

Quantificação de quatro imunossupressores por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa “tandem”.

Maria João Mendes Mendonça Barreira
Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Introdução

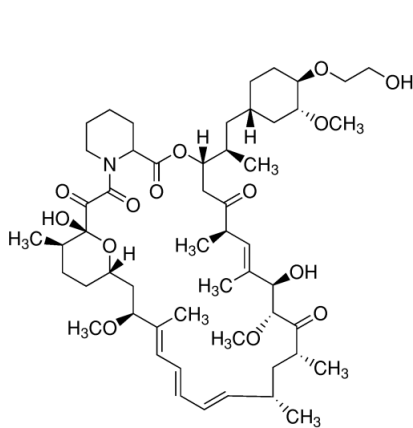
- **Imunossupressores:** fármacos administrados de forma continuada a doentes após transplante para evitar rejeição do órgão transplantado.
- A monitorização dos níveis sanguíneos destes fármacos (TDM) é essencial devido à sua estreita janela terapêutica.
- Os métodos analíticos utilizados para a quantificação de imunossupressores devem ser adequados e o tempo de resposta deve ser reduzido de modo a que o médico possa ajustar a dose antes da toma seguinte.

Introdução

- Os métodos analíticos mais utilizados para quantificação de imunossuppressores incluem os imunoensaios e os métodos cromatográficos com diferentes detectores.
- A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa “tandem” (LC-MS/MS) é um dos métodos utilizados e distingue-se do imunoensaio por ter a capacidade de identificar e quantificar o composto activo e não os seus metabolitos.

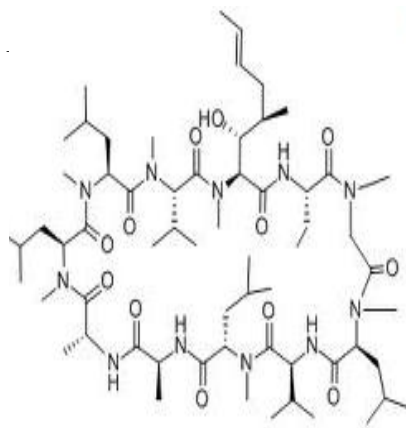
Objectivo

- Implementar um método rápido e simples, por LC-MS/MS, para a determinação simultânea de 4 imunossupressores, em sangue total.



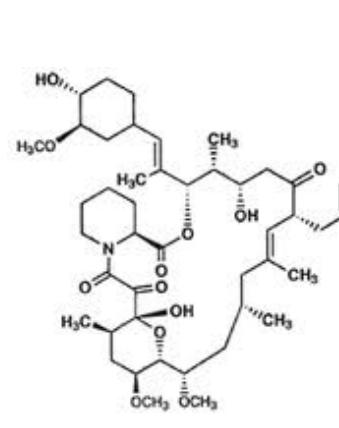
Ciclosporina A
(CsA)

Mm 1202.8



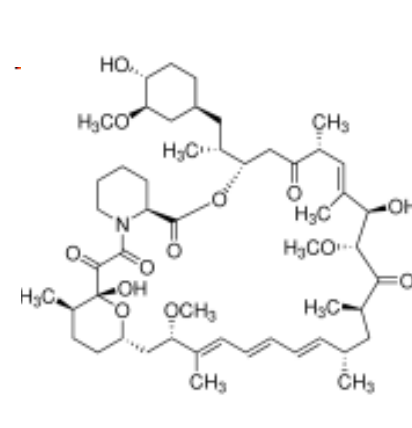
Everolimus
(Ever)

Mm 958.2



Tacrolimus
(Tac)

Mm 804.0



Sirolimus
(Sir)

Mm 914.2

Material e Métodos

- Equipamento: LC-MS/MS API 3200, AB SCIEX, ligado a HPLC Agilent 1200.
- Controlos e calibradores: RECIPE ou Chromsystems.
- Método: Desenvolvido pela AB SCIEX, que definiu as condições de HPLC e MS.
- Com base neste método optimizaram-se as condições de preparação da amostra e efectuaram-se estudos de validação.

Material e Métodos

Análise por MS: ESI positivo; Modo Multiple reaction monitoring (MRM)

Transições de MRM para os analitos e para os padrões internos

Analyte	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	RT (min.)
Ciclosporina A	1202.8	425.4	1.17
Everolimus	975.7	908.7	1.09
Tacrolimus	821.5	768.4	1.09
Sirolimus	931.7	864.6	1.09
Internal standards			
Ciclosporina D	1216.8	425.4	1.17
Ascomicina	809.5	756.4	1.09

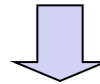
Material e Métodos

Condições analíticas do HPLC	
Modo	Gradiente
Fase móvel A	Água: acetato amónio: ácido fórmico (997:2:1)
Fase móvel B	metanol: acetato amónio: ácido fórmico (997:2:1)
Fluxo	0.750 mL/min
Temperatura forno coluna	60° C
Temperatura “autosampler”	10° C
Pré-coluna	C ₁₈ ; 4x3 mm
Volume injeção	50 µL
Tempo de corrida	2 min.

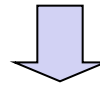
Material e Métodos

Preparação
da amostra

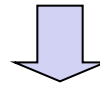
200 μ L de
Reag. de precipitação de proteína



Adição 100 μ L de sangue total

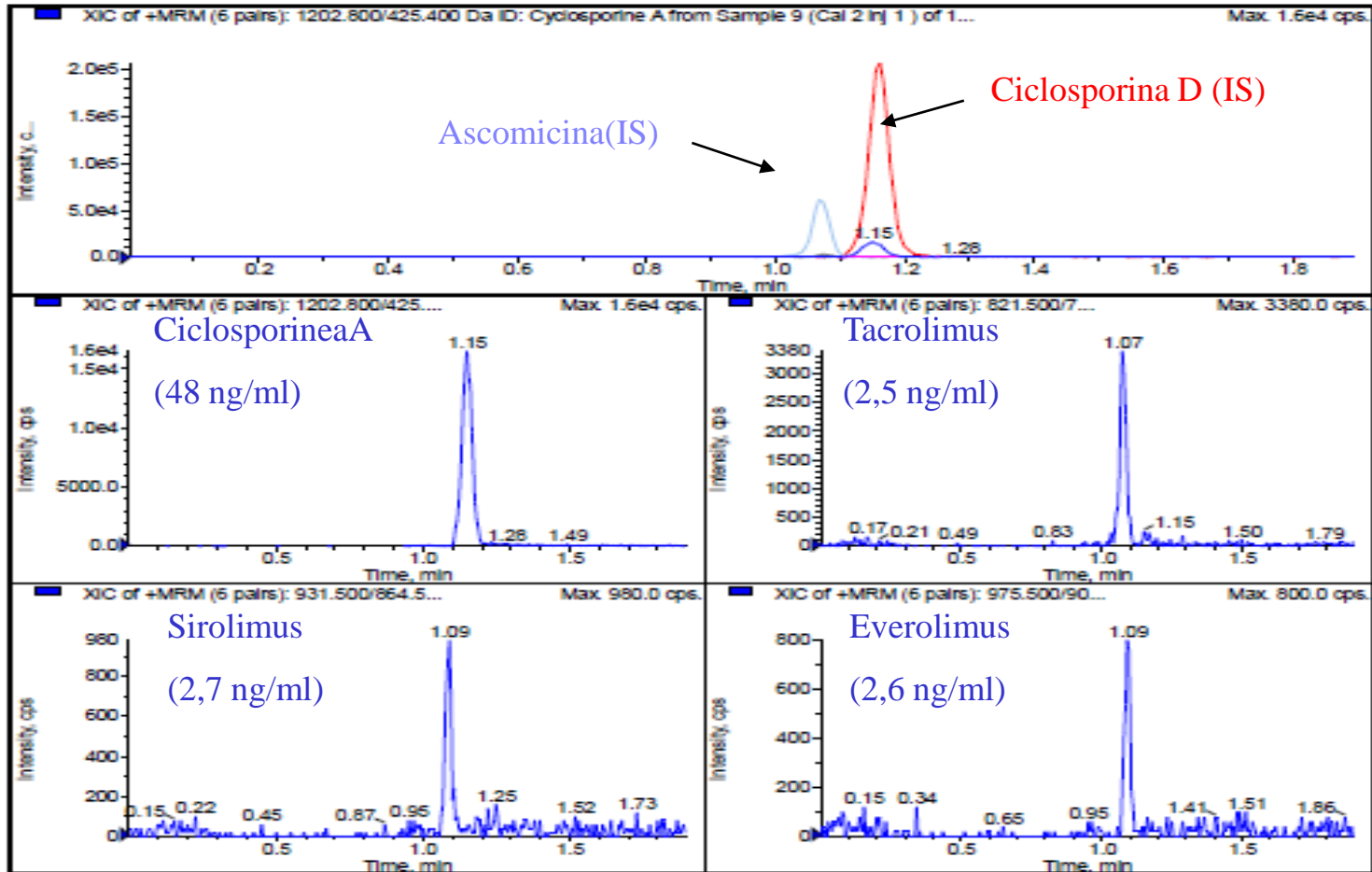


12000 rpm / 10 min



Injectar sobrenadante

Resultados e discussão



Resultados e discussão

1. Linearidade

Analito	Curva de calibração					
	Gama (ng/mL)	R ²	CV _m (%) <10%	Teste RIKILT (90-110)%	Teste Mandel (PG<F)	
					PG	F
Ciclosporina A	48 - 1350	0.9999	1.4	96-102	0.7	18.5
Everolimus	2.6 - 44.9	0.9997	1.9	89-104	1.5	18.5
Tacrolimus	2.5 - 39.7	0.9998	2.1	98-102	1.3	18.5
Sirolimus	2.7 - 44.3	0.9996	2.5	96-107	-2.0	18.5

F: Distribuição de Fisher Snedecor; (1, N-3);95%

PG: Valor teste

Resultados e discussão

2. Limiares analíticos

Analito	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Ciclosporina A	14	48
Everolimus	0.9	2.6
Tacrolimus	0.7	2.5
Sirolimus	1.0	2.7

Resultados e discussão

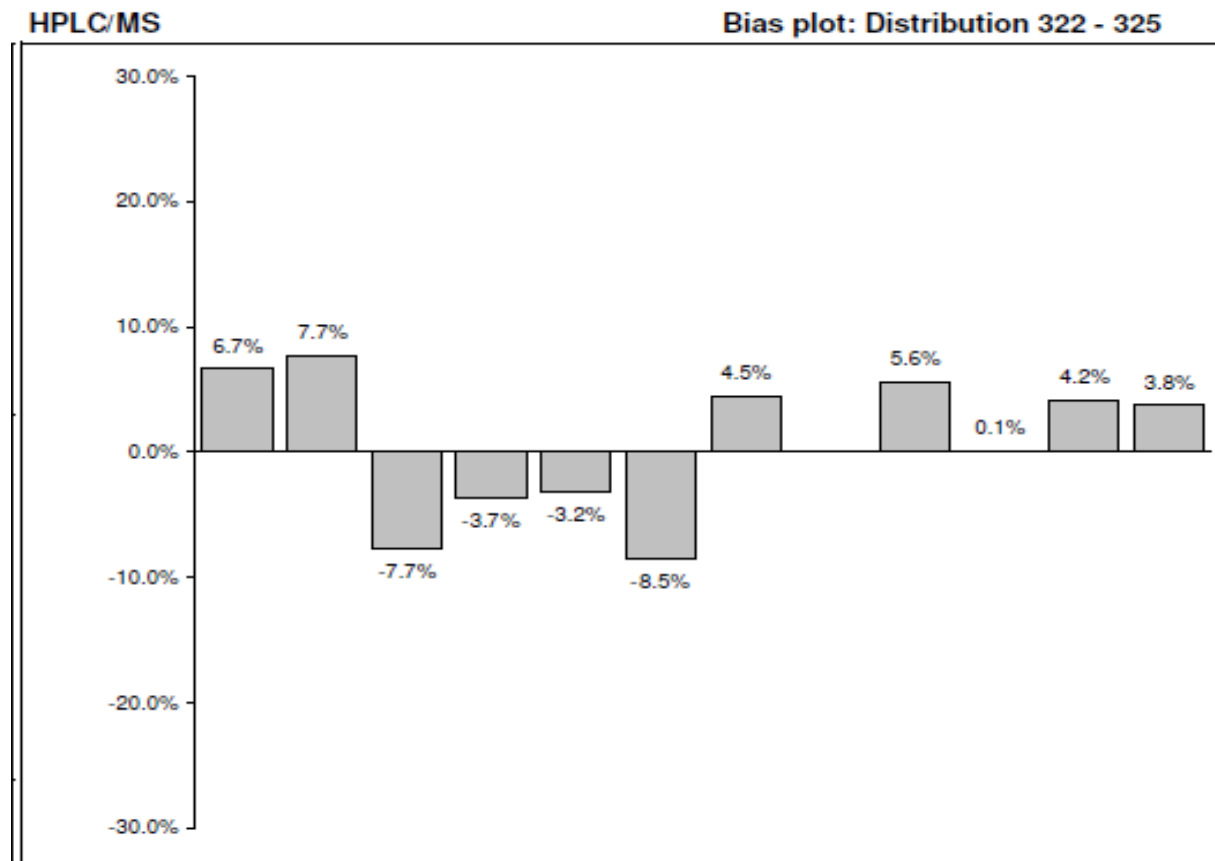
3. Repetibilidade

Analito	RSD(%)		
	Baixo (QC I)	Médio (QC II)	Elevado (QC III)
Ciclosporina A	3.8	2.7	1.9
Everolimus	11.2	10.8	8.8
Tacrolimus	7.9	5.4	5.4
Sirolimus	12.8	5.3	4.8

Resultados e discussão

4. Exactidão

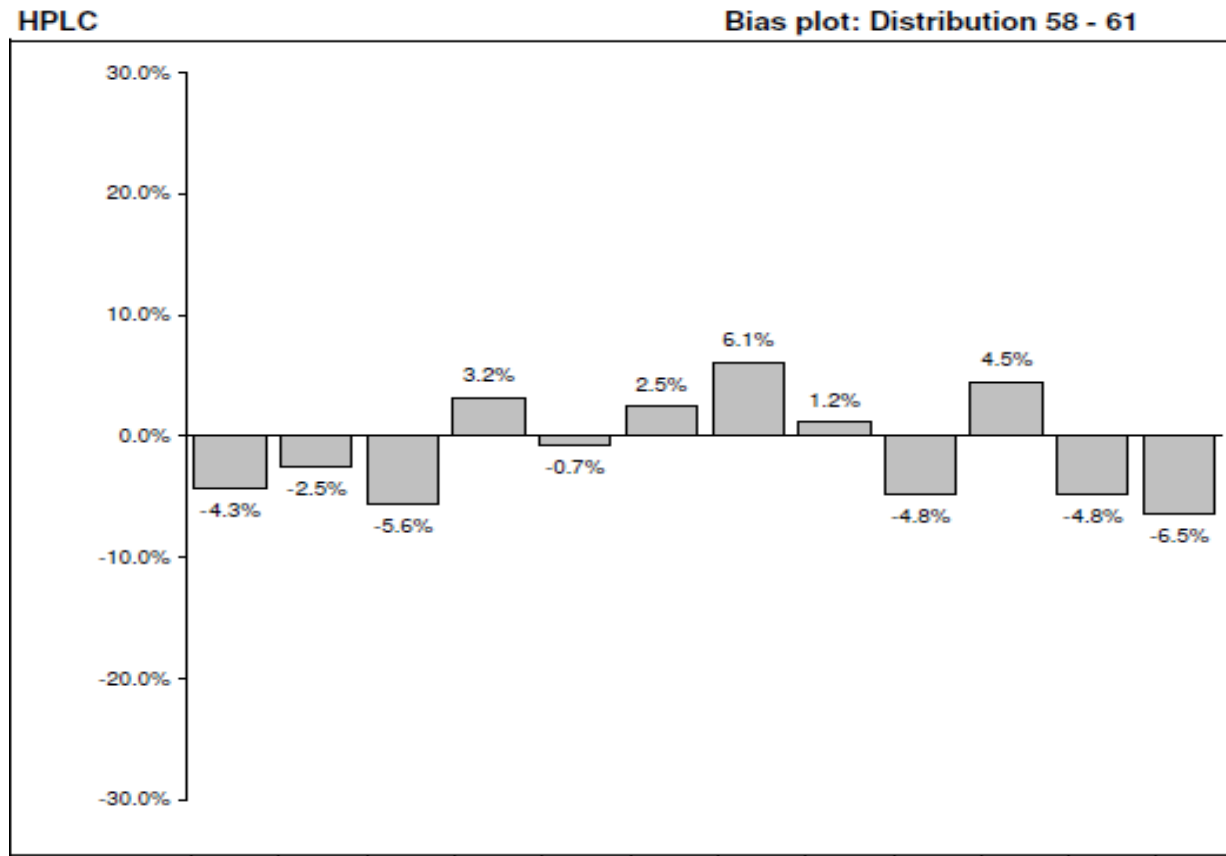
Resultados da participação no ensaio interlaboratorial UK NEQAS
Ciclosporina A



Resultados e discussão

4. Exactidão

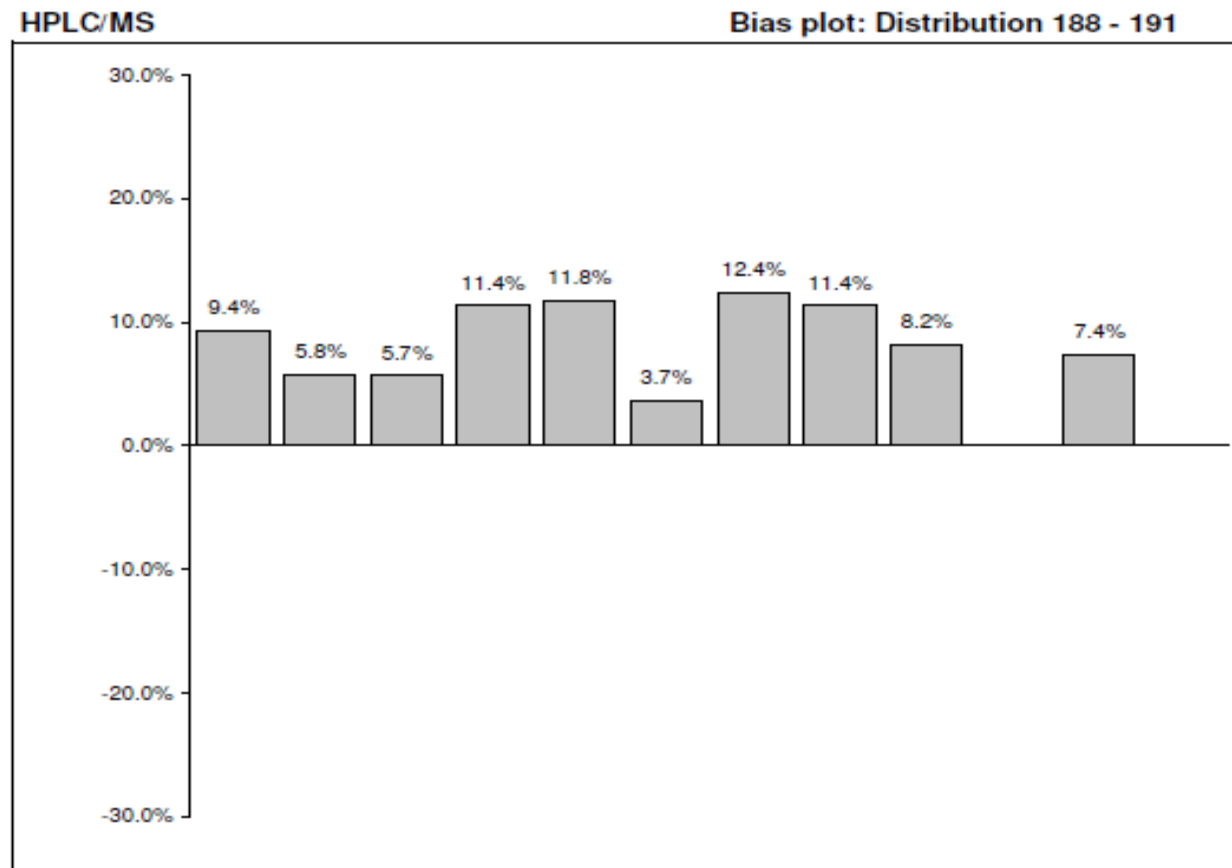
Resultados da participação no ensaio interlaboratorial UK NEQAS Everolimus



Resultados e discussão

4. Exactidão

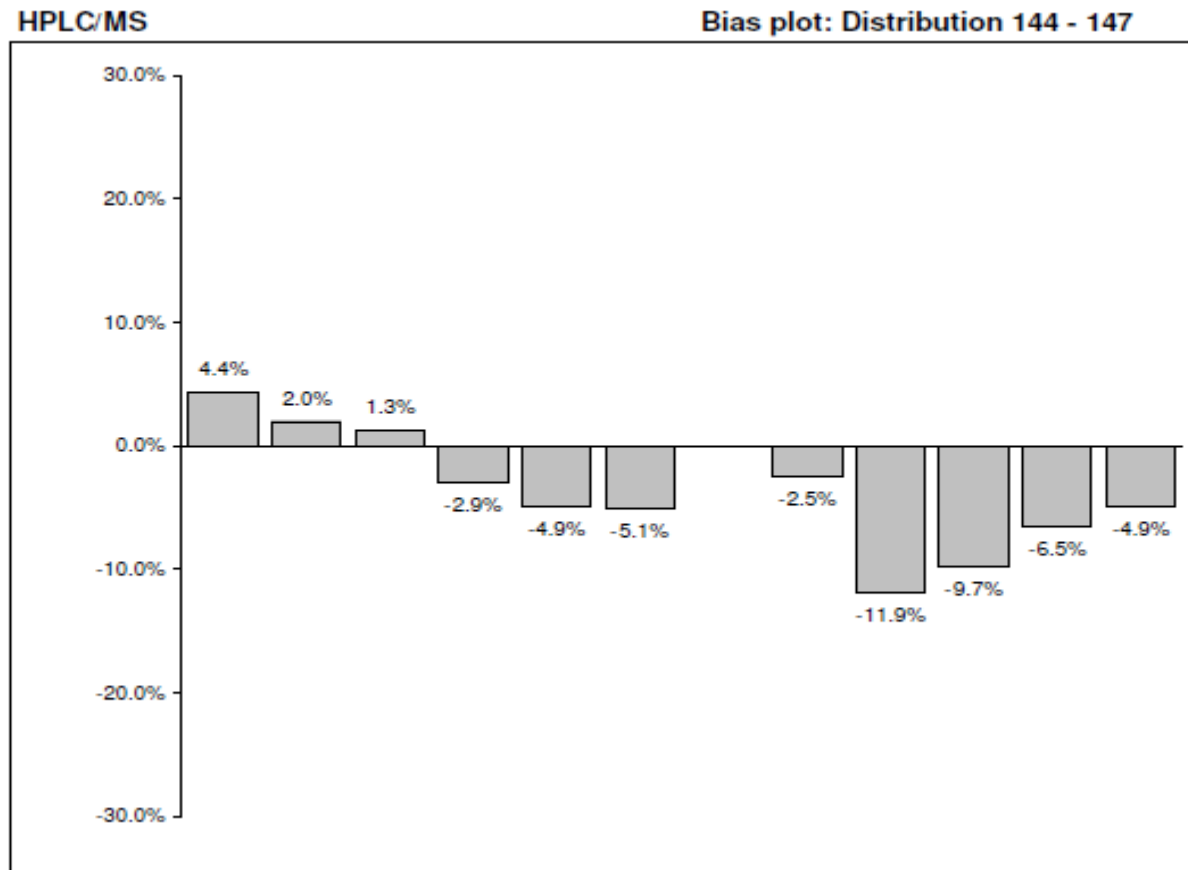
Resultados da participação no ensaio interlaboratorial UK NEQAS Tacrolimus



Resultados e discussão

4. Exactidão

Resultados da participação no ensaio interlaboratorial UK NEQAS
Sirolimus



Resultados e discussão

5. Amostras

Níveis de everolimus em 35 amostras

Everolimus (ng/mL)			
	Níveis Sub-terapêuticos (<3)	Níveis terapêuticos (3-8)	Níveis tóxicos (>8)
Nº de amostras	22 (60%)	13 (37%)	1 (2.8 %)

Conclusões

- O método de LC-MS/MS apresenta um bom desempenho analítico, permitindo analisar de forma rápida, específica, precisa e exacta os imunossuppressores CsA, Ever, Sir e Tac, em amostras de sangue total, o que faz dele um método adequado para utilizar na monitorização terapêutica destes fármacos.

Agradecimentos

- Dra. Adelina Gomes do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Responsável pelo projecto QCA III que permitiu a aquisição do LC-MS/MS.
- Dra. Maria Jorge Arroz do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental por ter disponibilizado as amostras.