

Article original

Mesurament simultani de la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang mitjançant cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem

Ariadna Arbiol Roca, José Manuel González de Aledo Castillo,
Raül Rigo Bonnín, Pedro Alía Ramos

Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat

1. Introducció

El mesurament de la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang és útil per a la monitorització farmacoterapèutica del tractament immunosupressor en pacients trasplantats. L'administració d'aquests fàrmacs planteja el problema de la seva variabilitat farmacocinètica intra i interindividual, la presència d'interval·ls terapèutics reduïts i el fet de poder presentar possibles efectes indesitjables. Per aquestes raons, és necessària una individualització de la seva dosi mitjançant el seguiment de les seves concentracions en la sang. Per altra banda, l'administració conjunta de ciclosporina A o tacrolimus (inhibidors de la calcineurina) amb

everolimus o sirolimus (inhibidors dels receptors de rapamicina en cèl·lules de mamífers o *mTOR*; acrònim de l'anglès *mammalian target of rapamycin*) exerceix un efecte immunosupressor sinèrgic (1–3) que ha demostrat ser beneficiós per aquests pacients (4, 5).

En l'actualitat, a més dels sistemes de mesura basats en principis d'immunoanàlisis, la concentració d'aquests quatre immunosupressors en la sang pot mesurar-se emprant sistemes que es basen en la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*) acoblada a l'espectrometria de masses o MS (acrònim de l'anglès *mass spectrometry*) o bé a

L'espectrometria de masses en tàndem o MS/MS (acrònim de l'anglès *tandem mass spectrometry*) (6–13).

Per altra banda, la cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UPLC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) és un nou principi de mesura basat en la cromatografia líquida o LC (acrònim de l'anglès *liquid chromatography*) que permet treballar amb columnes analítiques amb farcits de partícules inferiors a 2 µm. Aquest tipus de columnes, en presentar partícules d'una grandària menor que la de les utilitzades en columnes per a la cromatografia líquida convencional (≈ 3,5-5,0 µm), proporcionen una major resolució i eficàcia cromatogràfiques en un menor temps, permetent escurçar els temps de retenció. A més, aquesta menor grandària permet que es precisi una menor quantitat de mostra per obtenir una mateixa relació senyal/soroll, sent aquesta característica ideal si es pretén acoblar un cromatògraf líquid d'alta resolució a un espectròmetre de masses (14–16). D'altra banda, ja que en un sistema UPLC-MS/MS els temps de retenció per separar els components d'una mostra són més curts, l'efecte que exerceixen les interferències iòniques durant el procés d'ionització es redueix considerablement. Aquesta situació dona lloc a un efecte matriu menor, o fins i tot menyspreable (17, 18).

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar i validar un procediment de mesura basat en un sistema UPLC-MS/MS per al mesurament simultani de la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang.

2. Material i mètodes

2.1. Productes químics i reactius

L'acetat d'amoni i el sulfat de zinc, de pureses superiors al 98 %, s'obtenen de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya). L'acetonitril, l'aigua i el metanol de qualitat LC/MS són proporcionats per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya).

S'utilitzen set materials de calibratge de matriu sanguínia ClinChek® Whole Blood Calibrator Set de Recipe® (Munich, Alemanya) i tres materials de control de matriu sanguínia ClinChek® Whole Blood Control for Immunosuppressants de Recipe® (Taula 1).

Com a estàndards interns s'empren la [D₁₂]-Ciclosporina A per la ciclosporina A, el [¹³C₂D₄]-Everolimus per l'everolimus i el sirolimus (ClinMass® Internal Standard for Immunosuppressants de Recipe®) i l'ascomicina pel tacrolimus (ClinMass® Ascomycin Internal Standard de Recipe®).

Per optimitzar les condicions de l'espectròmetre de masses, s'empra una solució que conté una barreja de tots els immunosupressors a una concentració d'1 mg/L (ClinMass® Optimisation Mix 1 for Immunosuppressants) de Recipe®.

Els materials de control, els materials de calibratge, la solució de treball d'estàndards interns i la solució d'optimització de masses es preparen seguint les instruccions i recomanacions descrites pel proveïdor i fabricant dels mateixos.

2.2. Mostres de pacients

Les mostres de sang de pacients s'obtenen mitjançant punció venosa i es recullen en tubs amb EDTA-K₃ com anticoagulant (Vacuette, Kremsmünster, Àustria). Les mostres són emmagatzemades a (2-8) °C fins al seu processament durant un temps inferior a un dia.

Taula 1. Valors assignats dels materials de calibratge i control emprats en l'estudi.

Material	San—Ciclosporina A; c.massa (µg/L)	San—Everolimus; c.massa (µg/L)	San—Sirolimus; c.massa (µg/L)	San—Tacrolimus; c.massa (µg/L)
Calibrador 0	0,0	0,00	0,00	0,00
Calibrador 1	24,9	1,33	1,33	1,34
Calibrador 2	48,2	2,75	2,83	2,64
Calibrador 3	92,8	5,80	5,67	5,56
Calibrador 4	182,0	12,00	12,20	11,20
Calibrador 5	461,0	23,90	23,90	23,50
Calibrador 6	1264,0	47,40	46,90	46,70
Control 1	55,9	3,51	3,49	3,45
Control 2	113,0	11,00	11,20	7,010
Control 3	223,0	18,40	17,90	13,70

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

2.3. Preparació de les mostres

La preparació de les mostres consisteix en una precipitació de proteïnes amb una solució de sulfat de zinc i acetonitril. En un tub tipus Eppendorf, s'afegeixen 50 µL de cada calibrador, control o mostra i 200 µL d'una solució de sulfat de zinc 0,1 M. La mescla s'agita en un agitador tipus vòrtex durant 5 segons i, posteriorment, s'afegeixen 500 µL de la solució de treball en acetonitril d'estàndards interns. Després de l'agitació de la mescla resultant en un vòrtex durant 20 segons, els tubs se centrifuguen durant 2 minuts a 11000 g a temperatura ambient. A continuació, el sobrenedant es transfereix a uns vials cromatogràfics de vidre específics per al seu processament.

2.4. Sistema de mesura

S'empra un sistema ACQUITY® UPLC® acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol

ACQUITY® TQD®, ambdós de Waters Cromatografia (Milford, Estats Units).

2.5. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels components de la mostra es porta a terme a 55 °C utilitzant una columna analítica C₁₈ en fase inversa Nova-Pak® Cartridge 2,1 x 10 mm de Waters Cromatografia (Milford, Estats Units). Les mostres es mantenen a 15 °C a l'interior del mostrejador. La fase mòbil està composta per una solució d'acetat d'amoni 2 mM i àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en aigua (fase mòbil A) i per una solució d'acetat d'amoni 2 mM i àcid fòrmic 0,1 % (v/v) en metanol (fase mòbil B). El flux inicial aplicat és 0,4 mL/min, i posteriorment és modificat seguint un gradient d'elució no lineal (Taula 2). El volum d'injecció de la mostra és de 20 µL en un bucle de 50 µL treballant en la modalitat d'injecció parcial amb l'agulla sobreexida.

Taula 2. Gradient d'elució de la fase mòbil

Etapa	Temps total (min)	Fase mòbil A (%)	Fase mòbil B (%)	Flux (mL/min)
1	0,0	50	50	0,4
2	0,2	50	50	0,4
3	0,6	100	0	0,4
4	1,2	50	50	0,6

Fase mòbil A: 2 mM acetat d'amoni 2 mM en aigua + àcid fòrmic 0,1 % (v/v).

Fase mòbil B: 2 mM acetat d'amoni 2 mM en metanol + àcid fòrmic 0,1 % (v/v).

Taula 3. Configuració de les transicions m/z de l'espectròmetre de masses

Component	Ió precursor (m/z)	Ió producte (m/z)	Potencial de con (V)	Energia de col·lisió (eV)
Ciclosporina A	1220,2	1202,7	25	22
[D ₁₂]-ciclosporina A	1232,2	1214,7	25	22
Everolimus	975,9	908,4	25	18
Sirolimus	931,9	864,4	25	18
[¹³ C ₂ D ₄]-everolimus	981,9	914,4	25	18
Tacrolimus	821,7	768,3	31	20
Ascomicina	809,7	756,3	31	20

m/z , relació massa/càrrega

2.6. Condicions de l'espectròmetre de masses

S'utilitza la ionització mitjançant electrosprai en mode positiu (ESI+) i es treballa en la modalitat de monitorització múltiple de reacció o MRM (acrònim de l'anglès *multiple reaction monitoring*). Per a tots els immunosupressors, els ions precursors generats que donen un major senyal són els formats pels adductes immunosupressor-ió amoni $[M+NH_4]^+$. S'utilitza nitrogen com a gas de nebulització i de desolvatació.

A la Taula 3 es mostren, per a cada un dels immunosupressors i estàndards interns, les relacions de massa/càrrega optimitzades en l'espectròmetre de masses pels ions precursors i producte, els potencials de con aplicats a la font d'ionització per a la formació dels ions precursors i les energies de col·lisió proveïdes a la cel·la de col·lisió per a la generació dels ions producte seleccionats.

El temps d'integració o DT (acrònim de l'anglès *dwell time*) de cadascuna de les transicions MRM és 40 milisegons. El potencial de capil·laritat és 1,0 kV i les temperatures de la font d'ionització i de desolvatació són 120 °C i 350 °C, respectivament. El flux del gas de desolvatació és 800 L/h i no s'aplica flux en el con. Se seleccionen aquells ions producte que donen lloc a un major senyal, prèvia fragmentació dels ions precursors (adductes d'amoni) utilitzant argó com a gas de col·lisió a un flux de 0,25 mL/min i a una pressió de $3,5 \cdot 10^{-3}$ mbar.

Per a cada immunosupressor, el sistema de mesura s'optimitza mitjançant la infusió de la solució d'optimització de masses utilitzant les mateixes condicions cromatogràfiques i de l'espectròmetre de masses citades anteriorment.

2.7. Procediment de validació

El procediment de validació es duu a terme seguint els criteris, definicions, recomanacions i guies de l'Organització Internacional de Normalització (ISO), la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC), la Federació Internacional de Química Clínica i Ciències de Laboratori (IFCC), l'Agència Europea de Medicaments (EMA) i l'Institut per a la Normalització de Laboratoris Clínics (CLSI) (19-27).

Les propietats metrològiques estudiades són la imprecisió intraserial, la imprecisió interdiària, el biaix relatiu intraserial, el biaix relatiu interdiari, l'error de mesura relatiu, la capacitat de detecció (valor crític, límit de detecció i límit de quantificació), l'interval de mesura, la selectivitat, la contaminació per arrossegament o residualitat, la recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés.

2.7.1. Calibratge

Un cop al dia es processen els set materials de calibratge de matriu sanguínia que contenen els quatre immunosupressors en estudi.

La integració de les àrees sota la corba dels pics cromatogràfics suavitzats i el càlcul de la concentració dels immunosupressors es realitza utilitzant el programa informàtic TargetLynx[®] versió 4.1 de Waters. Les corbes de calibratge s'obtenen mitjançant un ajust lineal per ponderació $1/X$, exclouent l'opció de forçar la intersecció de la recta per l'ordenada en l'origen, després de representar gràficament, per a cada un dels calibradors, el quocient $(A_{\text{INMU}} / A_{\text{IS}}) \cdot C_{\text{IS}}$ (eix d'ordenades; Y) enfront de la concentració de l'immunosupressor (eix d'abscisses; X); sent A_{INMU} l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de l'immunosupressor; A_{IS} , l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de l'estàndard intern corresponent; i C_{IS} , la concentració de l'estàndard intern.

Seguint els criteris de l'EMA (25), per als materials de calibratge, les diferències relatives entre les concentracions dels immunosupressors calculades i teòriques no han de ser superiors a $\pm 15\%$ i a $\pm 20\%$, a concentracions properes al límit de quantificació.

2.7.2. Estudi de la imprecisió i biaix intraserials emprant materials de control

Es processen 16 vegades, en una única sèrie i en un mateix dia, els tres materials de control de matriu sanguínia que contenen els quatre immunosupressors. Es calcula la imprecisió intraserial mitjançant la fórmula:

$$CV_{\text{INTRA}} (\%) = \frac{S_{\text{INTRA}}}{X_{\text{INTRA}}} \cdot 100$$

on CV_{INTRA} , s_{INTRA} i \bar{x}_{INTRA} són el coeficient de variació intraserial, la desviació estàndard intraserial i la mitjana aritmètica intraserial, respectivament.

Es calcula el biaix intraserial ($\delta_{\text{rel.INTRA}}$) relatiu utilitzant l'equació:

$$\delta_{\text{rel.INTRA}} (\%) = \frac{(\bar{x}_{\text{INTRA}} - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on μ és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control per un procediment i sistema de mesura de referència (LC-MS/MS).

Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors del CV_{INTRA} i $\delta_{\text{rel.INTRA}}$ han de ser inferiors o iguals al 15 % i inferiors o iguals al 20 % a concentracions properes al límit de quantificació.

2.7.3. Estudi de la imprecisió i biaix intraserials emprant mostres de pacients

Es realitzen dues barreges de mostres de sangs de pacients amb concentracions similars a dos dels materials de control. Les barreges són homogeneïtzades, aliquidades i emmagatzemades a -30 °C fins al moment del seu processament.

Cada una de les barreges de sangs de pacients es processen 15 vegades, en una única sèrie i en un mateix dia, prèvia descongelació i estabilització a temperatura ambient de les mateixes. Posteriorment, es calcula la imprecisió intraserial de la mateixa manera que a l'apartat 2.7.2.

Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors de CV_{INTRA} i $\delta_{\text{rel.INTRA}}$ han de ser inferiors o iguals al 15 % i inferiors o iguals al 20 % a concentracions properes al límit de quantificació.

2.7.4. Estudi de la imprecisió i biaix interdiaris emprant materials de control

Es processen 22 vegades, en 22 dies repartits en dos mesos, els tres materials de control de matriu sanguínia que contenen els quatre immunosupressors.

Es calculen la mitjana (\bar{x}_{INTER}), la desviació estàndard (s_{INTER}) i el coeficient de variació (CV_{INTER}) per cadascun dels materials de control mitjançant l'equació:

$$CV_{\text{INTER}} (\%) = \frac{s_{\text{INTER}}}{\bar{x}_{\text{INTER}}} \cdot 100$$

Es calcula el biaix interdiari ($\delta_{\text{rel.INTER}}$) relatiu emprant l'equació:

$$\delta_{\text{rel.INTER}} (\%) = \frac{(\bar{x}_{\text{INTER}} - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on μ és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control per un procediment i sistema de mesura de referència (LC-MS/MS).

Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors de CV_{INTER} i $\delta_{\text{rel.INTER}}$ han de ser inferiors o iguals al 15 % i inferiors o iguals al 20 % a concentracions properes al límit de quantificació.

2.7.5. Estudi de la imprecisió i biaix interdiaris emprant mostres de pacients

Es realitzen dues barreges de mostres de sang de pacients amb concentracions similars a dos dels materials de control. Les barreges són homogeneïtzades, aliquidades i emmagatzemades a -30 °C fins al moment del seu processament.

Cada una de les barreges de sangs de pacients es processen 13 vegades, en 13 dies repartits en un mes, en una única sèrie diària. Es calcula la imprecisió interdiària de la mateixa manera que a l'apartat 2.7.4.

Seguint els criteris de l'EMA (25), els valors de CV_{INTER} i $\delta_{\text{rel.INTER}}$ han de ser inferiors o iguals al 15

% i inferiors o iguals al 20 % a concentracions properes al límit de quantificació.

2.7.6. Estudi d'intercanviabilitat de les imprecisions emprant materials de control i mostres de pacients

Es porta a terme un estudi d'intercanviabilitat de les imprecisions emprant materials de control i mostres de pacients, mitjançant la prova paramètrica d'homogeneïtat de variàncies de F de Snedecor amb un nivell de significació estadística de 0,05 (28), utilitzant el programa estadístic Analyse-it® Method Evaluation Edition versió 2.14 de Analyse-it Software Ltd. (Leeds, Regne Unit).

Es considera que existeix intercanviabilitat entre els diferents valors d'imprecisió quan no existeixen diferències estadísticament significatives ($P > 0,05$) entre les variàncies obtingudes emprant materials de control i barreges de sang.

2.7.7. Estudi de l'error de mesura

Per a cada immunosupressor, s'estima l'error de mesura utilitzant tres materials de control de matriu sanguínia que pertanyen al programa d'avaluació externa de la qualitat International Proficiency Testing Scheme (IPTS) de l'empresa United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK-NEQAS).

Els materials de control es processen, aleatòriament i en dies diferents. Es calcula l'error de mesura relatiu (e_{rel}) mitjançant l'equació (27):

$$e_{m,rel} = \frac{(x - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on x és el valor mesurat obtingut i μ , el valor convencional. Com a valors de μ s'utilitzen, per ordre de preferència:

- el valor assignat mitjançant un procediment i sistema de mesura primari (pesada), o
- en el seu defecte, la mitjana dels valors mesurats en el material de control pels laboratoris participants en el programa d'avaluació externa de la qualitat que utilitzen un procediment i sistema de mesura de referència (HPLC/MS o HPLC-MS/MS).

Seguint els criteris establerts al nostre laboratori (requisits metrològics per a l'error de mesura relatiu), els valors d' e_{rel} han de ser inferiors o iguals a ± 30 %.

2.7.8. Estudi de la capacitat de detecció

Per a l'estudi de la capacitat de detecció es calcula el valor crític, el límit de detecció i el límit de quantificació (19, 20). Es realitza una barreja de mostres de pacients que no han ingerit els corresponents immunosupressors en estudi (material de blanc). La barreja és homogeneïtzada, aliquidada i emmagatzemada a -30 °C fins al moment del seu processament. Aquesta barreja es processa 15 vegades, en 15 dies repartits en un mes.

Es calculen el valor crític (L_C) i el límit de detecció (L_D) com segueix:

$$L_C = t_{1-\alpha, r} \cdot s_0 \quad ; \quad L_C = 1,761 \cdot s_0$$

$$L_D = 2 \cdot t_{1-\alpha, r} \cdot s_0 \quad ; \quad L_D = 3,522 \cdot s_0$$

on $t_{1-\alpha, r}$ és l'àrea $(1-\alpha)$ d'una distribució de t-Student (al nostre cas $1-\alpha = 0,95$, $r = 14$ i l'àrea = 1,761) i s_0 , és la desviació estàndard del sistema de mesura obtinguda en la barreja del material de blanc.

Per altra banda, es calcula el límit de quantificació (L_Q) com:

$$L_Q = \frac{s_0}{y} \cdot 100$$

on y és el valor, en percentatge, d'imprecisió interdiària considerada com a acceptable.

Seguint les recomanacions de l'EMA (25), aquest valor de y és 20 %.

Les guies CLSI C50-A (24) i de l'EMA (25) defineixen també el límit de quantificació (L_Q), com la concentració més baixa a la qual la relació senyal/soroll és superior o igual a 10 i que presenta un valor d'imprecisió interdiària inferior o igual al 20 %. Per dur a terme aquest estudi, es realitzen barreges de mostres de sang de pacients amb concentracions properes als límits de quantificació de cada un dels immunosupressors. Les barreges són homogeneïtzades, aliquotades i emmagatzemades a -30 °C fins al moment del seu processament. Cada una de les barreges es processa 13 vegades, en 13 dies repartits en un mes i en una única sèrie diària. Es calculen les relacions senyal/soroll de cada una de les barreges i la imprecisió interdiària de la mateixa manera que a l'apartat 2.7.4.

2.7.9. Estudi de l'interval de mesura (linealitat)

Seguint les guies de l'EMA (25) i CLSI EP6-A (26), per a l'estudi de l'interval de mesura, es realitzen tres dilucions seriades (proporcions 3:1; 2:2 i 2:3) a partir del material de calibratge que presenta una major concentració (calibrador 6), emprant com a diluent el material de calibratge que no conté cap dels immunosupressors en estudi (calibrador 0).

Es processen, aleatòriament, per quadruplicat i en un únic dia, les tres solucions així com els calibradors 0 i 6 (proporcions 4:0 i 0:4, respectivament). Seguint els criteris de l'EMA (25) es comprova que, per a cada una de les solucions i per als calibradors 0 i 6, els valors de les imprecisions i biaixos obtinguts són inferiors o iguals a 15 %.

Posteriorment, es representen gràficament els valors mesurats obtinguts de les diferents dissolucions i calibradors (eix Y) enfront als valors teòrics esperats (eix X) i es duu a terme un ajust mitjançant una regressió lineal de mínims quadrats ponderats. Es considera que els intervals de mesura són lineals si els coeficients de determinació (r^2) són superiors a 0,99 (22, 23).

2.7.10. Estudi de la selectivitat

Per a l'estudi de la selectivitat es processen, en diferents dies, 10 mostres de pacients que no han ingerit cap dels immunosupressors en estudi però sí algun dels fàrmacs següents: amikacina, carbamazepina, digoxina, fenitoïna, fenobarbital, gentamicina, metotrexat, micofenolat, valproat o vancomicina. Es comprova que els cromatogrames corresponents a aquestes mostres no presenten cap pic cromatogràfic ni senyal analític superior al dels respectius límits de quantificació dels immunosupressors en estudi (24, 25).

2.7.11. Estudi de la contaminació per arrossegament o residualitat

Per a l'estudi de la contaminació per arrossegament o residualitat es processa, en una mateixa sèrie i en un únic dia, el calibrador 0 (L) i el calibrador 6 (H) seguint l'ordre següent: H1, H2, H3, L1, L2 i L3.

Es calcula la contaminació per arrossegament o residualitat mitjançant l'equació següent:

$$\text{Arrossegament (\%)} = \frac{(L_1 - L_3)}{(H_3 - L_1)} \cdot 100$$

Es considera que no existeix contaminació per arrossegament o residualitat si el valor obtingut és inferior o igual a 5 % (23, 24).

2.7.12. Estudi de la recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés

L'eficiència del procés depèn de la pèrdua dels components en estudi durant el procés d'extracció de la mostra (recuperació) i l'efecte en el senyal analític que poden produir diferents substàncies al coeluir amb els components en estudi en el procés d'ionització de la mostra (efecte matriu).

Aquest estudi es realitza seguint els criteris de la guia CLSI C50-A (24) i de Matuszewski *et al.* (30) a una concentració de 4,0, 10,0 i 20,0 µg/L per a l'ascomicina, el [¹³C₂D₄]-everolimus, l'everolimus, el sirolimus i el tacrolimus, i de 100, 400 i 800 µg/L per a la [D₁₂]-ciclosporina A i la ciclosporina A. S'empren tres tipus de mostres: solucions primàries d'ascomicina, [¹³C₂D₄]-everolimus, everolimus, sirolimus, tacrolimus, [D₁₂]-ciclosporina A i ciclosporina A diluïdes en la fase mòbil (Mostres A); vuit mostres de sang de pacients que no contenen cap dels immunosupressors en estudi i a les que se'ls afegeix aquests components després del procés d'extracció (Mostres B); i les mateixes 8 mostres a les quals se'ls afegeixen els immunosupressors abans del procés d'extracció (Mostres C). Emprant les àrees dels pics cromatogràfics obtinguts després de processar totes aquestes mostres, la recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés es calculen com:

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{\text{Mitjana Àrees Mostre C}}{\text{Mitjana Àrees Mostres B}} \cdot 100$$

$$\text{Efecte matriu (\%)} = \frac{\text{Mitjana Àrees Mostres B}}{\text{Mitjana Àrees Mostres A}} \cdot 100$$

$$\text{Eficiència del procés (\%)} = \frac{\text{Mitjana Àrees Mostres C}}{\text{Mitjana Àrees Mostres A}} \cdot 100$$

Per altra banda, es calcula el coeficient de variació obtingut després de processar les mostres C per tal d'estimar la variabilitat entre les diferents mostres de

sang utilitzades. Els valors dels coeficients de variació han de ser inferiors al 15 % en tots els casos, tal i com indica l'EMA (25).

2.7.13. Estudi de l'estabilitat

S'estudia l'estabilitat per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang a (2-8) °C durant 15 dies. Per a cada magnitud farmacològica, s'empren 15 mostres de sang de pacients trasplantats que contenen un o més dels immunosupressors en estudi i amb valors compresos en els corresponents intervals terapèutics. Cada mostra es processa dues vegades, a l'inici de l'estudi i al final del període d'emmagatzematge, conservant-se entre les diferents anàlisis en tubs amb EDTA-K₃, tapats i preservats de la llum a (2-8) °C.

Per avaluar l'estabilitat de les diverses magnituds, es calcula la desviació percentual (PD) respecte al valor inicial mitjançant la següent equació (31, 32):

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y_i}{X_i} \right)$$

on X_i és el valor mesurat en el moment inicial, Y_i el valor mesurat en el moment final i n és el nombre de mostres processades. Es considera que la magnitud és estable quan el valor de la PD està comprès entre ± 2·CV, sent CV la imprecisió interdiària del sistema de mesura utilitzant una barreja de mostres de pacients amb concentracions similars a les del material de control 1.

3. Resultats

Per a cada un dels immunosupressors, les condicions de l'espectròmetre de masses són optimitzades per afavorir les transicions iòniques que presenten una major capacitat de detecció (Taula 3).

En les condicions cromatogràfiques descrites en aquest estudi (Taula 2), el temps de retenció per al tacrolimus i l'ascomicina és 0,94 minuts, 0,96 minuts per l'everolimus, el sirolimus i el [¹³C₂D₄]-everolimus i 1,02 minuts per a la ciclosporina A i la [D₁₂]-ciclosporina A.

El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives) és 2,5 minuts. El temps de processament per a 50 mostres, incloent el temps necessari per a la seva preparació, és 2,5 hores.

Els valors d'imprecisió intraserial, imprecisió interdiària i biaix relatiu es mostren a la Taula 4. El sistema de mesura avaluat presenta imprecisions i biaixos relatius inferiors als requisits establerts per l'EMA (15 %). Per altra banda, s'observen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les variàncies intraserials obtingudes utilitzant materials de control i barreges de sangs de pacients per a la concentració de ciclosporina A i everolimus en la sang (Taula 5). Pel que fa a les variàncies interdiàries, existeixen diferències per a la concentració de sirolimus i de tacrolimus en la sang (Taula 6).

Els errors de mesura obtinguts poden visualitzar-se en la Taula 7 observant-se que, en cap cas, se superen els requisits metrològics establerts al nostre laboratori (30 %).

Els valors crítics, els límits de detecció i els límits de quantificació són, respectivament, 5,4, 10,8 i 15,3 µg/L per a la concentració de ciclosporina A; 0,5, 1,0 i 1,4 µg/L per a la concentració d'everolimus; 0,6, 1,1 i 1,6 µg/L per a la concentració de sirolimus i 0,2, 0,4 i 0,6 µg/L per a la concentració de tacrolimus.

Els valors de les relacions senyal/soroll i d'imprecisió interdiària obtinguts a concentracions properes als límits de quantificació es mostren a la Taula 8.

Els intervals de mesura són lineals entre (15,3–1563) µg/L per a la concentració de ciclosporina A ($r^2=0,997$), (1,4–44,7) µg/L per a la concentració d'everolimus ($r^2=0,998$), (1,6–44,7) µg/L per a la concentració de sirolimus ($r^2=0,999$), i entre (0,6–44,7) µg/L per a la concentració de tacrolimus ($r^2=0,998$).

Cap cromatograma (Figura 1) presenta pics cromatogràfics interferents ni senyals analítics superiors als del límit de quantificació, fet que confirma la selectivitat i especificitat del sistema de mesura avaluat. D'altra banda, el percentatge d'arrossegament de cada un dels immunosupressors és inferior al 5 % i per tant, es pot considerar que no existeix contaminació per arrossegament o residualitat.

Els valors de recuperació i eficiència del procés estan compresos entre (63,1–107,7) % i (65,5–114,1) %, respectivament (Taula 9). Pel que fa a l'efecte matriu, es pot observar una sobreexpressió iònica per a la ciclosporina A, la [D₁₂]-ciclosporina A i el sirolimus i una supressió iònica en el cas de l'ascomicina, l'everolimus, el [¹³C₂D₄]-everolimus i el tacrolimus.

Les concentracions de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang són estables 15 dies a (2–8) °C (Taula 10).

Taula 4. Imprecisions i biaixos intraserials i interdiaris emprant materials de control per al sistema de mesura *Acquity UPLC®-TQD®* per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang.

Magnitud	Biaix relatiu intraserial						Imprecisió intraserial					
	\bar{x}_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTRA}	μ ($\mu\text{g/L}$)	δ_{INTRA} (%)	s_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTRA} (%)	\bar{x}_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTER}	μ ($\mu\text{g/L}$)	δ_{INTER} (%)	s_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTER} (%)
San—Ciclosporina A; c.massa	54,8	16	55,9	-2,0	1,63	3,0	58,2	22	55,9	4,1	4,75	8,2
	109,2	16	113,0	-3,4	2,47	2,3	116,2	22	113,0	2,8	9,97	8,6
	219,8	16	223,0	-1,6	3,83	1,7	224,1	22	223,0	0,5	18,88	8,4
San—Everolimus; c.massa	3,6	16	3,5	2,6	0,20	5,6	3,9	21	3,5	10,8	0,40	10,3
	11,4	16	11,0	3,2	0,49	4,3	11,8	21	11,0	6,9	0,82	7,0
	18,5	16	18,4	0,3	0,88	4,8	18,6	22	18,4	0,8	1,28	6,9
San—Sirolimus; c.massa	3,7	16	3,5	5,8	0,28	7,5	3,8	21	3,5	8,4	0,43	11,3
	10,6	16	11,2	-5,1	0,41	3,8	11,4	21	11,2	1,7	1,05	9,2
	16,9	16	17,9	-5,6	0,68	4,0	18,3	21	17,9	2,4	1,61	8,8
San—Tacrolimus; c.massa	3,6	16	3,5	3,4	0,19	5,2	3,6	22	3,5	3,2	0,13	3,8
	7,3	16	7,0	4,1	0,16	2,2	7,5	21	7,0	6,3	0,38	5,1
	14,8	16	13,7	7,8	0,43	2,9	14,7	22	13,7	6,9	0,69	4,7

\bar{x}_{INTRA} , mitjana intraserial; n_{INTRA} , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie; μ , valor convencional (assignat pel fabricant del material de control per un sistema de esura de referència (LC-MS/MS); δ_{INTRA} , biaix relatiu intraserial; s_{INTRA} , desviació estàndard intraserial; CV_{INTRA} , coeficient de variació intraserial; \bar{x}_{INTER} , mitjana interdiària; n_{INTER} , nombre de materials de control processats en dies diferents; δ_{INTER} , biaix relatiu interdiari; s_{INTER} , desviació estàndard interdiària; CV_{INTER} , coeficient de variació interdiari.

Taula 5. Intercanviabilitat entre els valors d'imprecisió intraserial utilitzant materials de control i barreges de sangs de pacients.

Magnitud			Imprecisió intraserial emprant materials de control				Imprecisió intraserial emprant mostres de pacients		P ($\alpha=0,05$)
	\bar{x}_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTRA}	s_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTRA} (%)	\bar{x}_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTRA}	s_{INTRA} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTRA} (%)	
	54,8	16	1,63	3,0	75,4	15	2,79	3,7	0,0236
San—Ciclosporina A; c.massa	219,8	16	3,83	1,7	283,7	15	11,86	4,2	<0,0001
	3,6	16	0,20	5,6	2,5	13	0,14	5,5	<0,0001
San—Everolimus; c.massa	11,4	16	0,49	4,3	15,3	15	0,83	5,4	0,0280
	3,7	16	0,28	7,5	4,9	15	0,35	7,1	0,1875
San—Sirolimus; c.massa	10,6	16	0,41	3,8	5,7	15	0,32	5,7	0,1985
	3,6	16	0,19	5,2	4,8	15	0,20	4,2	0,3822
San—Tacrolimus; c.massa	7,3	16	0,16	2,2	5,9	15	0,25	4,3	0,0505

Taula 6. Intercanviabilitat entre els valors d'imprecisió interdiària utilitzant materials de control i barreges de sangs de pacients.

Magnitud			Imprecisió interdiària emprant materials de control				Imprecisió interdiària emprant mostres de pacients		P ($\alpha=0,05$)
	\bar{x}_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTER}	s_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTER} (%)	\bar{x}_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	n_{INTER}	s_{INTER} ($\mu\text{g/L}$)	CV_{INTER} (%)	
	58,2	22	4,75	8,2	63,1	13	4,35	6,9	0,3863
San—Ciclosporina A; c.massa	224,1	22	18,88	8,4	248,6	11	15,27	6,1	0,2471
	3,9	21	0,40	10,3	2,8	13	0,30	10,5	0,1450
San—Everolimus; c.massa	11,8	21	0,82	7,0	13,9	11	1,44	8,5	0,0960
	3,8	21	0,43	11,3	4,9	13	0,50	10,1	0,2701
San—Sirolimus; c.massa	11,4	21	1,05	9,2	5,9	13	0,55	9,1	0,0125
	3,6	22	0,13	3,8	3,5	13	0,22	6,1	0,0281
San—Tacrolimus; c.massa	7,5	21	0,38	5,1	6,1	11	0,45	7,5	0,2344

\bar{x}_{INTRA} , mitjana intradiària; n_{INTRA} , nombre de materials de control processats en un mateix dia; s_{INTRA} , desviació estàndard intradiària; CV_{INTRA} , coeficient de variació intradiària; \bar{x}_{INTER} , mitjana interdiària; n_{INTER} , nombre de materials de control processats en dies diferents; s_{INTER} , desviació estàndard interdiària; CV_{INTER} , coeficient de variació interdiària; P ($\alpha=0,05$), probabilitat obtinguda en la prova paramètrica d'homogeneïtat de variàncies de F de Snedecor.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

Taula 7. Errors de mesura relatius per al sistema de mesura *Acquity UPLC®-TQD®* per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus y tacrolimus en la sang del programa d'avaluació externa de la qualitat IPTS d'UK-NEQAS.

Magnitud	Cicle de control / Mostra	x (µg/L)	µ (N) (µg/L)	e _{m rel.} (%)
San—Ciclosporina A; c.massa	335/A	264,5	250,0	5,8
	335/B	538,7	500,0	7,7
	335/C	57,9	50,0	15,8
San—Everolimus ; c.massa	66/A	8,2	7,0	17,1
	66/B	2,7	2,3 (115)	17,4
	66/C	9,4	8,0	17,5
San—Sirolimus; c.massa	157/A	20,3	20,0	1,5
	157/B	5,1	5,0	2,0
	157/C	8,7	9,1	-4,4
San—Tacrolimus; c.massa	201/A	21,0	20,0	5,0
	201/B	15,9	15,0	6,0
	201/C	8,9	8,5	4,7

x, valor mesurat de control; µ, valor convencional: l'assignat mitjançant un procediment i sistema de mesura primari (pesada) o, en el seu defecte, la mitjana dels valors mesurats en el material de control pels laboratoris participants en el programa d'avaluació externa de la qualitat que utilitzen un sistema de mesura de referència (HPLC-MS/MS, HPLC-MS o HPLC-UV); N, nombre de valors mesurats que corresponen als laboratoris participants en el programa; e_{m rel.}, error de mesura relatiu.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

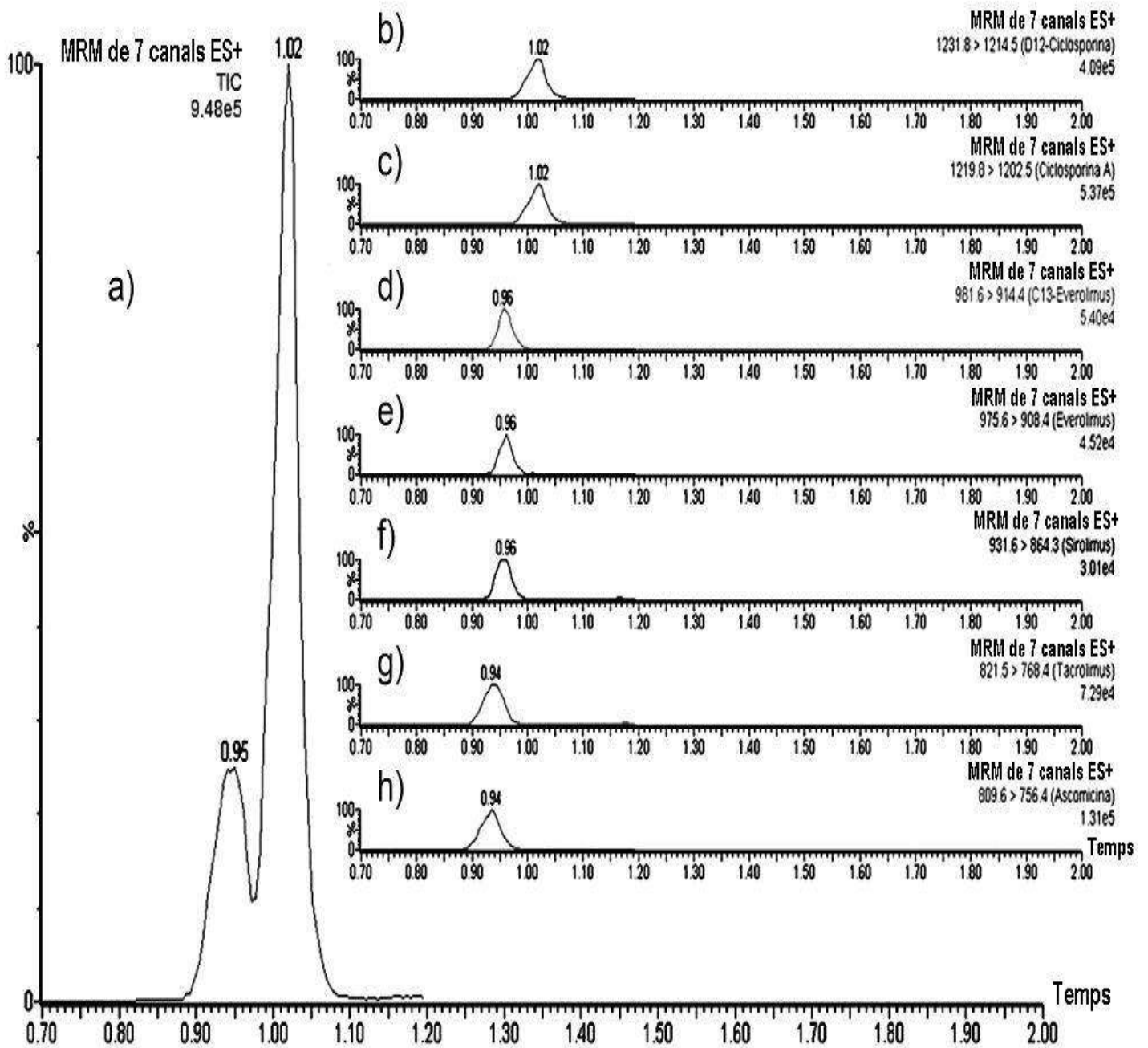
Taula 8. Estudi de la imprecisió interdiària a valors propers al límit de quantificació per al sistema de mesura *Acquity UPLC®-TQD®* per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang.

Magnitud	n	Senyal blanc	Senyal	Relació S/N	L _Q (µg/L)	s _Q (µg/L)	CV _Q (%)
San—Ciclosporina A; c.massa	13	0,083	1,337	16,2	16,0	2,73	17,1
San—Everolimus; c.massa	12	0,009	0,121	13,9	1,3	0,27	20,7
San—Sirolimus; c.massa	12	0,049	0,566	11,7	1,7	0,33	19,3
San—Tacrolimus; c.massa	13	0,004	0,061	15,7	0,3	0,06	19,5

n, nombre de barreges de mostres processades en dies diferents; Relació S/N, relació senyal-soroll; L_Q, mitjanes obtingudes a valors propers al límit de quantificació; s_Q, desviacions estàndard interdiàries obtingudes a valors propers al límit de quantificació; CV_Q, coeficients de variació interdiàries obtinguts a valors propers al límit de quantificació.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

Figura 1. Cromatogrames obtinguts després de processar el material de control 1 per: a) tots els immunosupressors i estàndards interns, b) $[D_{12}]$ -ciclosporina A, c) ciclosporina A, d) $[^{13}C_2D_4]$ -everolimus, e) everolimus, f) sirolimus, g) tacrolimus i h) ascomicina.



MRM, monitorització múltiple de reacció.

Taula 9. Recuperació, efecte matriu, eficiència del procés i variabilitat intermostral per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus i els seus respectius estàndards interns.

Magnitud	Concentració (µg/L)	Recuperació (%)	Efecte matriu (%)	Eficiència del procés (%)	Variabilitat intermostral (%)
San—Ciclosporina A; c.massa	100	73,2	113,8	83,3	9,0
	400	63,1	105,4	66,5	7,0
	800	78,2	122,7	95,9	6,7
San—[D ₁₂]-Ciclosporina A; c.massa [IS]	100	74,8	114,7	85,9	6,2
	400	81,1	110,5	89,6	7,1
	800	92,3	111,6	103,0	7,6
San—Everolimus; c.massa	4,0	91,7	87,1	79,9	11,0
	10,0	104,4	88,4	92,4	7,3
	20,0	105,0	97,5	102,4	5,8
San—Sirolimus; c.massa	4,0	77,3	105,0	81,2	10,7
	10,0	104,6	106,3	111,2	7,8
	20,0	107,7	105,9	114,1	6,4
San—[¹³ C ₂ D ₄]-Everolimus; c.massa [IS]	4,0	88,4	99,7	88,2	11,0
	10,0	86,6	99,7	86,4	9,4
	20,0	97,5	99,0	96,5	6,7
San—Ascomicina; c.massa (IS)	4,0	74,5	91,0	68,1	7,9
	10,0	95,8	81,5	78,1	5,6
	20,0	98,2	91,6	89,9	4,4
San—Tacrolimus; c.massa	4,0	72,8	90,0	65,5	5,5
	10,0	98,2	79,5	78,1	7,6
	20,0	99,3	92,2	91,6	4,7

IS, estàndard intern.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

Taula 10. Estudi de l'estabilitat per a la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang.

Magnitud	PD % a (2-8) °C	Interval d' estabilitat (%)
San—Ciclosporina A; c.massa	-3,7	± 13,8
San—Everolimus; c.massa	-5,4	± 21,0
San—Sirolimus; c.massa	-16,9	± 20,2
San—Tacrolimus; c.massa	3,0	± 6,1

PD, desviació percentual.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (29): c.massa, concentració de massa; San, Sang.

4. Discussió i conclusions

Des de fa diversos anys, la indústria farmacèutica empra la HPLC-MS o la HPLC-MS/MS per investigar i desenvolupar noves biomolècules. Per contra, en el camp de les ciències de laboratori clínic, la seva incorporació i utilització ha sigut tardana, fet que, amb tota seguretat, canviarà en els propers anys. Dins del treball quotidià dels laboratoris clínics, una de les aplicacions més importants i recents que presenten els sistemes de mesura basats en aquests principis és la mesura, simultània o no, de la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang.

En la majoria de laboratoris clínics aquestes magnituds farmacològiques es mesuren mitjançant sistemes basats en principis d'immunoanàlisis tot i sabent que presenten una sèrie de limitacions àmpliament conegudes (interferències relacionades amb el traçador i els anticossos, interferències analítiques, existència de reactivitat creuada deguda a

© Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

la manca d'especificitat de l'anticòs, entre d'altres). Les millores metrològiques que comporta la utilització de sistemes basats en la HPLC-MS o la HPLC-MS/MS respecte als que empen les immunoanàlisis com a principi de mesura, i la importància que suposen aquestes millores en la monitorització farmacoterapèutica del tractament immunosupressor en pacients trasplantats, ens van conduir a validar un sistema de mesura (Acquity UPLC®-TQD®) que empra la UPLC-MS/MS per a la mesura simultània de la concentració d'aquestes fàrmacs.

L'estudi realitzat consta d'una primera part de tractament previ de la mostra mitjançant una precipitació de proteïnes, un procediment de fàcil aplicació que ha mostrat ser fiable i reproduïble en el nostre cas. La utilització de dos tampons compostos per acetat d'amoni 2 mM i àcid fòrmic 0,1 % (v/v), un en aigua i un altre en metanol, afavoreix la producció de les formes iòniques dels adductes immunosupressors-ió amoni (M+NH₄)⁺ i en menor

<http://www.acclc.cat/continguts/ivv156.pdf>

proporció dels adductes immunosupressors-ió hidrogen $(M+H)^+$ en una font d'ionització mitjançant electrosprai. Les condicions emprades amb l'espectròmetre de masses afavoreixen les transicions iòniques dels diferents immunosupressors aconseguint una major capacitat de detecció.

En referència a l'estudi de les propietats metroloègiques, el sistema de mesura presenta amplis intervals de linealitat així com imprecisions, biaixos, errors de mesura, límits de detecció i límits de quantificació acceptables per al nostre laboratori. Els valors d'imprecisió obtinguts emprant materials de control i mostres de pacients no són intercanviables per alguna de les magnituds en estudi. Aquest fet s'ha de tenir en compte per a l'estimació de la incertesa d'un resultat de mesura i quan es vol interpretar la significació d'un canvi entre dos resultats de mesura, obtinguts en dies diferents, d'una mateixa magnitud biològica (33).

L'absència de pics cromatogràfics, exceptuant els dels immunosupressors, mostra que no hi ha interferències amb altres fàrmacs, el que reflecteix l'elevada selectivitat i especificitat del sistema de mesura estudiat. En l'estudi de l'efecte matriu es mostra que hi ha interferències amb components de la pròpia matriu biològica (sobre-expressió i supressió iònica) sent aquestes acceptables i compensades amb la utilització dels estàndards interns.

En conclusió, el sistema de mesura Acquity UPLC®-TQD® permet mesurar simultàniament la concentració de ciclosporina A, everolimus, sirolimus i tacrolimus en la sang amb una preparació mínima de la mostra i utilitzant volums reduïts de mostra. Aquest sistema de mesura és la millor alternativa als sistemes basats en mètodes

d'immunoanàlisi, i s'adapta bé a la pràctica hospitalària diària per a la monitorització farmacoterapèutica dels diferents immunosupressors tenint en compte el seu temps d'anàlisi, la seva versatilitat, la seva flexibilitat i les seves propietats metroloègiques.

5. Bibliografia

- Stepkowski SM, Tian L, Napoli KL, Ghobrial R, Wang ME, Chou TC, *et al.* Synergistic mechanisms by which sirolimus and cyclosporin inhibit rat heart and kidney allograft rejection. *Clin Exp Immunol* 1997;108:63-8.
- Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrani R, *et al.* SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997;64:32-5.
- Vu DM, Qi S, Xu D, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, *et al.* Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997;64:1853-6.
- Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in Caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial, Rapamune Study Group. *Transplantation* 1999;68:1526-32.
- McAlister VC, Gao ZH, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet* 2000;355:376-7.
- Deters M, Kirchner G, Resch K. Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med* 2002;40:285-92.
- Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporine A in whole blood. *Clin Chem* 2002;48:955-8.
- Annesley TM, Clayton L. Simple extraction protocol for analysis of immunosuppressant drugs in whole blood. *Clin Chem* 2004;50:1845-8.

9. Ceglarek U, Lembcke J, Fiedler GM, Werner M, Witzigmann H, Hauss JP, *et al.* Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2004;346:181-90.
10. Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Simultaneous quantification of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Biochem* 2008;41:728-35.
11. Koster RA, Dijkers ELF, Uges DRA. Robust, high-throughput LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus in whole blood. *Ther Drug Monit* 2009;31:116-25.
12. Seger C, Tentschert K, Stoggl W. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc* 2009;4:526-34.
13. Meinitzer A, Gartner G, Pilz S, Stettin M. Ultra fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in whole blood using deuterated internal standards for cyclosporine A and everolimus. *Ther Drug Monit* 2010;32:61-6.
14. Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B* 2005;825:134-43.
15. Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of Application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006;68:908-18.
16. Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ. Comparison of ultraperformance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006;1103:94-101.
17. Van De Steene JC, Lambert WE. Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:713-8.
18. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B* 2007;852:22-34.
19. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem* 1995;67:1699-723.
20. International Organization for Standardization, Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. ISO-11843-1. Geneva, 1997.
21. International Bureau of Weights and Measures, International Electrotechnical Commission, International Laboratory Accreditation Cooperation, International Organization for Standardization, International Organization of Legal Metrology, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Pure and Applied Physics, International vocabulary of metrology. Basic and general concepts and associated terms (VIM). ISO/IEC Guide 99. Geneva, 2008.
22. International Organization for Standardization, International Union of Pure and Applied Chemistry, Association of Analytical Communities, International Symposium on the Harmonisation of Quality Assurance Systems in Chemical Laboratory. Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis, Budapest, 2005. Disponible en: <http://old.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>. (accés: 2013-04-21).
23. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem* 2002;74:835-55.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Mass spectrometry in the clinical laboratory: General principles and guidance. C50-A. Wayne, 2007.
25. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation; London, 2011:<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf> (accés: 2013-04-21).
26. Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. NCLS document EP6-A. Wayne, 2003.
27. International Union of Pure and Applied Chemistry, The international harmonized protocol for proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem* 2006;78:145-96.

28. Fuentes-Arderiu X, González-de-la-Presa B. Interchangeability of estimates of day-to-day imprecision between commercial control materials and serum pools. *Clin Chem* 2002;48:573-4.
29. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Properties and units in the clinical laboratory sciences. Part X. Properties and units in general clinical chemistry. *Pure Appl Chem* 2000;72:747-972.
30. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:3019-30.
31. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Definición del límite de estabilidad de las magnitudes en las muestras biológicas. *Quim Clin* 2006;25:81-5.
32. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Protocolo para el estudio de la estabilidad de las magnitudes biológicas. *Quim Clin* 2006;25:86-9.
33. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* 1983;29:25-30.