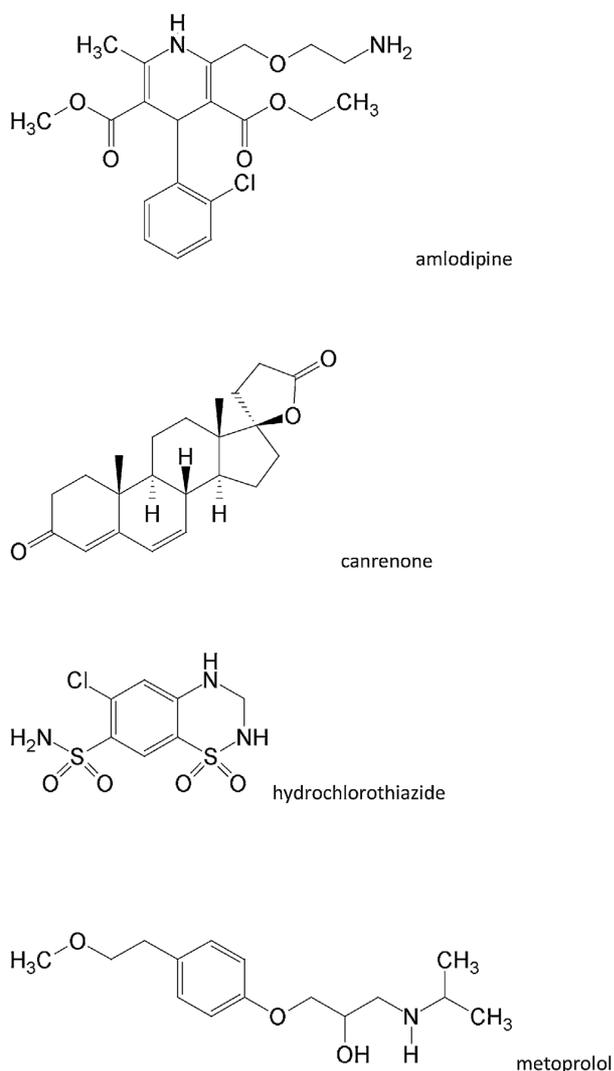


Fig. 1. Chemical structures of AML, CAN, HCT and MET.

Table 3
Calculated limits of detection and lower limits of quantification for all four analytes.

Analyte	LOD ($\mu\text{g/l}$)	LLOQ ($\mu\text{g/l}$)
MET	0.08	0.23
AML	0.05	0.15
CAN	2.82	8.54
HCT	0.02	0.05

and 8.54 $\mu\text{g/l}$ for CAN, as well as 0.02 and 0.05 $\mu\text{g/l}$ for HCT, respectively

3.4. Serum-plasma comparison and stability

A significant difference was observed between serum and plasma samples with regard to calculated concentration of MET. No difference was found for AML, CAN and HCT in plasma and serum. In conclusion, we recommend using heparin plasma samples to guarantee the most precise results for all analytes. All analytes were stable during short-term stability experiments and showed results within the required acceptance criterion range of $\pm 15\%$ (see Table 3).

3.5. Recovery and suppression-enhancement-ionization-experiment (SEI-experiment)

After precipitation with ACN recovery was stable and consistent for all analytes (although the experiment revealed distinctive matrix effects regarding the HCT-analyte). The recovery results varied within a range from 80.36% (IQC1) to 101.44% (IQC3) for HCT. Mean values for AML, MET and CAN were about 100%.

A post-column infusion experiment visibly revealed the matrix effects. The resulting chromatograms were compared to those of usual analytical parameters at determined retention time by overlaying both chromatograms (see Fig. 3), to assess suppression/enhancement-ionization-effects. Colored graphs correlate with the plasma interfering signals and respective analyte peaks are underlined in grey. For MET, AML and HCT there is an apparent overlap between the interfering matrix effects and the peak area of the analyte, resulting in a measurable ion-suppression-effect. However, no relative MEs were observed for all analytes ($<15\%$ for all analytes), indicating that the use of isotopically labeled internal standards fully compensated for MEs.

3.6. Clinical management and application

This method was successfully established to monitor drug-concentrations in 81 plasma samples obtained from 60 subjects with resistant hypertension at the Heart Center of the University Hospital of Cologne. Daily medication dosage varied between 5–10 mg/d (AML), 12.5–50 mg/d (HCT), 47.5–190 mg/d (MET) and 25–150 mg/d (CAN) and sample collection times were performed, as far as the clinical procedure allowed, between 08:00 and 13:00 o'clock. Patients' age, gender, medication and medication dosage, relevant diseases apart from arterial hypertension e.g. renal failure, cirrhosis of the liver or coronary artery disease were documented for each sample. Concentrations below LLOQ were found in 7 samples out of 51 for AML, 5 out of 19 for MET, 12 out of 59 for HCT and 21 out of 52 relating to CAN. Based on the definition of non-adherence the proportion of non-adherent patients to treatment of the investigated population was found to be 25%.

Median plasma concentrations (95%-confidence intervals) were as follows: $9.7 \pm 2.6 \mu\text{g/l}$ for AML, $32.5 \pm 12.9 \mu\text{g/l}$ for MET, $51.5 \pm 12.4 \mu\text{g/l}$ for HCT and $61.7 \pm 13.8 \mu\text{g/l}$ for CAN. Although median plasma concentrations do not serve as therapeutic drug level ranges, corresponding confidence intervals may provide an evidence to help to evaluate patients' adherence.

Furthermore a clinical case of a 56-year-old male patient (106 kg body weight, 190 cm size, BMI 29.6 kg/m²) with a history of severe coronary heart disease, three cerebral insults within 30 years, therapy-refractory hypertension treated by quadruple-therapy with MET (95 mg BID, twice daily), AML (5 mg BID, twice daily), CAN (50 mg of spironolactone once daily) and HCT (12.5 mg once daily) is reported in our TDM-setting.

Drug concentrations of all relevant antihypertensives and patient's data (gender, age, weight, height) as well as the prescribed amount of antihypertensives were processed by a commonly used pharmacokinetic program MWPharm++ [9]. Pharmacokinetic parameters were investigated based on a compartmental modeling and a Bayesian fitting procedure. Elimination half-life was calculated as follows:

$$-t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z(\text{elimination}, \lambda_z)$$

is the rate constant corresponding to the terminal elimination).

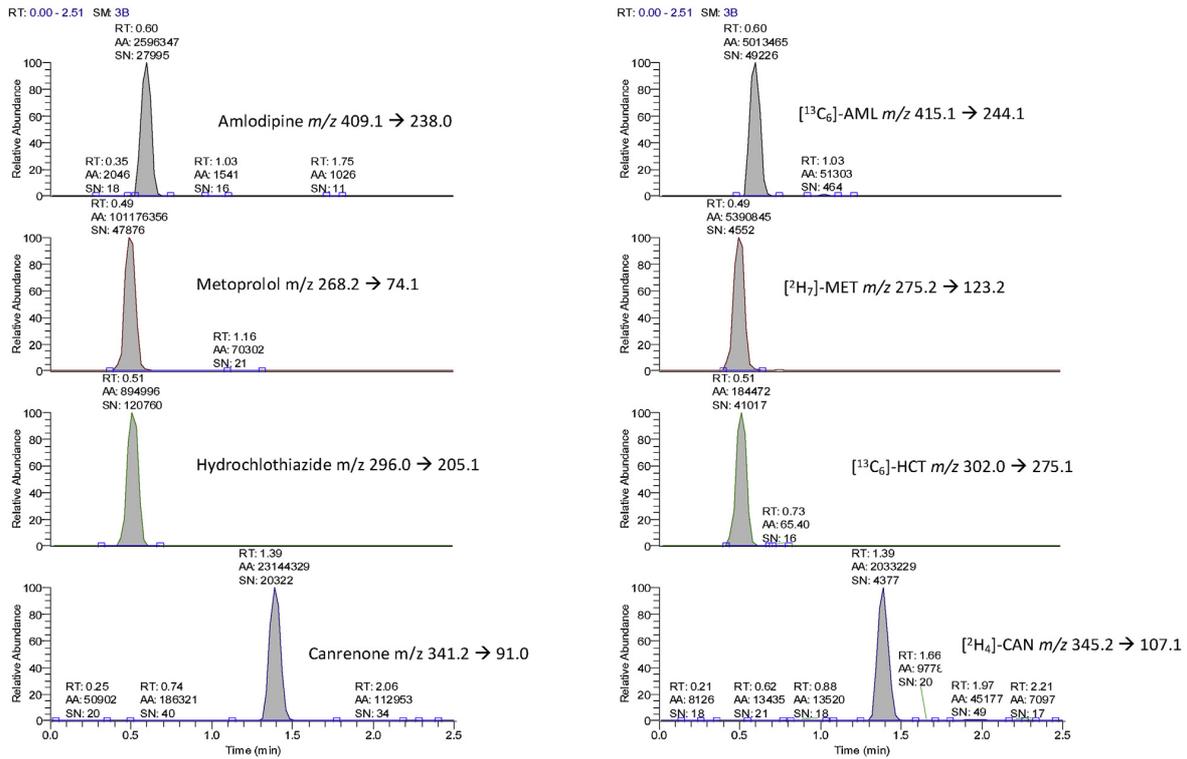


Fig. 2. Representative chromatograms of an extracted calibration standard, high concentration range (CS7).

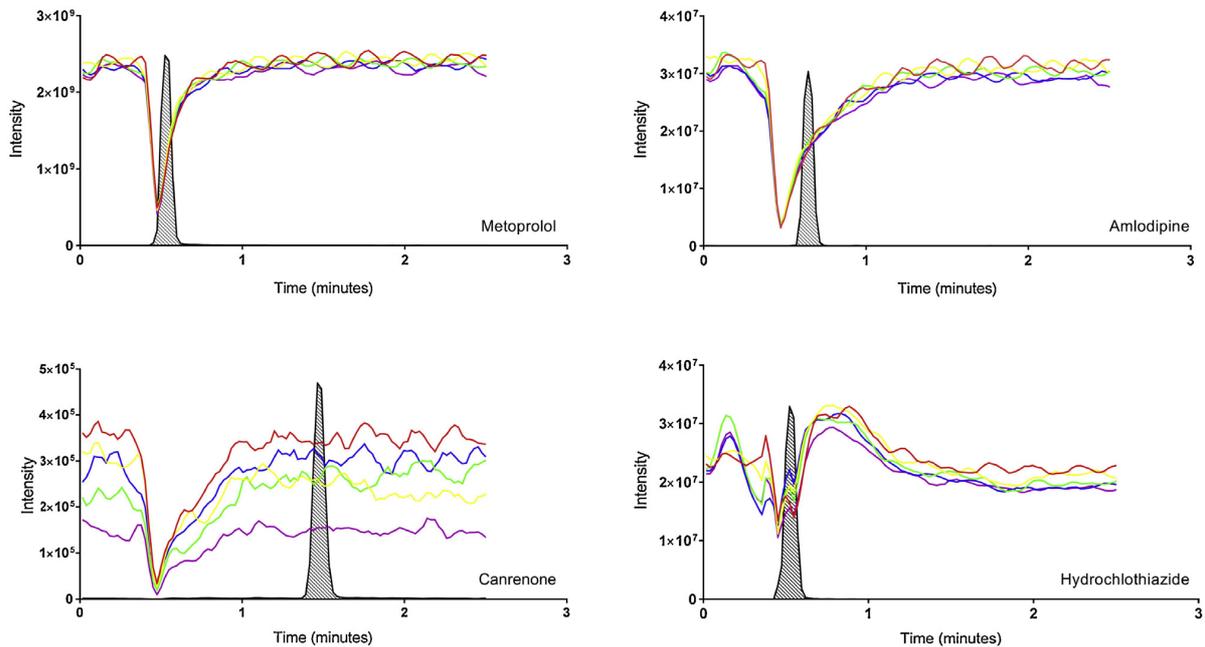


Fig. 3. Ion-suppression-enhancement experiments after post-column-infusion: drifts and shifts of MS/MS signal intensities of continuously infused MET, AML, CAN and HCT during analysis of 5 extracted blank plasma samples (indicated by colored lines). MS/MS signal intensities were plotted against time, and representative chromatograms are shown (black line).

Fig. 4 illustrates the obtained antihypertensive concentration levels (colored dots, green and red) and levels and the software generated time-concentration profiles (solid-line).

Calculated elimination-half-lives were as follows: MET: $t_{1/2MET} = 4.6$ h ($t_{1/2pop, MET} = 3.2 \pm 0.2$);

AML: $t_{1/2AML} = 46.2$ h ($t_{1/2pop, AML} = 39 \pm 8$ h); CAN: $t_{1/2CAN} = 22.8$ h ($t_{1/2pop, CAN} = 11.2 \pm 2.3$ h); HCT: $t_{1/2HCT} = 7.39$ h ($t_{1/2pop, HCT} = 2.5 \pm 0.2$ h), reference PK-data enclosed in parenthesis [11].

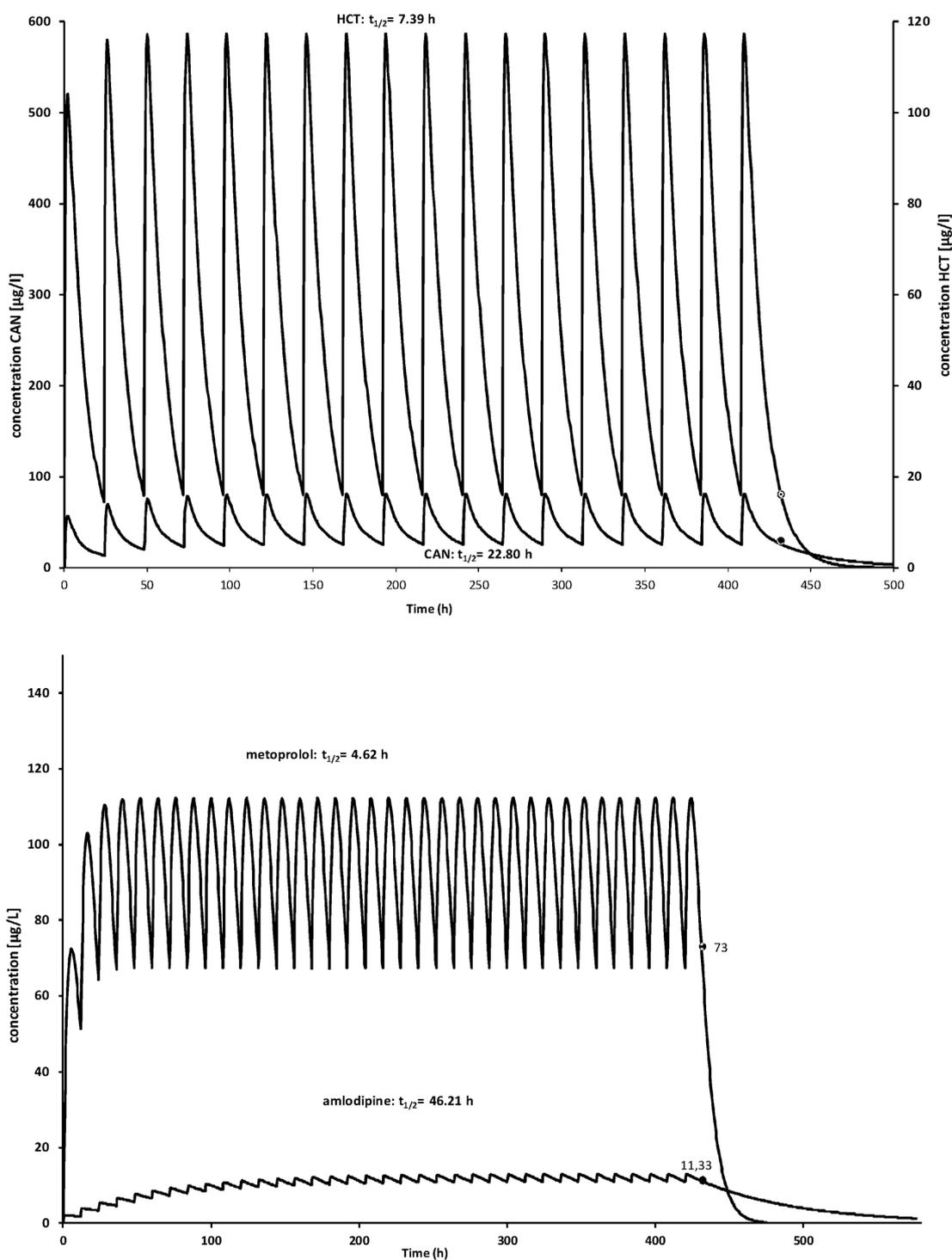


Fig. 4. Simulated time concentration profiles versus measured values (black dots, corresponding results in µg/l) in a 56-year-old male patient under quadruple-therapy with MET, AML, CAN and HCT. The observed drug concentrations were within the expected concentration ranges. Elimination half-lives were calculated based on pharmacokinetic evaluation using MWPharm++-software. (For interpretation of the references to colour in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

Therapeutic Drug Monitoring is helpful and indicated to monitor efficacy, non-adherence (to medication), drug-drug interactions and to avoid toxicity of different groups of pharmacotherapeutics:

psychopharmacological drugs, antiepileptics, antifungals, antiviral drugs, immunosuppressants, anti-infectives, anticancer drugs and drugs affecting cardiovascular system [12].

In the context of an effective antihypertensive pharmacotherapy TDM is usually not appropriate for the majority of antihyperten-

sive drugs, as their effects can be easily assessed clinically (blood pressure). In contrast, non-adherence to antihypertensive pharmacotherapy for treatment of refractory hypertension is an important cause of cardiovascular morbidity and mortality. Patients with therapy-refractory hypertension and questionable adherence will therefore benefit from TDM of antihypertensive drugs [13,14]. A loss of efficacy is often related to a switch of antihypertensives, without implementation of TDM service to evaluate drug exposure. In case of non-adherence TDM is therefore a powerful health care service as an instrument to evaluate a loss of efficacy or poor response to pharmacotherapy.

Based on previously described LC–MS/MS-methods, we applied a rapid and sensitive method to determine four commonly used antihypertensives in a Therapeutic Drug Monitoring setting. Several methods for the analysis of MET, AML, CAN and HCT in serum or plasma have used mass spectrometric detection technologies [15–30].

Most of the preceding liquid chromatography methods used liquid–liquid [16,17,27,29] or solid-phase-extraction modes [18,25] with different analytical columns. Although matrix effects are reduced to a minimum, both liquid-liquid- and solid-phase-extraction procedures are time consuming and furthermore relatively large plasma or serum sample volumes (>0.5 ml) are required [15]. De Nicolò et al. [24] provided another method for the determination of ten different antihypertensive drugs using protein precipitation as described in the present method. However, this method includes a 1.5 h drying step during precipitation, and a chromatographic runtime of 10 min for each plasma sample is required in order to limit matrix effects.

Huang et al. [31] reported an HPLC–UVD-method for the determination of CAN with a LOD of 100 µg/l and a LLOQ of 500 µg/l, which may be not sufficient for valid interpretation of serum levels, in particular when assessing adherence to medication, and implementation in a TDM service.

Other published methods [17,18], especially related to AML, may not cover an adequate width of measurable target concentration ranges for clinical analysis, providing upper determination limits of ≤10.1 µg/l, only.

LC–MS/MS is considered the gold standard and routinely applied for therapeutic drug monitoring [18]. In general, our developed method corresponds to the methods already published in the literature. The improvements we are proposing refer to the sample preparation process based on a simple protein precipitation protocol, use of isotopically labelled internal standards in order to compensate for matrix effects and implementation of CAN to the present method. Our assay is an alternative method for the determination of AML, CAN, HCT and MET in small sample volumes and minimizes costs in terms of time and material. Moreover this method does not only show high sensitivity but also a high specificity as no significantly interfering peaks were observed in chromatograms of serum blanks.

Additionally in the present work we performed TDM by measurement of antihypertensive drug levels in 81 blood samples in a subgroup of 60 patients who are considered to have refractory hypertension. The proportion of patients with non-adherence to antihypertensive treatment of the investigated population was found to be 25%, which is in line by previously findings of Tomaszewski et al. [32].

Moreover software assisted evaluation of drug exposure can help to detect pharmacokinetic conspicuities (concentration below LLOQ, or change of peroral bioavailability). Drug–drug interactions, as well as up- and downregulation of metabolic enzymes may impact on a change in elimination half-life. This is of relevance, because most of the patients with therapy-refractory hypertension take a variety of different drugs and the potential off drug–drug interactions is often unknown. Therefore, a case of a patient with

history of therapy refractory arterial hypertension was evaluated with regard to pharmacokinetic properties of each antihypertensive: MET, AML, CAN and HCT.

AML is extensively metabolised via liver (no significant presystemic or first-pass metabolism) with a terminal elimination half-life of 40–50 h [4,33]. Although this half-life is comparably long, the calculated elimination half-life of AML of the patient with arterial hypertension (see Fig. 4) was in the expected range $t_{1/2\text{AML}} = 46.2 \text{ h}$ ($t_{1/2\text{pop, AML}} = 39 \pm 8 \text{ h}$). Summarized, calculated elimination half-life of MET, AML, CAN and HCT all were found in the upper area of the expected range as an expression of decreased renal function. Based on our present findings, non-adherence to medication was excluded in this patient.

5. Conclusions

We have established this method with isotopically labeled internal standards as standard practice for the measurement of antihypertensive drugs and CAN in particular via LC–MS/MS-methods. Although the level of recommendation of TDM of antihypertensive drugs in patients with therapy-refractory hypertension is not yet established, the present LC–MS/MS-method can serve as an effective tool for detection of PK-alterations/nonadherence and may help to monitor antihypertensive pharmacotherapy. Ease of use of the present method provides the opportunity of applying it in clinical studies to define therapeutic drug level ranges and it might also be used – once implemented into the present method – to determine antihypertensive drugs within only one method, hence replacing all the different methods that are currently in use, thus optimizing the cost effectiveness of the TDM.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.002>.

References

- [1] O. Chung, W. Vongpatanasin, K. Bonaventura, Y. Lotan, C. Sohns, W. Haverkamp, M. Dorenkamp, Potential cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring in patients with resistant hypertension, *J. Hypertens.* 32 (12) (2014) 2411–2421, discussion 2421.
- [2] E. Pimenta, K.K. Gaddam, S. Oparil, Mechanisms and treatment of resistant hypertension, *J. Clin. Hypertens. (Greenwich, Conn.)* 10 (3) (2008) 239–244.
- [3] Lp.F. AstraZeneca, Product Information: TOPROL-XL[®] Oral Extended Release Tablets, Metoprolol Succinate Oral Extended Release Tablets, AstraZeneca LP (per FDA), Wilmington, DE, 2012, 2001.
- [4] P. Labs, Product Information: NORVASC[®] Oral Tablets, Amlodipine Besylate Oral Tablets New York, NY 2010, 2001.
- [5] H.W. Overdiek, F.W. Merkus, The metabolism and biopharmaceutics of spironolactone in man, *Rev. Drug Metab. Drug Interact.* 5 (4) (1987) 273–302.
- [6] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, 2011.
- [7] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005, Available at <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- [8] P. Gupta, P. Patel, R. Horne, H. Buchanan, B. Williams, M. Tomaszewski, How to screen for non-adherence to antihypertensive therapy, *Curr. Hypertens. Rep.* 18 (12) (2016) 89.
- [9] A. Fuchs, C. Csajka, Y. Thoma, T. Buclin, N. Widmer, Benchmarking therapeutic drug monitoring software: a review of available computer tools, *Clin. Pharmacokinet.* 52 (1) (2013) 9–22.
- [10] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Available at, 2001 <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm>.
- [11] L. Brunton, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, twelfth edition, McGraw-Hill Companies, Inc., 2011, pp. 1–2084.
- [12] J.E. Adaway, B.G. Keevil, Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 883–884 (2012) 33–49.

- [13] V. Avataneo, A. De Nicolo, F. Rabbia, E. Perlo, J. Burrello, E. Berra, M. Pappaccogli, J. Cusato, A. D'Avolio, G. Di Perri, F. Veglio, Therapeutic drug monitoring-guided definition of adherence profiles in resistant hypertension and identification of predictors of poor adherence, *Clin. Pharmacol.* 84 (11) (2018) 2535–2543.
- [14] S. Brinker, A. Pandey, C. Ayers, A. Price, P. Raheja, D. Arbiq, S.R. Das, E.A. Halm, N.M. Kaplan, W. Vongpatanasin, Therapeutic drug monitoring facilitates blood pressure control in resistant hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (8) (2014) 834–835.
- [15] J. Antunes Nde, R.C. Cavalli, M.P. Marques, V.L. Lanchote, Stereoselective determination of metoprolol and its metabolite alpha-hydroxymetoprolol in plasma by LC–MS/MS: application to pharmacokinetics during pregnancy, *Chirality* 25 (1) (2013) 1–7.
- [16] D.V. Bharathi, K.K. Hotha, P.K. Chatki, V. Satyanarayana, V. Venkateswarlu, LC–MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics, *Bioanalysis* 4 (10) (2012) 1195–1204.
- [17] K.K. Hotha, S. Roychowdhury, R. Mullangi, L.K. Ravindranath, Rapid quantification of amlodipine enantiomers in human plasma by LC–MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.: BMC* 27 (9) (2013) 1192–1199.
- [18] R.R. Kallem, R. Mullangi, K.K. Hotha, L.K. Ravindranath, Y.N. Spoorthy, J.V. Seshagirirao, Simultaneous estimation of amlodipine and atenolol in human plasma: a sensitive LC–MS/MS method validation and its application to a clinical PK study, *Bioanalysis* 5 (7) (2013) 827–837.
- [19] Z. Qian, J. Le, X. Chen, S. Li, H. Song, Z. Hong, High-throughput LC–MS/MS method with 96-well plate precipitation for the determination of arotinolol and amlodipine in a small volume of rat plasma: Application to a pharmacokinetic interaction study, *J. Sep. Sci.* 41 (3) (2018) 618–629, <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201700784>, Epub 2017 Dec 11.
- [20] M.R. Rezk, K.A. Badr, Development, optimization and validation of a highly sensitive UPLC–ESI–MS/MS method for simultaneous quantification of amlodipine, benazepril and benazeprilat in human plasma: application to a bioequivalence study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98 (2014) 1–8.
- [21] M.M. Salim, W.M. Ebeid, N. El-Enany, F. Belal, M. Walash, G. Patonay, Simultaneous determination of aliskiren hemifumarate, amlodipine besylate, and hydrochlorothiazide in their triple mixture dosage form by capillary zone electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 37 (9–10) (2014) 1206–1213.
- [22] R. Taguchi, T. Naito, H. Sato, J. Kawakami, Validated LC–MS/MS method for the simultaneous determination of amlodipine and its major metabolites in human plasma of hypertensive patients, *Ther. Drug Monit.* 39 (6) (2017) 625–631.
- [23] M. Yacoub, A.A. Awwad, M. Alawi, T. Arafat, Simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin with its metabolites: ortho and para hydroxy atorvastatin; in human plasma by LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 917–918 (2013) 36–47.
- [24] A. De Nicolo, V. Avataneo, F. Rabbia, G. Bonifacio, J. Cusato, C. Tomasello, E. Perlo, P. Mulatero, F. Veglio, G. Di Perri, A. D'Avolio, UHPLC–MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 535–541.
- [25] D. Liu, J. Jiang, P. Wang, S. Feng, P. Hu, Simultaneous quantitative determination of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (9–10) (2010) 743–748.
- [26] S. Meimaroglou, A. Vonaparti, G. Migias, D. Gennimata, S. Poulou, I. Panderi, Direct injection human plasma analysis for the quantification of antihypertensive drugs for therapeutic drug monitoring using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1004 (2015) 1–9.
- [27] J.R. Patel, T.M. Pethani, A.N. Vachhani, N.R. Sheth, A.V. Dudhrejiya, Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 970 (2014) 53–59.
- [28] W. Qi, Q. Zhao, J. Jiang, P. Hu, Simultaneous determination of olmesartan and amlodipine in human plasma and urine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 938 (2013) 27–34.
- [29] F. Gao, M. Zhang, X. Cui, Z. Wang, Y. Sun, J. Gu, Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (1) (2010) 149–154.
- [30] Z. Rao, Y.R. Ma, H.Y. Qin, Y.F. Wang, Y.H. Wei, Y. Zhou, G.Q. Zhang, X.D. Wang, X.A. Wu, Development of a LC–MS/MS method for simultaneous determination of metoprolol and its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and O-desmethylnmetoprolol, in rat plasma: application to the herb–drug interaction study of metoprolol and breviscapine, *Biomed. Chromatogr.* 29 (9) (2015) 1453–1460.
- [31] D.M. Huang, T.Z. Zhang, F.J. Cui, W.J. Sun, L.M. Zhao, M.Y. Yang, Y.J. Wang, Simultaneous identification and quantification of canrenone and 11-alpha-hydroxy-canrenone by LC–MS and HPLC–UVD, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 917232.
- [32] M. Tomaszewski, C. White, P. Patel, N. Masca, R. Damani, J. Hepworth, N.J. Samani, P. Gupta, W. Madira, A. Stanley, B. Williams, High rates of non-adherence to antihypertensive treatment revealed by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HP LC–MS/MS) urine analysis, *Heart* 100 (11) (2014) 855–861.
- [33] P.A. Meredith, H.L. Elliott, Clinical pharmacokinetics of amlodipine, *Clin. Pharmacokinet.* 22 (1) (1992) 22–31.

4. Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die Anwendungsmöglichkeiten von Therapeutischem Drug Monitoring antihypertensiver Medikamente vorgestellt und diskutiert, um Vor- und Nachteile abzuwägen und einen möglichen medizinischen sowie ökonomischen Nutzen herauszuarbeiten. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Anwendung von TDM zur Bestimmung von Therapieadhärenz im Rahmen der Behandlung einer therapieresistenten arteriellen Hypertonie. Anschließend werden weitere Möglichkeiten der Adhärenz-Kontrolle diskutiert und mit den Vor- und Nachteilen des TDM verglichen. Da Massenspektrometrie-basierte Methoden aktuell als Goldstandard in der Anwendung von TDM gelten, soll die vorgestellte Multi-Analyt-LC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung der vier antihypertensiven Medikamente Metoprolol, Amlodipin, Canrenon sowie Hydrochlorothiazid in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet, mit anderen Methoden verglichen und ein potentieller Nutzen herausgearbeitet werden. Nach einer Stellungnahme zur Aktualität der Arbeit und einem Ausblick auf künftige Anwendungsmöglichkeiten sowie Herausforderungen, erfolgt eine abschließende Zusammenfassung.

4.1 Therapeutisches Drug Monitoring von Antihypertensiva

Das Ziel des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) ist es, Medikamentenspiegel zu bestimmen und folgend zu nutzen, um das Therapieregime des Patienten optimal zu steuern. Dies bedeutet, unerwünschte Medikamentenreaktionen zu minimieren und das therapeutische Ansprechen zu verbessern. Aufgrund von begrenzten Ressourcen und des finanziellen sowie materiellen Aufwandes sollten Blutspiegelkontrollen nur dann durchgeführt werden, wenn sie zur Behandlung des Patienten beitragen⁷⁶. TDM wird daher vornehmlich bei Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite, vorbekannter pharmakokinetischer Variabilität, schweren Nebenwirkungen und Toxizität bei Überdosierung sowie zum Ausschluss von subtherapeutischen Konzentrationen angewandt. Auch bei Verdacht auf Medikamenteninteraktionen, zur Therapieindividualisierung oder zur Compliancekontrolle kann TDM sinnvoll genutzt werden^{104,105}. Ein effizientes Monitoring von Medikamentengruppen wie Psychopharmaka, Antiepileptika, Antimykotika, Antiinfektiva, Immunsuppressiva, Chemotherapeutika, antiviralen Medikamenten sowie das kardiovaskuläre System beeinflussenden Arzneimitteln ist bereits klinisch etabliert¹⁰⁶.

Der Sammelbegriff der Antihypertensiva umfasst verschiedene heterogene Medikamentengruppen, deren antihypertensive Wirkung auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Es gibt eine Vielzahl an Arzneimitteln mit individuellen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften. Da jedoch der Erfolg der antihypertensiven Therapie leicht anhand klinischer Parameter überprüft werden kann, beispielsweise im Rahmen hospitalisierter und ambulanter Blutdruckmessungen, erscheint die Anwendung von Therapeutischem Drug Monitoring nicht angemessen¹⁰⁶. Die interdisziplinäre Arbeitsgruppe der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie hat im Jahr 2005 die Konsensus-

Leitlinien für das TDM von Pharmaka mit Empfehlungen zum Einsatz des TDM veröffentlicht¹⁰⁷. Hiernach wird TDM, sollte die Dosierung eines Medikaments leicht anhand klinischer Symptome eingestellt werden können, nicht zur Dosisfindung empfohlen. Auch in den aktuellen ESC-Leitlinien zur arteriellen Hypertonie ist ein TDM bei Therapieinitiierung oder als Follow-Up nicht vorgesehen, sofern die Patienten auf die Therapie ansprechen. Nach Initiierung einer antihypertensiven Therapie sind eine Erfolgskontrolle innerhalb von zwei Monaten sowie Folgekontrollen alle 3-6 Monate nach Erreichen des Zielblutdrucks angedacht¹. Diese beinhalten Blutdruckmessungen, alle zwei Jahre einen Gesundheits-Checkup um Risikofaktoren sowie Endorganschäden zu beurteilen und das Erfassen von unerwünschten Medikamentennebenwirkungen.

Dem gegenüber können Arzneimittelinteraktionen, Unterschiede in der Ernährung oder genetische Polymorphismen der Cytochrom P450 Isoenzyme zu intra- und interindividuellen Schwankungen in der Dosis-Wirkungs-Beziehung einzelner Wirkstoffe und somit auch zu einem reduzierten Therapieansprechen führen. Wuttke et al. stellten beispielsweise fest, dass Patienten, die als CYP2D6-Langsam-Metabolisierer gelten, einem 5-fach erhöhten Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen im Rahmen einer Metoprololtherapie unterliegen¹⁰⁸. Rau et al. konnten nachweisen, dass Serumkonzentrationen von Metoprolol bei kurzzeitiger Einnahme und im Rahmen der Langzeittherapie bei CYP2D6-Langsam-Metabolisierern deutlich höher als bei Schnell-Metabolisierern sind¹⁰⁹. Auch Amlodipin unterliegt der CYP-Metabolisierung. Inhibitoren von CYP3A4 wie Makrolide oder Proteaseinhibitoren können zu erhöhten Plasmaspiegeln und vermehrten Nebenwirkungen führen, während Induktoren einen schnelleren Abbau und gegebenenfalls subtherapeutische Plasmakonzentrationen verursachen können¹¹⁰. Subtherapeutische oder zu hohe Medikamentenplasmaspiegel führen aufgrund von ausbleibender Wirkung oder Nebenwirkungen in der Regel zu einem Medikamentenwechsel, da die Nebenwirkungen von Antihypertensiva selten lebensbedrohlich sind und ausreichend Alternativpräparate zur Verfügung stehen. Ein begleitendes TDM oder eine Genotypisierung zur Identifizierung von CYP-Varianten findet daher bei Patienten mit arterieller Hypertonie initial kaum Anwendung^{111,112}. Es wäre jedoch zu überlegen, ob regelmäßige Medikamentenwechsel aufgrund von Nebenwirkungen oder Therapieresistenz ohne Klärung der Ursache negative Auswirkungen auf die Medikamentenadhärenz und Patientenbindung haben. Denn zu den Ursachen für eine Non-Adhärenz zählen unter anderem die Angst des Patienten vor Nebenwirkungen oder Vergiftungen durch die verordneten Medikamente sowie ein fehlendes Verständnis für die Ursache der Erkrankung und deren Folgen⁷².

Ein weiterer potentieller Nutzen für Therapeutisches Drug Monitoring besteht in der spezifischen Gruppe der Patienten mit therapieresistenter arterieller Hypertonie. Die Prävalenz innerhalb der Gruppe von Patienten mit arterieller Hypertonie variiert in Studien zwischen 10-30%^{1,35}. Mögliche Ursachen wurden unter 2.4.1 sowie 2.4.2 erläutert. Die therapieresistente

Hypertonie geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität des Patienten einher und verursacht durch häufige Arztbesuche, Krankenhausaufenthalte, Pharmakotherapie Intensivierungen und Diagnostik hohe ökonomische Kosten. Bei Versagen einer medikamentösen Blutdruckeinstellung werden außerdem gegebenenfalls interventionelle Therapien, wie beispielsweise die renale Sympathikusdenervation oder eine Barorezeptoraktivierungstherapie notwendig ⁷⁴. Neben möglichen Komplikationen interventioneller Eingriffe, sind diese außerdem sehr kostenintensiv. Daher ist es wichtig zunächst andere Ursachen einer Therapieresistenz auszuschließen.

Zwischen 30-50% der Patienten mit therapieresistenter arterieller Hypertonie sind letztlich auf eine Pseudoresistenz aufgrund von geringer Adhärenz zurückzuführen ^{48,65-67}. Eine geringe Adhärenz gilt als die häufigste Ursache für eine pseudoresistente Hypertonie ⁷³. Gerade bei der Therapie mit kardiovaskulären Medikamenten kann es schnell zu einem unbemerkten Nichteinhalten der Einnahmевorschrift seitens des Patienten kommen. Die Prävalenz mangelnder Medikamentenadhärenz im Rahmen der antihypertensiven Therapie wird in verschiedenen Studien auf ca. 30-50% geschätzt. Kardiovaskuläre Medikamente haben einen primär prophylaktischen Effekt, ohne dass für den Patienten ein spürbares Nachlassen von Symptomen auftritt. Im Gegensatz zur beschwerdebedingten Einnahme von Schmerzmitteln oder Antiemetika, fühlt ein Patient mit einer symptomfreien arteriellen Hypertonie keine Besserung nach Applikation seiner Medikamente ¹¹³. Aufgrund der Therapieintensivierungen bei nicht einstellbaren Blutdruckwerten sind außerdem regelhaft drei oder mehr Medikamente einzunehmen, wodurch die Adhärenz zusätzlich negativ beeinflusst wird ^{73,114}.

Eine geringe Adhärenz in Bezug auf kardiovaskuläre Medikamente kann zu verringerter Blutdruckkontrolle und einem reduzierten Patienten-Outcome führen. Schwere Endorganschäden und Komplikationen wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle können die Folge sein ^{70,115,116}. Angesichts zu erwägender interventioneller Verfahren sowie einem reduzierten Patienten-Outcome in Bezug auf die Behandlung der resistenten Hypertonie als auch einer möglichen Non-Adhärenz, mit schwerwiegenden Endorganschäden und Komplikationen in beiden Fällen, erscheint ein Verfahren zur objektiven und direkten Bestimmung von Medikamentenadhärenz umso wichtiger, um eine fundierte Entscheidung über die weitere Therapie des Patienten zu treffen.

Therapeutisches Drug Monitoring ist ein effektives Mittel, um einen Wirkungsverlust oder ein schlechtes Ansprechen der Pharmakotherapie zu bewerten und gegebenenfalls eine Non-Adhärenz seitens des Patienten von einer tatsächlichen therapieresistenten arteriellen Hypertonie abzugrenzen ^{45,75,117-122}. Die direkte Bestimmung von Medikamenten oder Metaboliten im Blut oder Urin ermöglicht eine objektive Messung, wenngleich die Wirkspiegel stoffwechselbedingt oder aus pharmakogenetischen Gründen variieren können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Patienten nach Aufklärung über die Ergebnisse der Medikamentenspiegelmessungen in Folgeuntersuchungen signifikant niedrigere Blutdruckwerte aufwiesen ^{45,117}. Gupta et al. fanden heraus, dass wiederholte Medikamentenspiegelkontrollen zu einer verbesserten

Adhärenz von initial non-adhärenenten Patienten führen und Blutdruckwerte ähnlich denen von permanent adhärenenten Patienten erreicht werden können⁴⁵. Auch das kardiovaskuläre Risiko kann durch eine bessere Adhärenz reduziert werden¹²³.

Generell ist TDM verhältnismäßig kostenintensiv, weshalb es bisher auch nicht routinemäßig für alle Patienten implementiert wurde. Es erfolgt in der Regel unter Verwendung von Immunassays oder MS-basierten Methoden⁸². MS-basierte Methoden bieten gegenüber Immunassays jedoch den Vorteil einer höheren Sensitivität, was gerade in Hinblick auf notwendige Wirkspiegelkontrollen zur Überprüfung der Adhärenz wichtig erscheint. Aktuelle Studien zur Applikation von TDM bei Non-Adhärenz erfolgen daher in der Regel unter Verwendung MS-basierter Mess- und Analysetechniken^{75,119}. Neben initial hohen Anschaffungskosten für das notwendige MS-Equipment, ist ein intensiver Patientenkontakt zur Probenerhebung notwendig. Des Weiteren wird gut geschultes Personal benötigt, um neue Analysemethoden zu entwickeln, zu validieren und im klinischen Alltag durchzuführen. Müssen zur Testung Fremdlabore in Anspruch genommen werden, ergeben sich auch hieraus hohe Kosten, welche jedoch potentiell eingespart werden können, wenn Labore eigene MS-Analysemethoden entwickeln¹²⁴.

Dem gegenüber haben Patienten mit resistenter Hypertonie einen großen ökonomischen Einfluss auf das Gesundheitssystem aufgrund häufiger Arztbesuche, Krankenhausaufenthalte, wiederholter Medikamentenverordnungen und invasiver Behandlungen¹²². Non-Adhärenz, als Hauptursache für eine pseudoresistente arterielle Hypertonie, nicht oder nur unzureichend zu testen, kann zu nicht notwendigen Therapieeskalationen führen. Neben höheren Kosten entstehen durch Nebenwirkungen von Medikamenten und Komplikationen im Rahmen interventioneller Verfahren unnötige gesundheitliche Risiken.

Eine vergleichende Studie von G. Kockaya geht bei einer 100% Therapieadhärenz in der Behandlung der arteriellen Hypertonie von einer Risikoreduzierung der durch Bluthochdruck verursachten Schlaganfälle, Herzinfarkte sowie Herz- und Nierenerkrankungen um 32% aus und gibt mögliche Einsparungen von 72 Milliarden Dollar an¹²⁵. Zwar ist es unwahrscheinlich eine hundertprozentige Patientencompliance zu erreichen, doch eine Verbesserung der Adhärenz antihypertensiver Pharmakotherapien um 25% könnte Kostensenkungen von 20 Milliarden Dollar bedeuten¹¹⁹. Wenngleich Soko et al. zeigten, dass die Arzneimittelkosten bei suffizienter Adhärenz höher sind als in non-adhärenenten Vergleichsgruppen, waren die medizinischen Gesamtkosten in der adhärenenten Gruppe signifikant niedriger¹²⁶.

Auch verglichen mit Kosteneffektivitätsanalysen invasiver Verfahren in der Behandlung der therapieresistenten Hypertonie, ermöglicht das TDM einen ökonomischen Vorteil^{121,127,128}. Brinker et al. geben die Kosten für TDM-Tests pro mmHg-Reduktion des systolischen Blutdrucks bei unter 5 \$/mmHg Blutdruckreduktion an, wohingegen sich die Kosten für eine renale Denervation in Europa auf ungefähr 185 \$/mmHg-Reduktion des systolischen Blutdruckes belaufen¹¹⁷. Darüber hinaus beschreiben Gupta et al., dass einer aus drei Patienten, die für eine renale Denervation vorgesehen waren, sich non-adhärenent zur verschriebenen

antihypertensiven Medikation verhalten hat. Gemäß der DENERHTN-Studie liegt der Prozentsatz der Non-Adhärenz sogar noch höher¹¹⁸⁻¹²⁰.

Erfolgt eine Besserung der Blutdruckwerte durch Steigerung der Adhärenz, können invasive Behandlungen, medikamentöse Therapieintensivierungen sowie zusätzliche Arztkontakte und Krankenhausaufenthalte aufgrund kardiovaskulärer Komplikationen vermieden und Kosten eingespart werden^{71,117,119,121,126,127,129,130}. Die jeweiligen dies betreffenden Studien unterscheiden sich jedoch in ihrem methodischen Vorgehen, wodurch ein Vergleich erschwert und die tatsächliche Größenordnung des ökonomischen Einflusses von Non-Adhärenz auf die Behandlung der therapieresistenten arteriellen Hypertonie und möglicher Kosteneinsparungen durch das TDM schwer zu beurteilen ist.

4.2 Methoden der Adhärenz-Kontrolle

Obwohl Studien und klinische Leitfäden eine mangelnde Adhärenz als eine der Hauptursachen für eine therapieresistente arterielle Hypertonie anerkennen, bleibt es für Ärzte und betreuendes medizinisches Personal weiterhin eine Herausforderung, diese zu erkennen.

Neben dem Therapeutischen Drug Monitoring gibt es noch weitere direkte sowie indirekte Methoden, um die Adhärenz eines Patienten zu erfassen. Burnier et al. beschreiben die ideale Methode als kostengünstig sowie zuverlässig in der Erfassung, Speicherung, Auswertung und Kommunikation von Medikamenteneinnahmedaten, so dass keine Manipulation oder Zensurierung der Daten erfolgen kann¹³¹.

Indirekte Methoden umfassen das Patienteninterview/Selbstangaben, Fragebögen, Pillenzähler, elektronische Erfassungssysteme, Auszählung von eingelösten Rezepten sowie das klinische Ansprechen des Patienten.

Wenngleich ein Patienteninterview den simpelsten Ansatz darstellt, wurde gezeigt, dass Interviewer weniger als die Hälfte der Patienten identifizierten, deren Verschreibungsrate eine signifikante Pausierung der Medikamenteneinnahmen implizierte¹¹⁴. Mögliche Gründe für falsche Selbstangaben seitens des Patienten können eine mangelnde Erinnerung, falsche Selbstwahrnehmung, Konfliktvermeidung oder auch der Versuch, zu gefallen, sein. Weiterhin ausschlaggebend für die Qualität des Interviews ist die Fähigkeit des Mediziners, eine vorurteilsfreie und nicht bewertende Diskussion zu führen, sowie generell dessen Kommunikationsfähigkeiten¹³¹.

Patienten-Fragebögen bieten eine Möglichkeit, die Selbstangaben des Patienten zu verbessern und zu strukturieren. Obwohl einige Fragebögen zur Diagnostik der Non-Adhärenz weit hin verfügbar sind¹³² und sich leicht anwenden lassen, werden sie in der klinischen Praxis kaum genutzt, da die Durchführung und Auswertung der Fragebögen zeitaufwendig ist. Wohl am häufigsten verwendet wird der Morisky-Adhärenz-Fragebogen (MAQ), dessen erweiterte Variante als Morisky-Medikations-Adhärenz-Skala (MMAS) zur Verfügung steht¹¹⁹. Zwar geben Morisky et al. an, Patienten mit einer geringen Adhärenz und schlechter Blutdruckkontrolle mit einer Sensitivität von 93% identifizieren zu können, die Spezifität der Methode liegt jedoch

nur bei 53%¹³³. Generell scheinen Fragebögen die Medikamenten-Adhärenz zu hoch einzuschätzen^{119,131}. So zeigen El Alili et al., dass die mittels Selbstangaben und Fragebögen ermittelte Adhärenz verglichen mit der objektiven Erfassung der Adhärenz durch Medikamenten-Ereignis-Überwachungssysteme (MEMS), um 17% überschätzt wird¹³⁴. Avateno und De Niccolo et al. vergleichen die Angaben von Patienten in Fragebögen mit den Ergebnissen von TDM-Messungen bei 50 Patienten mit Verdacht auf eine resistente Hypertonie. Von diesen erweisen sich 18% nach TDM-Definition als non-adhärenz. Von diesen 18% waren nach Definition der Fragebögen alle adhärenz¹²².

Die Adhärenz von Patienten kann ebenfalls anhand der Erfassung von Arzneimittelverschreibungen erhoben werden. Hierbei wird der Prozentsatz der Tage ermittelt, an welchen ein Medikament aufgrund einer Rezeptierung mengenmäßig zur Verfügung steht, verglichen mit der Gesamtanzahl der beobachteten Tage. Dieser Quotient wird als „Medication Possession Ratio“ (MPR) bezeichnet¹¹⁹. Eine hohe MPR wäre hierbei gleichzusetzen mit einer hohen Adhärenz. Eine MPR über 80% wird generell als Schwellenwert für eine gute Adhärenz angesehen¹³⁵. Die Erfassung von Arzneimittelverschreibungen ist ein gebräuchlicher Ansatz zur Adhärenz-Kontrolle und wurde in vielen größeren Studien angewandt^{136,131}. Die Voraussetzung ist jedoch, dass die Erfassung von Verschreibungsdaten sämtliche potentielle Quellen abdeckt und eine entsprechende technische Infrastruktur vorliegt, wie im Rahmen der schwedischen Kohortenstudie von M. Qvarnström et al.¹³⁶. Des Weiteren muss angenommen werden, dass die Patienten bei einer Verschreibung die verfügbare Therapie auch tatsächlich einnehmen. So zeigt sich beispielweise nur eine geringe Korrelation zwischen der Erfassung der Arzneimittelverschreibungen und der objektiven Messung mittels elektronischer Überwachungssysteme¹³⁷. Während die Adhärenz in großen epidemiologischen Studien häufig mittels Erfassung von Arzneimittelverschreibungen kontrolliert wird, erscheint diese Methode im klinischen Alltag wenig anwendbar, sofern Informationen aus Apothekenaufzeichnungen nicht in die klinischen Systeme der primären Gesundheitsversorgung integriert sind¹¹⁹.

Eine weitere indirekte Methode zur Adhärenz-Kontrolle stellt die Pillenzählung dar. Hierbei wird die Anzahl der verbliebenen Tabletten nach Ablauf des verordneten Zeitraums kontrolliert. Zwar ist die Methode in der Durchführung sehr simpel, im klinischen Alltag jedoch auch sehr zeitaufwendig. Außerdem wird nur darüber Auskunft gegeben, wie viele Tabletten aus dem Container entfernt wurden und nicht, ob diese vom Patienten auch eingenommen wurden. Somit ist die Methode abhängig von der Mitarbeit und Ehrlichkeit des Patienten. Eine weitere Voraussetzung wäre, dass alle einzunehmenden Tabletten im gleichen Container gelagert werden und präzise die einzunehmende Menge an Tabletten verschrieben wurde. Zwar findet das Pillen-Zählen in klinischen Studien häufig Anwendung, es hat sich jedoch gezeigt, dass auch hier die Adhärenz der Patienten häufig zu hoch eingeschätzt wird. Es ergab sich, dass Container mit zu vielen Tabletten, die an Patienten verteilt wurden, häufig dennoch leer

zurückgebracht wurden ¹³¹. Verglichen mit Medikamenten-Ereignis-Überwachungssystemen (MEMS), überschätzt die Pillenzählung die Adhärenz um 8% ¹³⁴.

Medikamenten-Ereignis-Überwachungssysteme sind die am weitesten verbreitetsten elektronischen Überwachungssysteme ¹³⁸. Elektronische Überwachungssysteme (EMD) können generell die Einnahme von Medikamenten aufzeichnen und dem Patienten oder dem betreuenden medizinischen Personal eine Rückmeldung über das Einnahmeverhalten liefern. Sie reichen von einfachen audiovisuellen Alarmgeräten bis hin zu hochentwickelten Tablettenpendern, wie sie bei den MEMS zum Einsatz kommen. Die Tablettenspender werden mittels eines Mikroschaltkreises bei Entnahme einer Medikamentendosis aktiviert, dokumentieren diese, versehen sie mit einem Zeitstempel und speichern die Daten ab. Die erhobenen Informationen können an den Patienten, seine Angehörigen, seinen Gesundheitsdienstleister oder an unterstützende Pflegeeinrichtungen übermittelt werden. Hieraus lassen sich die Dosierungszeiten, Muster von partieller oder kompletter Nicht-Adhärenz, einschließlich fehlender Medikamenteneinnahme sowie Absetzzeiten ableiten ^{119,139}. Durch die Automatisierung und präzisen Zeitangaben der Tablettenentnahme, ermöglichen elektronische Überwachungssysteme ein neues Verständnis für das Einnahmeverhalten der Patienten und den Zusammenhang zu klinischen Ereignissen während einer verschriebenen Pharmakotherapie ¹⁴⁰. Unter anderem wurde wiederholt gezeigt, dass Medikamente in der ambulanten Versorgung nur sehr unregelmäßig eingenommen werden, mit einem breiten Spektrum von Abweichungen vom verordneten Schema. Durch ausgelassene oder verspätete Einnahme kommt es dann in der Regel zu einer Unterdosierung des Medikaments ^{131,141}.

Neue elektronische Polypharmazie-Überwachungssysteme (POEMS) wie Mehrkammerpillenzähler können die Entnahme mehrerer Medikamente erfassen und überwinden somit auch Limitationen, die durch die alleinige Überwachung von Einzelmedikamenten entstehen ¹¹⁹. Da mit Zunahme der verordneten Tablettenzahl die Therapieadhärenz sinkt und gerade bei therapieresistenten Erkrankungen ein polypharmazeutischer Ansatz verfolgt wird, ist dies ein Fortschritt. Entsprechende Systeme können jedoch größer und sperrig sein und somit bei Medikamenteneinnahmen außer Haus die Freiheit und Privatsphäre des Patienten einschränken ¹⁴².

Des Weiteren ist das Öffnen eines Medikamentenüberwachungssystems nicht mit der Einnahme der entnommenen Tablette gleichzusetzen. Es können eine oder mehrere Tabletten gleichzeitig aus dem Dispenser entfernt oder entnommene Tabletten weggeworfen werden. Zwar schlussfolgert Burnier et. al, dass die Medikamente nach Öffnen des Dispensers tatsächlich genommen werden ¹⁴³, da in vergleichenden Studien festgestellt wurde, dass die MEMS-Daten in nur 3% der Fälle von Medikamentennachweisen in der Blutspiegelbestimmung abweichen ¹⁴⁴, eine Sicherheit besteht jedoch nicht. Schlussendlich verbleiben als Hauptproblem die hohen Kosten der Geräte für eine breite Anwendung. Die EMDs können mechanisch versagen und trotz möglicher Korrelation zwischen dem Öffnen der EMDs und dem Auffinden von

Medikamentenspiegeln bei der Blutspiegelkontrolle, ist das Öffnen des Gerätes nicht sicher der Einnahme von Tabletten gleichzusetzen.¹¹⁹

Die direkte Überwachung der Medikamenteneinnahme (Direct observed Therapy/ „DOT“) zählt zu den direkten Methoden der Adhärenz-Kontrolle. Bei diesem Ansatz erfolgt die kontrollierte Gabe der antihypertensiven Therapie täglich unter Aufsicht eines Klinikmitarbeiters. Es wird eine Blutdruckmessung vor Medikamenteneinnahme sowie nach der überwachten Gabe des Medikaments am Peak der maximalen Wirksamkeit des verabreichten Antihypertensivums durchgeführt¹⁴⁵. Auch ergänzende 24-Stunden-Blutdruckmessungen können abschließend sinnvoll sein. Im Anschluss werden die Blutdruckwerte vor und nach kontrollierter Einnahme verglichen. Bei deutlicher Absenkung im Vergleich zu den sonstigen ambulanten Messungen ist von mangelnder Adhärenz auszugehen. In mehreren Studien konnte eine signifikante Blutdrucksenkung (um 20 mmHg systolisch sowie 10 mmHg diastolisch) nach DOT im Vergleich zu vorherigen ambulanten Messungen erreicht werden¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Eine Blutdrucksenkung bei 25-50% der Patienten nach überwachter Medikamentengabe impliziert auch korrelierend eine Non-Adhärenz-Rate von ca. 25-50%. Während hierbei in der randomisierten Kontrollstudie von Hjørnholm et al. keine relevanten Nebenwirkungen wie starke Hypotonien auftraten¹⁴⁷, geben Hameed et al an, dass 25% der Non-Adhärenten nach Gabe ihrer Antihypertensiva eine symptomatische Hypotension entwickelten¹⁴⁶.

DOT bietet die Möglichkeit, das therapeutische Ansprechen innerhalb von höchstens 24 Stunden mit großer Wahrscheinlichkeit zu klären und hat Potential, sich in einem klinischen Setting als nützlich zu erweisen. Jedoch gilt zu beachten, dass neben möglicher Sicherheitsbedenken aufgrund von Nebenwirkungen wie ausgeprägten Hypotonien, die Anwendung von DOT aufgrund des Einsatzes von geschultem Klinikpersonal zur Überwachung mit einem hohen personellen und somit kostenintensiven sowie logistischen Aufwand für Klinik und Patient verbunden ist^{119,146,150}.

Halvorsen et al. führten über 7 Jahre eine Follow-Up-Studie durch, um herauszufinden, ob Serum-Medikamentenspiegelkontrollen der antihypertensiven Medikamente bei therapieresistenter arterieller Hypertonie neben der initial durchgeführten direkten überwachten Medikamenteneinnahme zusätzliche Informationen zur Therapieadhärenz liefern. Die Daten der Studie implizieren, dass die Genauigkeit von Adhärenz-Kontrollen durch DOT mittels wiederholter Messung der Serumkonzentrationen erhöht werden kann¹⁵¹. Auch die Arbeitsgruppe um Hameed et al. empfiehlt eine häufigere Verwendung von TDM mit wiederholten Blutdruckkontrollen¹⁴⁶.

Unter 4.1 wurde bereits der medizinische Nutzen der Anwendung von TDM bei Patienten mit therapieresistenter arterieller Hypertonie, insbesondere in Hinblick auf die Kontrolle der Adhärenz erläutert. Neben den vorgestellten indirekten und direkten Methoden der Adhärenzkontrolle, ist die Medikamentenspiegelbestimmung mittels Massenspektrometrie in Blut oder Urin

eine objektive direkte Messmethode der Adhärenz mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität^{75,131}. Studien zeigen eine verbesserte Adhärenz nach Anwendung von Blutspiegelkontrollen bei therapieresistenter arterieller Hypertonie sowie eine Reduktion des Blutdruckes⁶⁹. Massenspektrometer sind sehr teuer in der Anschaffung, müssen regelmäßig kalibriert und gewartet werden und es bedarf gut ausgebildeten Personals zur Methodenentwicklung, Validierung und Probenaufbereitung. Jedoch ermöglichen vereinfachte und standardisierte Prozesse die Anwendung von MS/MS-Messungen auch in kleineren Laboren⁷⁵, wengleich durch laboreigene Methodenentwicklung weitere Kosten eingespart werden können um MS-Systeme profitabel zu betreiben¹²⁴. Zusätzlich erlauben multianalytische MS-Methoden die Messung vieler Proben zur gleichen Zeit, wodurch der materielle und zeitliche Aufwand sinkt.

Zwar sind objektive direkte Methoden zur Evaluation von Adhärenz teurer, jedoch auch deutlich zuverlässiger. Indirekte Methoden wie Fragebögen sind einfacher in der Anwendung und bedürfen eines geringeren Materialaufwandes. Morisky et al. geben dabei auch die Detektion von Non-Adhärenz mit einer guten Sensitivität, jedoch geringerer Spezifität an¹³³. Allerdings scheinen Fragebögen die Adhärenz generell zu hoch einzuschätzen^{119,131}. Auch in Patienteninterviews besteht das Risiko der falschen Selbsteinschätzung und einer zu hohen Bewertung der Adhärenz¹¹⁴. Die Anwendung einer Pillenzählung ist im Vergleich zur LCMS-Methodik deutlich kostengünstiger, jedoch ebenfalls zeitaufwendig in der Durchführung. Auch hier zeigt ein Vergleich mit MEMS in Studien, dass die Adhärenz zu hoch eingeschätzt wird¹³⁴. Die retrospektive Auswertung von Arzneimittelverschreibungen ist ein vielversprechender Ansatz und findet vor allem in Studien Anwendung, setzt jedoch eine entsprechende technische Infrastruktur zur Datenerhebung voraus, die nicht in allen Ländern gegeben ist¹¹⁹. MEMS lassen Rückschlüsse über das Einnahmeverhalten der Patienten zu und scheinen nur in 3% der Fälle von Daten zur Adhärenz-Kontrolle mittels Blutspiegelbestimmung abzuweichen¹⁴⁴. Dennoch ist die Entnahme von Tabletten aus einem Dispenser nicht mit der Einnahme eines Medikamentes gleichzusetzen. Diese Problematik betrifft auch die Pillenzählung. Daher ermöglichen diese Methoden keine sichere Beurteilung, ob der Patient seine Medikamente tatsächlich genommen hat und sind nur ungefähre Messungen der Medikamentenadhärenz⁷⁵. Trotz dieser Einschränkungen sind MEMS wahrscheinlich eine der besten indirekten objektiven Methoden zur Diagnose von Non-Adhärenz¹³¹. Andere o.g. indirekte Methoden, wie Patienteninterviews, Pillenzählung und Fragebögen beinhalten viele Unsicherheiten und sind leicht vom Patienten zu manipulieren¹⁵².

Direkte Methoden zur Adhärenz-Kontrolle ermöglichen eine genauere Messung der Adhärenz⁷⁵. DOT als direkte objektive Methode ermöglicht sofortige Rückschlüsse über das klinische Ansprechen der Pharmakotherapie der arteriellen Hypertonie und lässt aufgrund der ambulanten Blutdruckmessungen vor DOT ebenfalls Rückschlüsse zur Adhärenz im Alltag zu. Die Methode ist jedoch ebenfalls kosten- und zeitintensiv aufgrund des hohen Personalaufwandes

zur klinischen Überwachung¹⁵⁰. Des Weiteren besteht ein Risiko für ausgeprägte Hypotensionen¹⁴⁶.

Dem gegenüber bieten Medikamentenspiegelkontrollen zwar nur eine punktuelle Einschätzung der Adhärenz und stellen nicht den langfristigen Adhärenz-Verlauf dar. Somit ist die Methodik anfällig für eine Weißkittel-Adhärenz, das heißt, dass sich die Adhärenz in den Tagen vor und nach der Kontrolle zeitweise verbessert, da der Patient sein Einnahmeverhalten an die Termine anpasst¹³¹. Dennoch korrelieren die Messungen mit langfristigeren Kontrollmethoden wie EMDs¹⁴⁴. Auch die Genauigkeit der DOT konnte in Studien durch begleitendes TDM gesteigert werden¹⁵¹. Darüber hinaus ist TDM nebenwirkungsarm, bei Verwendung von Urin zur Probengewinnung sogar nicht mal invasiv.

Eine optimale Methode zur Adhärenz-Kontrolle im klinischen Alltag sollte einfach, günstig und zuverlässig sein. Wie dargestellt, erscheinen einfache und günstige Methoden jedoch relativ unzuverlässig, während aussagekräftige Methoden deutlich kostenintensiver und aufwendiger sind, sowie eine entsprechende Infrastruktur voraussetzen. In den letzten Jahren scheinen sich zur Beurteilung der Adhärenz in klinischen Studien sowie im klinischen Alltag die Durchführung von Elektronischen Monitoring Systemen sowie die Messung von Medikamentenspiegeln im Blut oder Urin mittels HPLC-MS/MS durchzusetzen¹³¹. Gupta et al. schlussfolgern, dass die biochemische Bestimmung mittels LC-MS/MS, wenn verfügbar, die genaueste und robusteste Messung sowie im klinischen Alltag praktikabelste Technik zur Adhärenz-Kontrolle ist¹¹⁹.

4.3 Multianalytische LCMS/MS Methoden - ein Vergleich

In den letzten Jahren wurden einige LC-MS/MS Methoden zur Bestimmung verschiedener Antihypertensiva publiziert. Diese unterscheiden sich jedoch teilweise deutlich bezüglich der Wahl der Probenmatrix, des Extraktionsverfahrens sowie der Laufzeiten und beinhalten verschiedene Zwischenschritte in der Probenaufbereitung. Auch die Anzahl messbarer Analyten sowie die Sensitivität der Methoden variiert.

Die Bestimmung von antihypertensiven Medikamenten unter Verwendung einer LC-MS/MS-basierten Methoden erfolgt meist mit Serum oder Urin als Probenmatrix^{153,154}. Vorteile von Studien mit einer Probengewinnung aus Urin, Haar oder Speichel sind die geringe Invasivität sowie einfache Probengewinnung¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Während Medikamentenspiegel im Urin zwar länger nachgewiesen werden können, korreliert die Konzentration im Urin jedoch nicht mit der klinischen Wirkung. Demgegenüber können Medikamentenspiegel im Blut nur über relativ kurze Zeiträume gemessen werden. Die pharmakokinetische Beziehung zwischen Medikamentendosis und Blutspiegel ist jedoch in Studien besser dokumentiert und kann eher mit einem blutdrucksenkenden Effekt assoziiert werden. Auch im Hinblick auf die Bestimmung von therapeutischen Referenzbereichen scheint die Bestimmung von Medikamentenspiegeln im Blut zur Adhärenz-Kontrolle besser geeignet¹⁵⁴. Tanna und Lawson diskutieren daher auch die Bestimmung von Medikamenten und deren Metaboliten in Trockenblutmikroproben als Möglichkeit

der Adhärenz-Kontrolle ¹⁵⁸. Auch Ritscher et al. schussfolgern in einer vergleichenden Studie, dass die Bewertung der Adhärenz auf der Grundlage von Serumkonzentrationen genauer ist als die qualitative Urinanalyse ¹⁵⁹.

Die Probenvorbereitung dient unter anderem der Vereinfachung der Probe zur Reduktion von Matrixeffekten. Einige bestehende Methoden nutzen hierfür eine Flüssig-Flüssig-¹⁶⁰⁻¹⁶⁵ oder Festphasen-^{84,166-168} Extraktion unter Verwendung verschiedener analytischer Säulen. Zwar werden Matrixeffekte hierbei minimiert, die Methoden sind jedoch verhältnismäßig zeitaufwendig und erfordern große Mengen an Plasma- oder Serumproben (> 0,5ml) ¹⁶⁹. Demgegenüber ermöglicht eine Proteinfällung, welche auch in der hier vorgestellten Methode genutzt wird, eine schnellere Probenaufbereitung mit einem geringen Material- und Arbeitsaufwand. Nicht ausreichend reduzierte Matrixeffekte können anschließend unter Verwendung isotope markierter interner Standards kompensiert werden.

Multianalytische Methoden wie von De Nicolo et al. ¹⁷⁰, Thorstensen et al. ¹⁵⁴ oder auch Gundersen et al. ¹⁷¹ umfassen eine höhere Anzahl messbarer Analyten als in der vorgestellten Methode, nutzen jedoch zusätzliche, teils zeitintensive Zwischenschritte, um Matrix-Effekte zu reduzieren. Die Autorengruppe um De Nicolo et al. stellt eine Methode zur Bestimmung von zehn verschiedenen blutdrucksenkenden Arzneimitteln mittels Proteinfällung vor. Diese beinhaltet allerdings einen 1,5-stündigen Trocknungsschritt während der Fällung sowie eine Stickstoff-Verdampfung ¹⁷⁰. Die Autoren Gundersen et al., Diaz et al. und Gonzalez et al. wenden ebenfalls zusätzlich zur Proteinfällung eine Stickstoff-Verdampfung als Zwischenschritt an ¹⁷¹⁻¹⁷³. Zwar erlaubt eine hohe Anzahl messbarer Analyten eine breitere Anwendung der Methoden, da viele unterschiedliche Medikationen abgebildet werden können. Jedoch erschweren zur Reduktion der Matrixeffekte notwendige, lange chromatographische Laufzeiten von bis zu 15 Minuten bei Gonzales et al., sowie 10 Minuten bei De Nicolo et al. einen hohen Probenumsatz im klinischen Alltag. Die Autorengruppe um Thorstensen et al. postuliert in ihrer Publikation die Messung von 25 verschiedenen Analyten, nutzt jedoch letztlich 3 unterschiedliche Methoden, 5 separate Proben-Injektionen sowie eine 10-minütige Zentrifugation in der Probenvorbereitung ¹⁵⁴. Dies könnte zu Schwierigkeiten bei der Integration der Methodik in den klinischen Alltag führen. Bisherige Publikationen, deren Laufzeiten und Probenaufbereitung mit der hier vorgestellten Methode vergleichbar sind, umfassen meist nur 2-3 Analyten ^{155,160-165,174,175}.

Neben der Probenaufbereitung unterscheiden sich die Methoden auch in ihrer Sensitivität. In der vorliegenden Methode zur Bestimmung von Metoprolol, Amlodipin, Hydrochlorothiazid sowie Canrenon werden LLOQs von 0,23; 0,15; 8,54 und 0,05 µg/l bestimmt. Demgegenüber beschreiben Huang et al. eine HPLC-UVD-Methode zur Bestimmung von CAN mit einem LOD von 100 Mg/l und einem LLOQ von 500 mg/l. Dies ist für eine valide Interpretation der

Serumspiegel, auch im Hinblick auf die Beurteilung der Medikamentenadhärenz und der Implementierung in einen TDM-Dienst, möglicherweise nicht ausreichend¹⁷⁶. Andere veröffentlichte LC-MS-Methoden, insbesondere in Bezug auf Amlodipin decken möglicherweise keine ausreichende Breite der messbaren Zielkonzentrationsbereiche für die klinische Analyse ab und liefern nur obere Bestimmungsgrenzen von bis zu $< 10,1 \mu\text{g/l}$ ^{84,164} sowie eine untere Bestimmungsgrenze von $0,25 \mu\text{g/l} - 0,5 \mu\text{g/l}$ ^{171,173}. Aufgrund der vergleichsweise längsten Halbwertszeit hat Amlodipin jedoch den höchsten Stellenwert für die Beurteilung einer länger zurück liegenden Adhärenzproblematik, so dass gerade hier niedrige untere Bestimmungsgrenzen hilfreich sind.

Eine Vielzahl vergleichbarer LC-MS/MS Methoden zur Bestimmung von Hydrochlorothiazid zeigen ebenfalls eine geringere Sensitivität mit einem LLOQ zwischen $0,13 \mu\text{g/l}$ bei De Niccolo et al.¹⁷⁰, $0,37 \mu\text{g/l}$ bei Gundersen et al.¹⁷¹, $5 \mu\text{g/l}$ bei Dias et al.¹⁷³ sowie $20 \mu\text{g/l}$ bei Gonzalez et al.¹⁷². Liu et al. erreichen nur eine LLOQ von $25 \mu\text{g/g}$, trotz nur zwei gemessener Analyten¹⁶⁷.

Auch in der Analyse von Metoprolol erreicht die hier vorgestellte Methodik eine der höchsten Sensitivitäten mit einer LLOQ von $0,23 \mu\text{g/l}$. Einzig Sigaroudi et al. beschreiben eine vergleichbare LOQ mit $0,465 \mu\text{g/l}$ ¹⁷⁵. Andere ähnliche Methoden geben nur eine LOQ von $1-3,42 \mu\text{g/l}$ an^{171,173,174}. Generell scheinen LC-MS/MS-Messverfahren, welche sämtliche der in der vorgestellten Methodik gemessenen Analyten erfassen, jedoch eine insgesamt höhere Anzahl messbarer Analyten aufweisen, ein quantitativ höheres LOQ mit einer geringeren Sensitivität zu erreichen^{171,173}. Hinzu kommen notwendige Zwischenschritte in der Probenaufbereitung zur Reduktion der Matrixeffekte und längere Probenlaufzeiten.

Mögliche Matrixeffekte und die Beeinflussung der Ionisationseffizienz der Analyten in der vorgestellten Methode werden in einem Experiment zur Bewertung der Ionenunterdrückung und -verstärkung analysiert. Für Metoprolol, Amlodipin und Hydrochlorothiazid zeigen sich hierbei signifikante Ionensuppressions-Effekte. Diese können jedoch durch den Einsatz isotope markierter interner Standards für jeden Analyten minimiert und ausgeglichen werden. Auch die Autoren Gundersen et al. sowie Thorstensen et al. geben die Verwendung von isotope markierten, beziehungsweise deuterierten internen Standards für jeden einzelnen Analyten an^{154,171}. Andere der Autorengruppen, wie Van der Nagel et al., Gonzales et al. oder auch Dias et al. verwenden nur einen, nicht isotope markierten internen Standard für alle Analyten als Vergleichsmessung. Doch gerade im Rahmen von Multianalyt-Methoden ist die Verwendung eines separaten internen Standards für jeden der Analyten gefordert⁹⁹.

Im Allgemeinen entspricht die hier vorgestellte Methode zur Bestimmung von Metoprolol, Amlodipin, Canrenon und Hydrochlorothiazid den bereits in der Literatur veröffentlichten Methoden. Die in der vorliegenden Publikation vorgeschlagenen Verbesserungen beziehen sich auf die Probenvorbereitung auf der Grundlage eines einfachen und zeitsparenden

Proteinfällungsprotokolls, sowie die Verwendung unterschiedlicher isotope markierter interner Standards für jeden Analyten zur Kompensation von Matrixeffekten¹⁷⁶. Dies ermöglicht trotz geringer Retentionszeiten eine sensible und spezifische Bestimmung der oben genannten Medikamente in einer zeitgleichen Messung mittels Multi-Analyt-Methode. Des Weiteren wird erfolgreich Canrenon als Metabolit von Spironolacton, welches nach der Pathway-2-Studie¹⁷⁷ an Bedeutung für die Therapie der resistenten Hypertonie gewonnen hat, in die vorliegende Methode implementiert. Darüber hinaus ist die vorliegende Methode mit einer Laufzeit von nur 2,5 Minuten deutlich kürzer als die meisten anderen verglichenen Multi-Analyt-Methoden zur Bestimmung von Antihypertensiva, was einen höheren Probendurchsatz erlaubt. Eine simple Proteinfällung sowie ein sehr geringes Injektionsvolumen von 5 µl bedeuten einen geringen Materialaufwand, während die unteren Bestimmungsgrenzen mit anderen Studien korrelieren oder sogar niedriger sind.

Die Anwendbarkeit der Methode konnte durch eine erfolgreiche Integration in den klinischen Alltag demonstriert werden. Es erfolgten Messungen von 81 Blutproben aus einer Gruppe von 60 Patienten. Hiervon lagen bei 25% der Patienten die gemessenen Medikamentenspiegel unterhalb der Nachweisgrenze. Zwar handelt es sich bei den Patienten um eine spezielle Gruppe von Bluthochdruckpatienten mit suboptimaler Blutdruckkontrolle, ein Weißkittel-Effekt mit durch Aufregung erhöhtem Blutdruck, wie auch eine sogenannte Weißkittel-Adhärenz, also eine Steigerung der Adhärenz im Wissen einer anrückenden Kontrolle, können nicht sicher ausgeschlossen werden. Dennoch decken sich die vorgestellten Ergebnisse mit bisherigen Vermutungen einer Non-Adhärenz im Rahmen der antihypertensiven Therapie zwischen 20-30%^{30,122}. Es empfehlen sich jedoch mehrere wiederholte Messungen, da einmalige Blutspiegelkontrollen lediglich eine Momentaufnahme darstellen und wenig Aussage darüber treffen können, wie lange eine Non-Adhärenz besteht und für wie lange ein Medikament tatsächlich eingenommen wurde.

Wenngleich bisher keine generellen Empfehlungen zur Anwendung des TDM von Antihypertensiver mit therapieresistentem Blutdruck bestehen, stellt die vorliegende LC-MS/MS Methode eine wirksame Möglichkeit zur Erkennung von Non-Adhärenz dar. Viele Vorteile von TDM mittels LC-MS/MS-Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit erläutert und abgewogen, wenngleich große einheitliche klinische Studien in den kommenden Jahren den tatsächlichen Nutzen noch weiter beleuchten müssen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von TDM ergibt sich in der Findung von Referenzbereichen in klinischen Studien. Trotz des berechenbaren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Profils der Antihypertensiva, ist die Indikation des TDM zur Therapiesteuerung nämlich weiterhin eine Streitfrage. Es gibt einzelne Studien zur Dosisanpassung blutdrucksenkender Medikamente basierend auf den Ergebnissen von Blutspiegelmessungen zur Adhärenz-Kontrolle. Da jedoch die therapeutische Dosisfindung meist anhand klinischer Parameter möglich ist, konnten bisher keine therapeutischen

Bereiche etabliert werden. Diese bekannten Ansätze müssen in einer größeren Kohorte ebenfalls validiert werden, um die Notwendigkeit von TDM in der klinischen Routinepraxis zu bestätigen.

5. Quellenverzeichnis

1. Zanchetti A, Dominiczak A, Coca A, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* 2018; **39**(33): 3021-104.
2. Danaei G, Finucane MM, Lin JK, et al. National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. *Lancet* 2011; **377**(9765): 568-77.
3. Herold G. Innere Medizin; *Arterielle Hypertonie*, 2019; p298-317
4. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA* 2013; **310**(9): 959-68.
5. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 2003; **289**(18): 2363-9.
6. Joffres M, Falaschetti E, Gillespie C, et al. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2013; **3**(8): e003423.
7. Diederichs C, Neuhauser H. Regional variations in hypertension prevalence and management in Germany: results from the German Health Interview and Examination Survey (DEGS1). *J Hypertens* 2014; **32**(7): 1405-13; discussion 14.
8. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; **360**(9349): 1903-13.
9. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; **105**(3): 310-5.
10. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; **24**(11): 987-1003.
11. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A. Effects of blood-pressure-lowering treatment on outcome incidence. 12. Effects in individuals with high-normal and normal blood pressure: overview and meta-analyses of randomized trials. *J Hypertens* 2017; **35**(11): 2150-60.
12. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2016; **387**(10022): 957-67.
13. He FJ, Li J, Macgregor GA. Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ (Clinical research ed)* 2013; **346**: f1325.
14. Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2003; **42**(5): 878-84.

15. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Heart Association* 2013; **2**(1): e004473.
16. Borjesson M, Onerup A, Lundqvist S, Dahlof B. Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: narrative review of 27 RCTs. *British journal of sports medicine* 2016; **50**(6): 356-61.
17. Karow L-R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 2012.
18. Labs. P. Product Information: NORVASC® oral tablets, amlodipine besylate oral tablets. , New York, NY, 2010. 2001.
19. AstraZeneca LpF. Product Information: TOPROL-XL® oral extended release tablets, metoprolol succinate oral extended release tablets. AstraZeneca LP (per FDA), Wilmington, DE, 2012. 2001.
20. Ratiopharm.GmbH. Fachinformation HCT-ratiopharm® 25mg Tabletten. *Productinformation, Ulm, Zulassungsnummer: 551930000, URL: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/HCT-ratiopharm%2025%20mg%20Tabletten%20-%20202pdf?pzn=1550375>* Stand: Oktober 2018.
21. Ratiopharm.GmbH. Fachinformation Spironolacton-ratiopharm® 50 mg/100 mg Tabletten. *Productinformation, Ulm, Zulassungsnummer: 23510100, URL: <https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/label/Spironolacton-ratiopharm%20100%20mg%20Tablettenpdf?pzn=2071079>* Stand: Januar 2016.
22. Overdiek HW, Merkus FW. Influence of food on the bioavailability of spironolactone. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1986; **40**(5): 531-6.
23. Overdiek HW, Merkus FW. The metabolism and biopharmaceutics of spironolactone in man. *Reviews on drug metabolism and drug interactions* 1987; **5**(4): 273-302.
24. Merkus FWHM, Overdiek JWPM, Cilissen J, Zuidema J. Pharmacokinetics of Spironolactone After a Single Dose: Evaluation of the true Canrenone Serum Concentrations During 24 Hours. *Clinical and Experimental Hypertension Part A: Theory and Practice* 1983; **5**(2): 239-48.
25. Maucher DIV. Amlodipin. 21.12.2021 2021. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Amlodipin_20531 (accessed 20.08.2023 2023).
26. Maucher DIV. Metoprolol. 12.06.2019 2019. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Metoprolol_455?page=3 (accessed 20.08.2023 2023).
27. Kahle C. 11.03.2020 2020. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Hydrochlorothiazid_10079 (accessed 20.08.2023 2023).
28. Maucher DIV. Spironolacton. 25.06.2019 25.06.2019. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Spironolacton_516#Pharmakokinetik (accessed 20.08.2023 2023).
29. Sarafidis PA, Bakris GL. Resistant hypertension: an overview of evaluation and treatment. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; **52**(22): 1749-57.
30. Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation* 2008; **117**(25): e510-26.
31. Pimenta E, Gaddam KK, Oparil S. Mechanisms and treatment of resistant hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2008; **10**(3): 239-44.
32. Acelajado MC, Pisoni R, Dudenbostel T, et al. Refractory hypertension: definition, prevalence, and patient characteristics. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2012; **14**(1): 7-12.
33. Daugherty SL, Powers JD, Magid DJ, et al. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. *Circulation* 2012; **125**(13): 1635-42.

34. Siddiqui M, Judd EK, Oparil S, Calhoun DA. White-Coat Effect Is Uncommon in Patients With Refractory Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2017; **70**(3): 645-51.
35. Calhoun DA, Booth JN, 3rd, Oparil S, et al. Refractory hypertension: determination of prevalence, risk factors, and comorbidities in a large, population-based cohort. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2014; **63**(3): 451-8.
36. Dudenbostel T, Acelayado MC, Pisoni R, Li P, Oparil S, Calhoun DA. Refractory Hypertension: Evidence of Heightened Sympathetic Activity as a Cause of Antihypertensive Treatment Failure. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2015; **66**(1): 126-33.
37. Vischer AS, Burkard T. Principles of Blood Pressure Measurement - Current Techniques, Office vs Ambulatory Blood Pressure Measurement. *Advances in experimental medicine and biology* 2017; **956**: 85-96.
38. Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Circulation* 2005; **111**(5): 697-716.
39. de la Sierra A, Segura J, Banegas JR, et al. Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2011; **57**(5): 898-902.
40. Brown MA, Buddle ML, Martin A. Is resistant hypertension really resistant? *American Journal of Hypertension* 2001; **14**(12): 1263-9.
41. Muxfeldt ES, Bloch KV, Nogueira AR, Salles GF. Twenty-four hour ambulatory blood pressure monitoring pattern of resistant hypertension. *Blood Pressure Monitoring* 2003; **8**(5): 181-5.
42. Phillips LS, Branch WT, Cook CB, et al. Clinical inertia. *Annals of internal medicine* 2001; **135**(9): 825-34.
43. Leiva A, Fajo M, Escriche L, et al. Efficacy of a brief multifactorial adherence-based intervention on reducing the blood pressure of patients with poor adherence: protocol for a randomized clinical trial. *BMC cardiovascular disorders* 2010; **10**: 44.
44. Prävention DHeVDDGfrHu. STELLUNGNAHME Blutdruckmessung und Zielblutdruck. In: https://www.hochdruckliga.de/tl_files/content/dhl/aktuelles/2017/09/DHL-Stellungnahme-Zielblutdruck.pdf DHeVDDGfrHuPv, editor.; 2017.
45. Gupta P, Patel P, Strauch B, et al. Biochemical Screening for Nonadherence Is Associated With Blood Pressure Reduction and Improvement in Adherence. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2017; **70**(5): 1042-8.
46. Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clin Ther* 2001; **23**(8): 1296-310.
47. Fung V, Huang J, Brand R, Newhouse JP, Hsu J. Hypertension treatment in a medicare population: adherence and systolic blood pressure control. *Clin Ther* 2007; **29**(5): 972-84.
48. Vrijens B, Vincze G, Kristanto P, Urquhart J, Burnier M. Adherence to prescribed antihypertensive drug treatments: longitudinal study of electronically compiled dosing histories. *BMJ (Clinical research ed)* 2008; **336**(7653): 1114-7.
49. Kronish IM, Woodward M, Sergie Z, Ogedegbe G, Falzon L, Mann DM. Meta-analysis: impact of drug class on adherence to antihypertensives. *Circulation* 2011; **123**(15): 1611-21.
50. Kreutz R, Scholze J, Douros A. Single-Pill Triple Fixed Dose Combination Therapy with Single Component Drug Monitoring in Treatment-Resistant Hypertension: A Pilot Study. *Current vascular pharmacology* 2018; **16**(2): 197-203.

51. Williams B, MacDonald TM, Morant SV, et al. Endocrine and haemodynamic changes in resistant hypertension, and blood pressure responses to spironolactone or amiloride: the PATHWAY-2 mechanisms substudies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2018; **6**(6): 464-75.
52. Oxlund CS, Henriksen JE, Tarnow L, Schousboe K, Gram J, Jacobsen IA. Low dose spironolactone reduces blood pressure in patients with resistant hypertension and type 2 diabetes mellitus: a double blind randomized clinical trial. *J Hypertens* 2013; **31**(10): 2094-102.
53. Wang C, Xiong B, Huang J. Efficacy and Safety of Spironolactone in Patients with Resistant Hypertension: A Meta-analysis of Randomised Controlled Trials. *Heart, lung & circulation* 2016; **25**(10): 1021-30.
54. Liu L, Xu B, Ju Y. Addition of spironolactone in patients with resistant hypertension: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical and experimental hypertension (New York, NY : 1993)* 2017; **39**(3): 257-63.
55. Zhao D, Liu H, Dong P, Zhao J. A meta-analysis of add-on use of spironolactone in patients with resistant hypertension. *International journal of cardiology* 2017; **233**: 113-7.
56. Vaclavik J, Sedlak R, Plachy M, et al. Addition of spironolactone in patients with resistant arterial hypertension (ASPIRANT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2011; **57**(6): 1069-75.
57. Martins LC, Figueiredo VN, Quinaglia T, et al. Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *Journal of human hypertension* 2011; **25**(9): 532-8.
58. de Faria AP, Demacq C, Figueiredo VN, et al. Hypoadiponectinemia and aldosterone excess are associated with lack of blood pressure control in subjects with resistant hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2013; **36**(12): 1067-72.
59. Yugar-Toledo JC, Modolo R, de Faria AP, Moreno H. Managing resistant hypertension: focus on mineralocorticoid-receptor antagonists. *Vascular health and risk management* 2017; **13**: 403-11.
60. Parthasarathy HK, Menard J, White WB, et al. A double-blind, randomized study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism. *J Hypertens* 2011; **29**(5): 980-90.
61. Manolis AA, Manolis TA, Melita H, Manolis AS. Eplerenone Versus Spironolactone in Resistant Hypertension: an Efficacy and/or Cost or Just a Men's Issue? *Current hypertension reports* 2019; **21**(3): 22.
62. Pareek AK, Messerli FH, Chandurkar NB, et al. Efficacy of Low-Dose Chlorthalidone and Hydrochlorothiazide as Assessed by 24-h Ambulatory Blood Pressure Monitoring. *Journal of the American College of Cardiology* 2016; **67**(4): 379-89.
63. Ernst ME, Carter BL, Goerdts CJ, et al. Comparative antihypertensive effects of hydrochlorothiazide and chlorthalidone on ambulatory and office blood pressure. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2006; **47**(3): 352-8.
64. Sinnott SJ, Tomlinson LA, Root AA, et al. Comparative effectiveness of fourth-line anti-hypertensive agents in resistant hypertension: A systematic review and meta-analysis. *European journal of preventive cardiology* 2017; **24**(3): 228-38.
65. Marquez Contreras E, Gil Guillen V, Casado Martinez JJ, et al. [Analysis of studies published on hypertension treatment non-compliance in Spain between 1984 and 2005]. *Atencion primaria* 2006; **38**(6): 325-32.
66. Roberts AW, Crisp GD, Esserman DA, Roth MT, Weinberger M, Farley JF. Patterns of medication adherence and health care utilization among patients with

- chronic disease who were enrolled in a pharmacy assistance program. *North Carolina medical journal* 2014; **75**(5): 310-8.
67. Maslakpak MH, Safaie M. A Comparison between The Effectiveness of Short Message Service and Reminder Cards Regarding Medication Adherence in Patients with Hypertension: A Randomized Controlled Clinical Trial. *International journal of community based nursing and midwifery* 2016; **4**(3): 209-18.
 68. Kronish IM, Lynch AI, Oparil S, et al. The Association Between Antihypertensive Medication Nonadherence and Visit-to-Visit Variability of Blood Pressure: Findings From the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2016; **68**(1): 39-45.
 69. Tiffe T, Wagner M, Rücker V, et al. Control of cardiovascular risk factors and its determinants in the general population- findings from the STAAB cohort study. *BMC cardiovascular disorders* 2017; **17**(1): 276.
 70. Kolandaivelu KL, Benjamin B.; O'Gara, Patrick T.; Bhatt, Deepak L. Non-adherence to cardiovascular medications. *European Heart Journal* 2014; **35**(46): 3267-76.
 71. Cutler RL, Fernandez-Llimos F, Frommer M, Benrimoj C, Garcia-Cardenas V. Economic impact of medication non-adherence by disease groups: a systematic review. *BMJ Open* 2018; **8**(1): e016982.
 72. Brown MT, Bussell J, Dutta S, Davis K, Strong S, Mathew S. Medication Adherence: Truth and Consequences. *The American journal of the medical sciences* 2016; **351**(4): 387-99.
 73. Gupta P, Patel P, Štrauch B, et al. Risk Factors for Nonadherence to Antihypertensive Treatment. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2017; **69**(6): 1113-20.
 74. Fagard RH. Resistant hypertension. *Heart (British Cardiac Society)* 2012; **98**(3): 254-61.
 75. Tanna S, Ogwu J, Lawson G. Hyphenated mass spectrometry techniques for assessing medication adherence: advantages, challenges, clinical applications and future perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2020; **58**(5): 643.
 76. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *British journal of clinical pharmacology* 1998; **46**(2): 95-9.
 77. Spector R, Park GD, Johnson GF, Vesell ES. Therapeutic drug monitoring. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1988; **43**(4): 345-53.
 78. Avataneo V, D'Avolio A, Cusato J, Cantù M, De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal* 2019; **166**: 40-51.
 79. Eliasson E, Lindh JD, Malmström RE, Beck O, Dahl ML. Therapeutic drug monitoring for tomorrow. *European journal of clinical pharmacology* 2013; **69 Suppl 1**: 25-32.
 80. Maurer HH. Mass Spectrometry for Research and Application in Therapeutic Drug Monitoring or Clinical and Forensic Toxicology. *Therapeutic drug monitoring* 2018; **40**(4): 389-93.
 81. Aronson JK, Hardman M. ABC of monitoring drug therapy. Measuring plasma drug concentrations. *BMJ (Clinical research ed)* 1992; **305**(6861): 1078-80.
 82. Brandhorst G, Oellerich M, Maine G, Taylor P, Veen G, Wallemacq P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clinical chemistry* 2012; **58**(5): 821-5.
 83. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Resson HW. LC-MS-based metabolomics. *Molecular bioSystems* 2012; **8**(2): 470-81.
 84. Kallem RR, Mullangi R, Hotha KK, Ravindranath LK, Spoorthy YN, Seshagirirao JV. Simultaneous estimation of amlodipine and atenolol in human

- plasma: a sensitive LC-MS/MS method validation and its application to a clinical PK study. *Bioanalysis* 2013; **5**(7): 827-37.
85. Gey M. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. 3. Auflage ed: Springer Spektrum; 2015.
 86. Gross JrH. Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt . Springer Spektrum; 2019. p. 131.
 87. Guillarme D, Nguyen DT, Rudaz S, Veuthey JL. Recent developments in liquid chromatography--impact on qualitative and quantitative performance. *Journal of chromatography A* 2007; **1149**(1): 20-9.
 88. Lloyd R. Snyder JJK, John W. Dolan. Introduction to Modern Liquid Chromatography: Wiley; 2009.
 89. Günther G. Willems MN, Gerhard Rücker. Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. 5. Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2013.
 90. Schellinger AP, Carr PW. Isocratic and gradient elution chromatography: a comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *Journal of chromatography A* 2006; **1109**(2): 253-66.
 91. Thurman EM, Ferrer I, Barceló D. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. *Analytical chemistry* 2001; **73**(22): 5441-9.
 92. Fenn JB. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1993; **4**(7): 524-35.
 93. Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass spectrometry reviews* 2009; **28**(6): 898-917.
 94. Edmond De Hoffmann VS. Mass spectrometry – principles and applications. 3. Auflage ed. Chichester: Wiley; 2007.
 95. Gianazza E, Tremoli E, Banfi C. The selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring-based mass spectrometry approach for the accurate quantitation of proteins: clinical applications in the cardiovascular diseases. *Expert review of proteomics* 2014; **11**(6): 771-88.
 96. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. In: U.S. Department of Health and Human Services FaDACfDEaRC, Center for Veterinary Medicine (CVM). , editor.; 2015.
 97. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 1996; **686**(1): 3-10.
 98. Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical research* 1991; **8**(4): 421-6.
 99. Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 2010; **1217**(25): 3929-37.
 100. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 1999; **13**(12): 1175-85.
 101. Buhrman DL, Price PI, Rudewiczcor PJ. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1996; **7**(11): 1099-105.
 102. Choi BK, Hercules DM, Gusev AI. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *Journal of chromatography A* 2001; **907**(1-2): 337-42.

103. Nickerson B. Cl. Liquid–Liquid and Solid-Phase Extraction Techniques. Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms. Boston: Springer; 2011.
104. Reynolds DJ, Aronson JK. ABC of monitoring drug therapy. Making the most of plasma drug concentration measurements. *BMJ (Clinical research ed)* 1993; **306**(6869): 48-51.
105. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *The Korean journal of internal medicine* 2009; **24**(1): 1-10.
106. Adaway JE, Keevil BG. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; **883-884**: 33-49.
107. Unterecker S, Hefner G, Baumann P, et al. [Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology : Summary of the consensus guidelines 2017 of the TDM task force of the AGNP]. *Der Nervenarzt* 2019; **90**(5): 463-71.
108. Wuttke H, Rau T, Heide R, et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2002; **72**(4): 429-37.
109. Rau T, Heide R, Bergmann K, et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 2002; **12**(6): 465-72.
110. Son H, Lee D, Lim LA, Jang SB, Roh H, Park K. Development of a pharmacokinetic interaction model for co-administration of simvastatin and amlodipine. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2014; **29**(2): 120-8.
111. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine* 2005; **352**(21): 2211-21.
112. Jaquenoud Sirot E, van der Velden JW, Rentsch K, Eap CB, Baumann P. Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic tests as tools in pharmacovigilance. *Drug safety* 2006; **29**(9): 735-68.
113. Baroletti S, Dell'Orfano H. Medication adherence in cardiovascular disease. *Circulation* 2010; **121**(12): 1455-8.
114. Meddings J, Kerr EA, Heisler M, Hofer TP. Physician assessments of medication adherence and decisions to intensify medications for patients with uncontrolled blood pressure: still no better than a coin toss. *BMC health services research* 2012; **12**: 270.
115. Muntner P, Halanych JH, Reynolds K, et al. Low medication adherence and the incidence of stroke symptoms among individuals with hypertension: the REGARDS study. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2011; **13**(7): 479-86.
116. Herttua K, Tabák AG, Martikainen P, Vahtera J, Kivimäki M. Adherence to antihypertensive therapy prior to the first presentation of stroke in hypertensive adults: population-based study. *Eur Heart J* 2013; **34**(38): 2933-9.
117. Brinker S, Pandey A, Ayers C, et al. Therapeutic drug monitoring facilitates blood pressure control in resistant hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; **63**(8): 834-5.
118. Azizi M, Pereira H, Hamdidouche I, et al. Adherence to Antihypertensive Treatment and the Blood Pressure-Lowering Effects of Renal Denervation in the Renal Denervation for Hypertension (DENERHTN) Trial. *Circulation* 2016; **134**(12): 847-57.
119. Gupta P, Patel P, Horne R, Buchanan H, Williams B, Tomaszewski M. How to Screen for Non-Adherence to Antihypertensive Therapy. *Current hypertension reports* 2016; **18**(12): 89.
120. Patel P, Gupta PK, White CM, Stanley AG, Williams B, Tomaszewski M. Screening for non-adherence to antihypertensive treatment as a part of the diagnostic pathway to renal denervation. *Journal of human hypertension* 2016; **30**(6): 368-73.

121. Rabbia F, Fulcheri C, Di Monaco S, et al. Adherence to antihypertensive therapy and therapeutic dosage of antihypertensive drugs. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension* 2016; **23**(4): 341-5.
122. Avataneo V, De Nicolò A, Rabbia F, et al. Therapeutic drug monitoring-guided definition of adherence profiles in resistant hypertension and identification of predictors of poor adherence. *British journal of clinical pharmacology* 2018; **84**(11): 2535-43.
123. Corrao G, Parodi A, Nicotra F, et al. Better compliance to antihypertensive medications reduces cardiovascular risk. *J Hypertens* 2011; **29**(3): 610-8.
124. Jannetto PJF, Robert L. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clinical chemistry* 2016; **62**(1): 92-8.
125. Koçkaya G, Wertheimer A. Can we reduce the cost of illness with more compliant patients? An estimation of the effect of 100% compliance with hypertension treatment. *Journal of pharmacy practice* 2011; **24**(3): 345-50.
126. Sokol MC, McGuigan KA, Verbrugge RR, Epstein RS. Impact of medication adherence on hospitalization risk and healthcare cost. *Med Care* 2005; **43**(6): 521-30.
127. Chung O, Vongpatanasin W, Bonaventura K, et al. Potential cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring in patients with resistant hypertension. *J Hypertens* 2014; **32**(12): 2411-21; discussion 21.
128. Geisler BP, Egan BM, Cohen JT, et al. Cost-effectiveness and clinical effectiveness of catheter-based renal denervation for resistant hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; **60**(14): 1271-7.
129. Dragomir A, Côté R, Roy L, et al. Impact of adherence to antihypertensive agents on clinical outcomes and hospitalization costs. *Med Care* 2010; **48**(5): 418-25.
130. Pittman DG, Tao Z, Chen W, Stettin GD. Antihypertensive medication adherence and subsequent healthcare utilization and costs. *The American journal of managed care* 2010; **16**(8): 568-76.
131. Burnier M, Egan BM. Adherence in Hypertension. *Circulation research* 2019; **124**(7): 1124-40.
132. Nguyen TM, La Caze A, Cottrell N. What are validated self-report adherence scales really measuring?: a systematic review. *British journal of clinical pharmacology* 2014; **77**(3): 427-45.
133. Morisky DE, Ang A, Krousel-Wood M, Ward HJ. Predictive validity of a medication adherence measure in an outpatient setting. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2008; **10**(5): 348-54.
134. El Alili M, Vrijens B, Demonceau J, Evers SM, Hilgsmann M. A scoping review of studies comparing the medication event monitoring system (MEMS) with alternative methods for measuring medication adherence. *British journal of clinical pharmacology* 2016; **82**(1): 268-79.
135. Karve S, Cleves MA, Helm M, Hudson TJ, West DS, Martin BC. Good and poor adherence: optimal cut-point for adherence measures using administrative claims data. *Curr Med Res Opin* 2009; **25**(9): 2303-10.
136. Qvarnström M, Kahan T, Kieler H, et al. Persistence to antihypertensive drug treatment in Swedish primary healthcare. *European journal of clinical pharmacology* 2013; **69**(11): 1955-64.
137. Choo PW, Rand CS, Inui TS, et al. Validation of patient reports, automated pharmacy records, and pill counts with electronic monitoring of adherence to antihypertensive therapy. *Med Care* 1999; **37**(9): 846-57.
138. Christensen A, Osterberg LG, Hansen EH. Electronic monitoring of patient adherence to oral antihypertensive medical treatment: a systematic review. *J Hypertens* 2009; **27**(8): 1540-51.

139. Checchi KD, Huybrechts KF, Avorn J, Kesselheim AS. Electronic medication packaging devices and medication adherence: a systematic review. *Jama* 2014; **312**(12): 1237-47.
140. Burnier M, Wuerzner G, Struijker-Boudier H, Urquhart J. Measuring, analyzing, and managing drug adherence in resistant hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2013; **62**(2): 218-25.
141. Blaschke TF, Osterberg L, Vrijens B, Urquhart J. Adherence to medications: insights arising from studies on the unreliable link between prescribed and actual drug dosing histories. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2012; **52**: 275-301.
142. Paterson M, Kinnear M, Bond C, McKinstry B. A systematic review of electronic multi-compartment medication devices with reminder systems for improving adherence to self-administered medications. *Int J Pharm Pract* 2017; **25**(3): 185-94.
143. Burnier M, Egan BM. Adherence in Hypertension. *Circulation research* 2019; **124**(7): 1124-40.
144. Vrijens B, Urquhart J. Methods for measuring, enhancing, and accounting for medication adherence in clinical trials. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2014; **95**(6): 617-26.
145. Fadl Elmula FE, Hoffmann P, Larstorp AC, et al. Adjusted drug treatment is superior to renal sympathetic denervation in patients with true treatment-resistant hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2014; **63**(5): 991-9.
146. Hameed MA, Tebbit L, Jacques N, Thomas M, Dasgupta I. Non-adherence to antihypertensive medication is very common among resistant hypertensives: results of a directly observed therapy clinic. *Journal of human hypertension* 2016; **30**(2): 83-9.
147. Hjørnholm U, Larstorp ACK, Andersen MH, Høieggen A. Directly observed therapy prior to ambulatory blood pressure measurement (DOT-HTN) in uncontrolled hypertensive patients - Effect on blood pressure, safety and patient perception. *Blood Press* 2019; **28**(5): 327-35.
148. Ruzicka M, Leenen FHH, Ramsay T, et al. Use of Directly Observed Therapy to Assess Treatment Adherence in Patients With Apparent Treatment-Resistant Hypertension. *JAMA Intern Med* 2019; **179**(10): 1433-4.
149. Pio-Abreu A, Trani-Ferreira F, Silva GV, Bortolotto LA, Drager LF. Directly observed therapy for resistant/refractory hypertension diagnosis and blood pressure control. *Heart (British Cardiac Society)* 2022.
150. Hjørnholm U, Aamodt M, Larstorp AC, et al. Directly Observed Therapy in Hypertension (DOT-HTN). In: Burnier M, ed. *Drug Adherence in Hypertension and Cardiovascular Protection*. Cham: Springer International Publishing; 2018: 57-85.
151. Halvorsen LV, Bergland OU, Søråas CL, et al. Nonadherence by Serum Drug Analyses in Resistant Hypertension: 7-Year Follow-Up of Patients Considered Adherent by Directly Observed Therapy. *Journal of the American Heart Association* 2022; **11**(18): e025879.
152. Vrijens B, De Geest S, Hughes DA, et al. A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. *British journal of clinical pharmacology* 2012; **73**(5): 691-705.
153. Durand H, Hayes P, Morrissey EC, et al. Medication adherence among patients with apparent treatment-resistant hypertension: systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 2017; **35**(12): 2346-57.
154. Thorstensen CW, Clasen PE, Rognstad S, et al. Development of UHPLC-MS/MS methods to quantify 25 antihypertensive drugs in serum in a cohort of patients treated for hypertension. *J Pharm Biomed Anal* 2022; **219**: 114908.

155. Qi W, Zhao Q, Jiang J, Hu P. Simultaneous determination of olmesartan and amlodipine in human plasma and urine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; **938**: 27-34.
156. Wu Y, Yang J, Duan C, et al. Simultaneous determination of antiretroviral drugs in human hair with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018; **1083**: 209-21.
157. Richter LHJ, Jacobs CM, Mahfoud F, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR. Development and application of a LC-HRMS/MS method for analyzing antihypertensive drugs in oral fluid for monitoring drug adherence. *Anal Chim Acta* 2019; **1070**: 69-79.
158. Tanna S, Lawson G. Dried blood spot analysis to assess medication adherence and to inform personalization of treatment. *Bioanalysis* 2014; **6**(21): 2825-38.
159. Ritscher S, Hoyer M, Georges C, et al. Benefit of serum drug monitoring complementing urine analysis to assess adherence to antihypertensive drugs in first-line therapy. *PLoS One* 2020; **15**(8): e0237383.
160. Ma Y, Qin F, Sun X, Lu X, Li F. Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007; **43**(4): 1540-5.
161. Yan T, Li H, Deng L, et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2008; **48**(4): 1225-9.
162. Gao F, Zhang M, Cui X, Wang Z, Sun Y, Gu J. Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2010; **52**(1): 149-54.
163. Bharathi DV, Hotha KK, Chatki PK, Satyanarayana V, Venkateswarlu V. LC-MS/MS method for simultaneous estimation of candesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and its use in clinical pharmacokinetics. *Bioanalysis* 2012; **4**(10): 1195-204.
164. Hotha KK, Roychowdhury S, Mullangi R, Ravindranath LK. Rapid quantification of amlodipine enantiomers in human plasma by LC-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 2013; **27**(9): 1192-9.
165. Patel JR, Pethani TM, Vachhani AN, Sheth NR, Dudhrejiya AV. Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014; **970**: 53-9.
166. Tatar S, Atmaca S. Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 2001; **758**(2): 305-10.
167. Liu D, Jiang J, Wang P, Feng S, Hu P. Simultaneous quantitative determination of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; **878**(9-10): 743-8.
168. Jangala H, Vats P, Khuroo AH, Monif T. Development and Validation of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Estimation of Amlodipine and Valsartan in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Sci Pharm* 2014; **82**(3): 585-600.
169. Antunes Nde J, Cavalli RC, Marques MP, Lanchote VL. Stereoselective determination of metoprolol and its metabolite alpha-hydroxymetoprolol in plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics during pregnancy. *Chirality* 2013; **25**(1): 1-7.

170. De Nicolo A, Avataneo V, Rabbia F, et al. UHPLC-MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients. *J Pharm Biomed Anal* 2016; **129**: 535-41.
171. Gundersen POM, Helland A, Spigset O, Hegstad S. Quantification of 21 antihypertensive drugs in serum using UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018; **1089**: 84-93.
172. Gonzalez O, Iriarte G, Rico E, et al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; **878**(28): 2685-92.
173. Dias E, Hachey B, McNaughton C, et al. An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; **937**: 44-53.
174. Rao Z, Ma YR, Qin HY, et al. Development of a LC-MS/MS method for simultaneous determination of metoprolol and its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and O-desmethylnmetoprolol, in rat plasma: application to the herb-drug interaction study of metoprolol and breviscapine. *Biomed Chromatogr* 2015; **29**(9): 1453-60.
175. Sigaroudi A, Kinzig M, Wahl O, et al. Quantification of Bisoprolol and Metoprolol in Simultaneous Human Serum and Cerebrospinal Fluid Samples. *Pharmacology* 2018; **101**(1-2): 29-34.
176. Johannsen JO, Reuter H, Hoffmann F, et al. Reliable and easy-to-use LC-MS/MS-method for simultaneous determination of the antihypertensives metoprolol, amlodipine, canrenone and hydrochlorothiazide in patients with therapy-refractory arterial hypertension. *J Pharm Biomed Anal* 2019; **164**: 373-81.
177. Williams B, MacDonald TM, Morant S, et al. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet* 2015; **386**(10008): 2059-68.

6. Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der arteriellen Hypertonie gemäß ESC-Leitlinien 2018 ¹	10
Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften	15

6.2 Supplement zur Publikation

Suppl. Table 1: Detailed settings of the MS method

Analyte	Parent (m/z)	Product(m/z)	CE (V)	S-lens (V)
AML ^a	409.1	238.0	9	71
AML ^b	409.1	294.1	9	71
[¹³ C ₆]-AML ^c	415.1	244.1	9	69

CAN ^a	341.2	91.0	48	111
CAN ^b	341.2	107.1	29	111
[² H ₄]-CAN ^c	345.2	107.1	29	106
HCT ^a	296.0	205.1	-24	-109
HCT ^b	296.0	269.0	-24	-109
[¹³ C ₆]-HCT ^c	302.0	275.1	-20	-107
MET ^a	268.2	74.1	21	91
MET ^b	268.2	116.1	17	91
[² H ₇]-MET ^c	275.2	123.2	18	99

- Supp. Table 1: a: quantifier; b: qualifier; c: isotope labeled analogues; MET: Metoprolol; AML: Amlodipin; HCT: Hydrochlorothiazide; CAN: Canrenone

Suppl. Table 2: Concentrations of CS and IQC [$\mu\text{g/L}$] of the analytes

Sample	MET.	AML	HCT	CAN
CS1	5	1	5	10
CS2	50	10	75	75
CS3	125	15	150	150
CS4	250	25	250	250
CS5	375	35	350	350
CS6	500	45	450	450
CS7	750	50	500	500
IQC1	10	5	10	10
IQC2	225	30	225	120
IQC3	6000	45	480	220

- Supp. Table 2: CS: calibratorstandards; IQC: intern quality controls; MET: Metoprolol; AML: Amlodipin; HCT: Hydrochlorothiazide; CAN: Canrenone