



Ciclosporine A bepaling op de LC-MS/MS

Abdel Chahbouni en René Vos

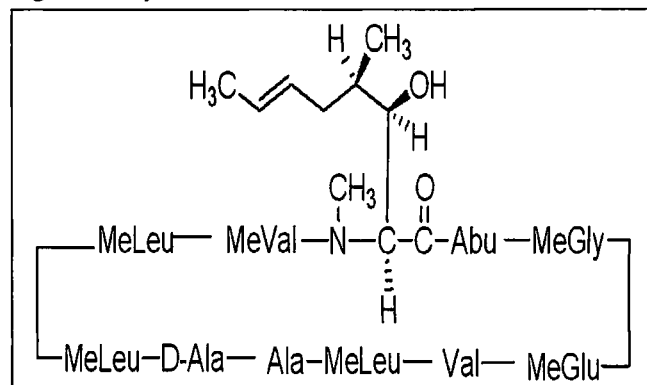
Laboratorium Klinische Farmacologie en Apotheek
VU medisch centrum
De Boelelaan 1117
a.chahbouni@vumc.nl

Inleiding

Ciclosporine A behoort tot de groep immuno-suppressiva. Ciclosporine A (fig.1) wordt toegediend aan patiënten om afstoting van een getransplanteerd orgaan tegen te gaan. Deze patiënten moeten hun hele leven immuno-suppressiva blijven gebruiken. Elke transplantatie-patiënt heeft een passende geneesmiddeltherapie nodig. Het is van belang om frequent de concentratie van het immuno-suppressiva in het bloed te bepalen. Een te lage spiegel kan namelijk alsnog afstoting tot gevolg hebben. Een te hoge spiegel kan nefrotoxiciteit geven.

Tot voor kort werden de Ciclosporines op het laboratorium Klinische Farmacologie en Apotheek geanalyseerd m.b.v. de Axsym. Deze methode heeft zo zijn nadelen, dure kits, minder specifiek en de cross-reactiviteit van het antilichaam op metabolieten van Ciclosporine. Daarom is er door het laboratorium Klinische Farmacologie en Apotheek besloten om, in navolging van het AZM, een LC-MS/MS aan te schaffen om Ciclosporine en Tacrolimus te bepalen. Het lab was mede overtuigd door de kosten en baten analyse uit diverse literatuur en uit eigen analyse. Een ander groot voordeel van de LC-MS/MS is, kijkend naar de toekomst, dat de LC-MS/MS gebruikt kan gaan worden voor veel meer analyses (bv. meer TDM-analyses en toxicologische screening). Het laboratorium heeft in eerste instantie voor het bepalen van alleen Ciclosporine gekozen. De reden hiervoor is het grote aanbod van Ciclosporine monsters.

Fig.1 Ciclosporine A



Enkele kinetische gegevens van CsA:

T_{max} = oraal 1-6 uur.

Plasma-eiwitbinding: 90%.

Metabolisering: door cytochroom P450-systeem in de lever, vnl. mono- en dihydroxylering en N-demethylering.

Eliminatie: vnl. met de feces, vnl. als metabolieten. T_{1/2el} = 6-27 uur.

Materiaal en Methode

De applicatie voor het bepalen van Ciclosporine A op de LC-MS/MS is door de firma Waters opgezet en is vervolgens door ons geoptimaliseerd. Naast de gebruikelijke validatie is tevens een vergelijkende studie t.o.v. Axsym uitgevoerd.

Apparatuur

Micromass Quattro micro API.

Alliance HPLC 2795 separations module.

Tabel 1 HPLC condities

Mobiele fase A	2 mM Ammoniumacetaat en 0.1% Mierenzuur in milli Q water.
Mobiele fase B	2 mM Ammoniumacetaat en 0.1% Mierenzuur in Methanol
Flow	0,600 ml/min
Injectie volume	20 µl
Autosampler temperatuur	10 °C
Kolom temperatuur	55 °C
Kolom	Waters Sentry guard kolom (2.1 x 10mm)

Tabel 2 Gradiënt tijdens de applicatie

Tijd (min)	Mobiele fase A (%)	Mobiele fase B (%)
0.00	50	50
0.40	0	100
1.00	50	50

Reagentia

Zinksulfaat, 26 mg/ml (VUmc)
Ciclosporine D (Waters MassTrack Immunosuppressants Kit)
Biosolve Acetonitril HPLC supra-gradient.
Biosolve Methanol abs. HPLC supra-gradient.
Ammoniumacetaat (VWR internationaal, Merck)
Mierenzuur (VWR internationaal, Merck)

Standaarden en controles

De standaarden en de controles zijn uit verschillende kits samengesteld. Naast de 6 standaarden van ChromSystems is er één extra standaard toegevoegd van 5 µg/L. Deze zelfgemaakte standaard is in blanko EDTA-bloed gemaakt.

Waters MassTrak Immunosuppressants Kit.
ChromSystems Multilevel Calibrator Set:
Immunosuppressants in whole blood.

Interne standaard

Ciclosporine D 25 ng/ml in Acetonitril uit Waters MassTrak

Tabel 4 MS method

Component	Precursor ion	Product ion	Dwell (secs)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
CsA	1219,90	1203,00	0,200	16	20
CsD	1233,90	1217,00	0,200	16	20

Immunosuppressants Kit.

MS/MS instelling en methode

De MS/MS instellingen zijn zowel apparaat als applicatie afhankelijk. Deze instellingen dienen per applicatie en massaspectrometer afgesteld (getuned) te worden. M.a.w. de instellingen zijn niet overdraagbaar op andere massaspectrometersystemen. Daarom zijn deze instellingen niet weergegeven. Nadat de MS/MS instellingen afgesteld zijn, volgt hieruit de methode. De MS-methode die gebruikt wordt is in tabel 4 weergegeven.

Werkwijze

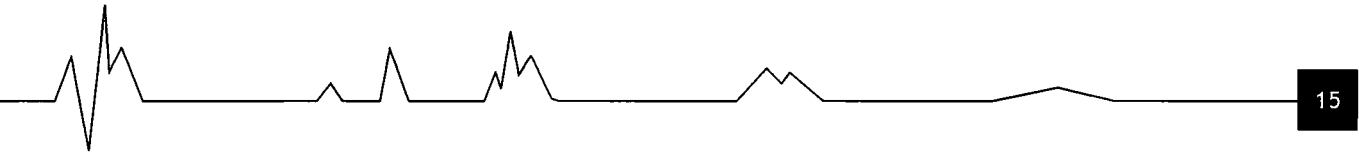
De voorbereiding van Cicloporine A geschiedt in EDTA-bloed.
Aan 20 µl EDTA-bloed wordt 80 µl Zinksulfaat toegevoegd. Het Zinksulfaat dient in dit geval voor de lysis van de bloedcellen. Na het mengen wordt er 200 µl interne standaard toegevoegd. De interne standaard is Ciclosporine D opgelost in Acetonitril. De Acetonitril dient voor de ont-eiwitting van het monster. Hierna volgt het mengen en centrifugeren. Vervolgens wordt het monster geïnjecteerd

Tabel 3. Concentratie standaarden en controles

	Concentratie (µ g/L)	Leverancier
Standaard 1	5,44	VUmc
Standaard 2	46,7	ChromSystems set
Standaard 3	115	ChromSystems set
Standaard 4	304	ChromSystems set
Standaard 5	483	ChromSystems set
Standaard 6	777	ChromSystems set
Standaard 7	1937	ChromSystems set
QC_1	100	ChromSystems set
QC_2	239	ChromSystems set
QC_3	493	ChromSystems set
QC_4	871	Waters Kit

Tabel 2 Stroomschema

op het systeem. Zie ook het bijgevoegde stroomschema.	
20 µl volbloed (EDTA)	↓
80 µl ZnSO4	↓
Vortex (30s)	↓
200 µl I.S. CsD (in ACN)	↓
Vortex (30s)	↓
Centrifugeren (5 min, 10.000 rpm)	↓
20 µ injecteren	



Validatiegegevens

De lineariteit is bepaald door de kalibratielijin in triplo op te werken en op dezelfde dag te analyseren. Zie tabel 5.
De gegevens uit tabel 5 zijn statistisch verwerkt in het programma Regres en statistisch getoetst met ANOVA, er is geen significantie lack of fit aangetoond.

Tabel 5 Lineraiteit

Validatiegebied 0-2000 µ g/L				
	Theoretische concentratie	Respons	Respons (duplo)	Respons (triplo)
Blanco (20 µ L)	0	-	-	-
standaard 1 (20 µ L)	5,44	0,028	0,032	0,032
standaard 2 (20 µ L)	46,70	0,199	0,177	0,181
standaard 3 (20µ L)	115,00	0,434	0,439	0,437
standaard 4 (20 µ L)	304,00	1,077	1,049	1,080
standaard 5 (20 µ L)	483,00	1,831	1,747	1,712
standaard 6 (20 µ L)	777,00	2,653	2,803	2,847
standaard 7 (20 µ L)	1937,00	6,688	6,502	6,835
	ANOVA: Geen significantie Lack of Fit			
LINEARITEIT: m.b.v. REGRES				
MODEL	y=a + bx			
	y = 0,04486 + 0,0344x			

De herhaalbaarheid is bepaald door vier controles van verschillende concentraties achtereenvolgens op één dag uit te voeren. Zie tabel 6.

Tabel 6 Herhaalbaarheid (= Intrady variation)

QC MONSTERS							
Val QC 1		Val QC 2		Val QC 3		Val QC 4	
Declaratie		Declaratie		Declaratie		Declaratie	
100,0µ g/L	99,9	239,0µ g/L	241,5	493,0µ g/L	522,7	871,0µ g/L	861,2
	99,5		233,3		532,2		866,9
	95,3		254,4		506,8		885,3
	102,2		257,2		513,2		843,7
	91,2		265,4		515,5		875,4
	107,8		245,7		507		903,7
Gemiddelde	99,3	Gemiddelde	249,6	Gemiddelde	516,2	Gemiddelde	872,7
SD	5,7	SD	11,6	SD	9,8	SD	20,7
Rel SD (eis<10%)	5,7%	Rel SD (eis<10%)	4,7%	Rel SD (eis<10%)	1,9%	Rel SD (eis<10%)	2,4%
Aantal analyses	6	Aantal analyses	6	Aantal analyses	6	Aantal analyses	6
JUISTHEID							
EIS 85-115 %	99,3%		104,4%		104,7%		100,2%

De reproduceerbaarheid en de juistheid zijn bepaald m.b.v. dezelfde controles gedurende 6 verschillende dagen. Zie tabel 7. Mogelijke uitbijters zijn getoetst met de Dixons-toets.

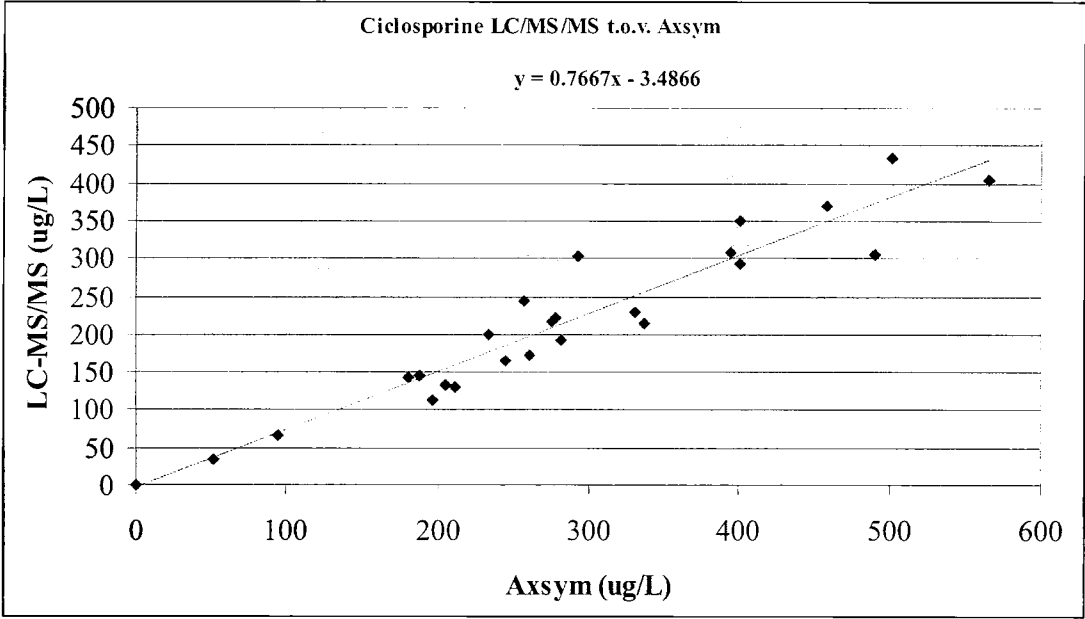
Tabel 7 Reproduceerbaarheid (= Interday variation)

QC MONSTERS							
Val QC 1		Val QC 2		Val QC 3		Val QC 4	
Declaratie		Declaratie		Declaratie		Declaratie	
100,0 µ g/L	98,5	239,0µ g/L	241,1	493,0µ g/L	493,9	871,0µ g/L	877,4
	101,9		212,5		484,1		915,8
	94,2		250,8		524,8		938,2
	92,5		248,3		478,6		867,9
	105,7		239,5		520,4		843,9
	101,5		239,9		522,2		843,8
Gemiddelde	99,1	Gemiddelde	238,7	Gemiddelde	504,0	Gemiddelde	881,2
SD	5,0	SD	13,7	SD	20,9	SD	38,5
Rel SD (eis<10%)	5,0%	Rel SD (eis<10%)	5,7%	Rel SD (eis<10%)	4,1%	Rel SD (eis<10%)	4,4%
Aantal analyses	6	Aantal analyses	6	Aantal analyses	6	Aantal analyses	6
JUISTHEID							
EIS 85-115 %	99,1 %		99,9 %		102,2 %		101,2%

LC-MS/MS t.o.v. Axsym

De vergelijking is uitgevoerd met bloed van patiënten die allogene stamceltransplantatie hebben ondergaan.

Grafiek 1 Vergelijking Ciclosporine LC-MS/MS t.o.v. Axsym



Discussie

Uit de vergelijking van Ciclosporine analyse op LC-MS/MS t.o.v. de Axsym is naar voren gekomen dat de waardes die op de LC-MS/MS gevonden zijn, 25% lager zijn dan die op de Axsym. De reden voor dit verschil is dat de immunoassay minder specifiek is en cross-reactiviteit heeft met de metabolieten. Voortaan zal de apotheker hiermee rekening moeten houden bij het geven van advies. Daarnaast veranderd het therapeutische concentratie gebied.

De hoeveelheid in gebruik te nemen EDTA-bloed is variabel. Dit hangt af van de gestelde specificaties aan de methode door de opdrachtgever. Hiermee wordt bedoeld dat het van belang is te weten dat de hoeveelheid in gebruik te nemen EDTA-bloed uiteindelijk de detectiegrens en bepalingsgrens beïnvloed.

De bepalingsgrens en de detectiegrens zijn resp. op 20 µg/L en 3 µg/L vastgesteld door ons.

De bepalingsgrens van Ciclosporine op de Axsym is vastgesteld 10 µg/L. De reden waarom we toch over gaan op de LC-MS/MS analyse is, naast de in de inleiding genoemde voordelen, de minimale hoeveelheid EDTA-bloed die we in gebruik kunnen nemen. Hierdoor kunnen we in nabije toekomst overgaan naar een bloedspot methode.

Literatuur

Farmacotherapeutisch kompas 2006; 1088-1089.
Informatorium medicamentorum 2004; 635-637.
Hoogtanders, K. Heijden van der, J. Bepaling van immuno-suppressiva met behulp van LC-MS/MS. Extract; 2004:15(1); 12-13.

