

Quantificação de quatro imunossuppressores por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa "tandem"

INTRODUÇÃO

Os imunossuppressores são fármacos administrados a doentes após transplante de órgãos sólidos e a monitorização dos seus níveis no sangue é fundamental devido à estreita janela terapêutica destes compostos. A quantificação de imunossuppressores pode ser efectuada por imunensaio ou por cromatografia líquida com diferentes tipos de detecção. A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (LC-MS/MS) é um método adequado para a determinação destes fármacos e tem vindo a ser implementada por vários laboratórios em substituição do imunensaio uma vez que tem a capacidade de medir o composto activo e não os respectivos metabolitos.

Os métodos usados na monitorização terapêutica de fármacos devem obedecer a requisitos de desempenho aceitáveis e ter um tempo de resposta curto de modo a permitir que o médico ajuste a dosagem antes da toma seguinte.

OBJECTIVO

O objectivo deste trabalho foi o de implementar um método rápido e simples por LC-MS/MS¹ para a determinação simultânea de quatro imunossuppressores: ciclosporina A (CsA), everolimus (EVER), tacrolimus (TAC) e sirolimus (SIR) em sangue total, usando ciclosporina D (CsD) como padrão interno (IS) para CsA e ascomicina (ASC) como padrão interno para EVER, TAC e SIR.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões

Curva de calibração com seis pontos, de mistura dos quatro compostos, em sangue total, incluindo branco de amostra, da RECIPE.

Controlo de qualidade

Controlos em sangue total, dos quatro compostos, níveis baixo, médio e alto: QC I, QC II e QC III, respectivamente, da RECIPE.

O laboratório participa nos ensaios interlaboratoriais organizados pelo "United Kingdom National External Quality Assessment (UK NEQAS)".

Análise por LC-MS/MS

Equipamento: API 3200 espectrómetro de massa "tandem", triplo quadrupolo, (AB SCIEX) com ionização por electrospray (ESI) ligado a um HPLC Agilent 1200. Condições de funcionamento: ESI positivo e em "multiple reaction monitoring (MRM)".

Pré-coluna do HPLC: C18, Phenomenex, 4 × 3 mm.

As condições analíticas foram estabelecidas com base num método desenvolvido pela AB SCIEX. As transições monitorizadas (Q1/Q3) e os tempos de retenção (TR) para cada composto indicam-se na tabela abaixo.

Condições cromatográficas e de MS

Composição das fases móveis A e B, respectivamente - água:acetato amónio:ácido fórmico (997:2:1) e metanol: acetato amónio: ácido fórmico (997:2:1). Eluição em modo gradiente a fluxo de 0,750 mL/min. Temperatura forno: 60°C. Volume de injeção: 50µL; tempo de corrida: 2 minutos.

Fundamento do método

A preparação da amostra é simples e envolve a adição de reagente de precipitação de proteínas a 100 µL de sangue total. Após centrifugação injecta-se o sobrenadante numa pré-coluna C18 ligada directamente à fonte de electrospray do MS. A determinação dos quatro compostos é feita em simultâneo.

Amostras

Foram analisadas 35 amostras de sangue total de doentes após transplante, para quantificação de everolimus.

Analito	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

Padrão interno	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	RT (min.)
Ciclosporina D	1216.8	425.4	1.17
Ascomicina	809.5	756.4	1.09

RESULTADOS E CONCLUSÕES

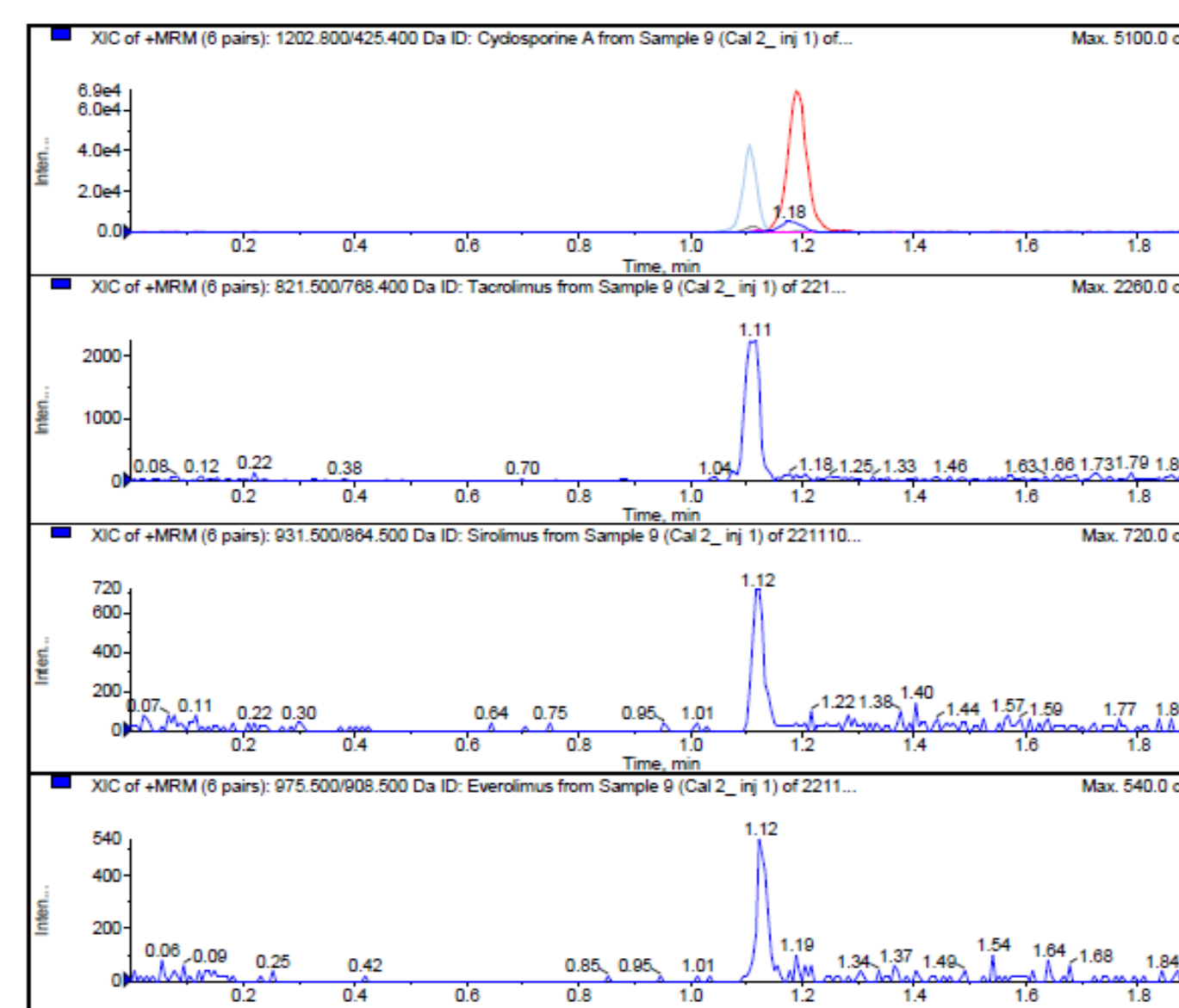
A figura mostra um cromatograma de um dos calibradores da curva de calibração.

Identificação dos picos:

Primeiro painel: linha azul escura - CsA; linha vermelha - CsD, linha azul clara - ASC;

Outros três painéis: a linha azul escura - TAC, SIR e EVER, respectivamente.

Concs (ng/mL): 48.4, 2.71, 2.46 e 2.62 for CsA, TAC, SIR e EVER, respectivamente.



1 - Linearidade

A linearidade foi avaliada através da utilização de diversos testes estatísticos incluindo o coeficiente de determinação (R²), coeficiente de variação do método (CV_m), análise residual, teste de RIKILT² e teste de Mandel.

Analito	Gama (ng/mL)	R ²	CV _m (%)	Análise Residual (± 10%)	Teste de RIKILT (90 to 110) %	Teste de Mandel	
						PG	F (1, N-3); 95%
Ciclosporina A	48 - 1350	0.9999	1.4	-3,7 to 6.3	96 to 102	0.7	18.5
Everolimus	2.6 - 44.9	0.9997	1.9	-1.7 to 5.7	89 to 104	1.5	18.5
Tacrolimus	2.5 - 39.7	0.9998	2.1	-2.0 to 5.1	98 to 102	1.3	18.5
Sirolimus	2.7 - 44.3	0.9996	2.5	-5.1 to 10.3	96 to 107	-2.0	18.5

PG = valor teste; F = valor da distribuição de Snedecor/Fisher

Acknowledgements: Dra Adelina Gomes from INSA, the responsible for QCA III project for LC-MS/MS acquisition and Dra Maria Jorge Arroz from Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental for financial support of method implementation and for providing all the patient samples included in this study.

2 - Limiares analíticos

Foram analisadas dez soluções de calibração com uma concentração de imunossupressor igual à do limite inferior da curva de calibração e determinou-se o desvio padrão (SD) das áreas dos picos. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados usando a fórmula (3 × SD) e (10 × SD), respectivamente, e convertidos em ng/mL.

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

3 - Repetibilidade

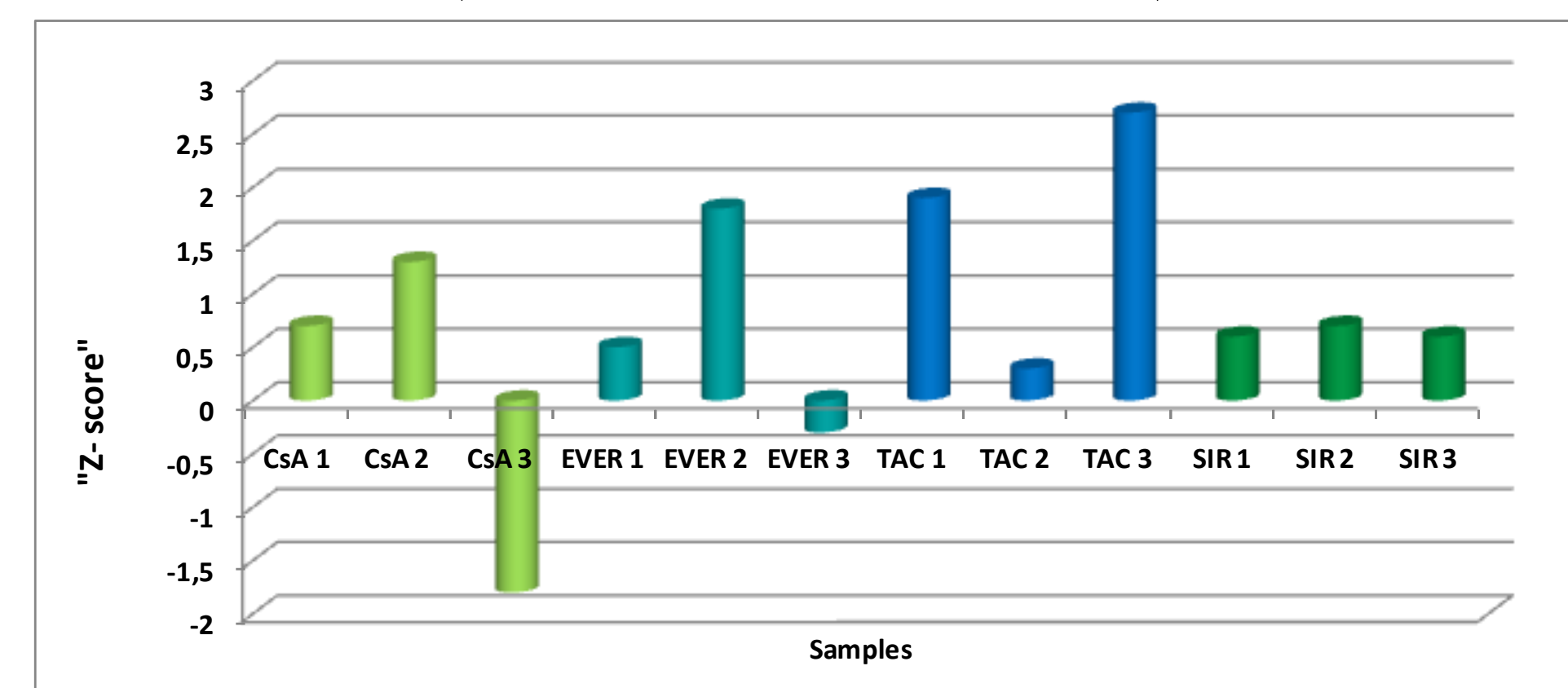
A repetibilidade foi estudada em amostras de sangue total, usadas como controlos, contendo os quatro compostos, a três níveis de concentração (baixo, médio e elevado). O desvio padrão relativo (RSD) de dez ensaios independentes para cada concentração é apresentado abaixo.

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

4 - Exactidão

A exactidão do método foi avaliada através da participação nos ensaios de avaliação externa da qualidade organizados pelo Reino Unido (UK NEQAS). Apresenta-se no gráfico seguinte os resultados de Z-score para cada imunossupressor obtidos num dos ensaios do NEQAS.

(|Z-score| < 2 Satisfatório; 2 < |Z-score| ≤ 3 Questionável; |Z-score| > 3 Incorrecto)³.



5- Amostras

O método de LC-MS/MS foi utilizado para determinar os níveis de everolimus em 35 amostras de doentes a receber tratamento apenas com este fármaco.

	Everolimus (ng/mL)		
	Nível sub-terapêutico (<3)	Nível terapêutico (3-8)	Nível tóxico (>8)
Nº de amostras	22 (60%)	13 (37%)	1 (2.8%)

Os resultados mostram que 22 das 35 amostras analisadas (60%) apresentam níveis de everolimus abaixo de 3 ng/mL, 13 das 35 (37%) apresentam níveis de everolimus entre 3 and 8 ng/mL e 1 amostra (2.8%) apresenta uma concentração de everolimus acima de 8 ng/mL.

CONCLUSÕES

- O método de LC-MS/MS é linear para todos os compostos dentro da gama estabelecida. Os limites de quantificação são adequados para a monitorização dos níveis de CsA, TAC, EVE and SIR. O desvio padrão relativo situa-se abaixo de 15% para todos os compostos e o método é exacto (|Z-score| ≤ 3).
- O método descrito apresenta um tempo de análise reduzido. O procedimento de extracção é simples e rápido e o tempo de corrida é de apenas 2 minutos. Nestas condições é possível preparar entre 20-50 amostras por dia.
- O método de LC-MS/MS foi utilizado para identificar e quantificar everolimus em 35 amostras de sangue.
- O método apresentado permite analisar de forma rápida, específica, precisa e exacta os analitos CsA, EVER, SIR and TAC numa larga gama de trabalho, fazendo dele um método adequado para utilização na monitorização terapêutica de fármacos.

REFERÊNCIAS

1. iMethod™ Test for Cliquant® Software. Experimental conditions to analyze immunosuppressants using LC-MS/MS.
2. Van Trijp, J. M. P. and Roos, A. H., RIKILT-DLO, RIKILT report 91.02, Wageningen, The Netherlands (1991).
3. AMC background paper. What is proficiency testing? Amcnp n. 2, January 2005. The Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, Burlington House, Piccadilly, London.