

## Article original

# Mesurament de la concentració de micofenolat en el plasma mitjançant cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat

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 micofenolat mofetil (MMF; nom comercial CellCept®, Myfortic®) és un èster del micofenolat, el qual és produït per espècies de fongs del gènere *Penicillium*. En el fetge el MMF és convertit per hidròlisi al seu metabòlit actiu, l'acid micofenòlic (MPA), el qual inhibeix de manera reversible i no competitiva l'activitat de l'enzim inosina 5'-monofosfat deshidrogenasa (IMPDH; EC 1.1.1.205) durant la síntesi de DNA en la fase S del cicle cel·lular. Aquest enzim juga un paper important en la síntesi *de novo* de nucleòtids de guanosina en els limfòcits T i B. Per tant, la inhibició de la IMPDH dona lloc a una disminució de nucleòtids de

guanosina i a un augment de nucleòtids d'adenosina fet que produeix una inhibició de la síntesi del DNA i de la proliferació cel·lular, sent aquest el principal mecanisme mitjançant el qual el micofenolat exerceix les seves accions immunosupressores. Un altre mecanisme derivat de la disminució dels nucleòtids de guanosina és la inhibició de la glicosilació i l'expressió de molècules d'adhesió i, per tant, disminueix el reclutament de limfòcits i monòcits en els llocs d'inflamació (1).

Per altra banda, el micofenolat inhibeix la forma induïble de l'enzim òxid nítric sintetasa (iNOS; EC 1.14.13.39), la qual cosa porta a una menor producció d'òxid nítric i consegüentment a un menor dany cel·lular. El micofenolat té efectes favorables en

la malaltia cardiovascular, ja que mitjançant la inhibició de la iNOS disminueix l'oxidació de lipoproteïnes i, per tant, retarda la progressió de l'aterosclerosi en pacients amb lupus eritematós sistèmic (1).

L'administració de MMF planteja el problema de la seva variabilitat farmacocinètica inter i intraindividual i a més està sotmesa a efectes indesitjables potencials, especialment gastrointestinals, infeccions i tumors. Per aquestes raons, és necessària una individualització de la dosi mitjançant el seguiment de la concentració de micofenolat en el plasma (2).

En l'actualitat, a més dels sistemes de mesura basats en principis d'immunoanàlisi, la concentració de micofenolat en el plasma 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 d'absorció molecular, 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*) (3-14). El fet que aquests sistemes presenten unes millors propietats metrològiques que els basats en la immunoanàlisi, ha conduït a considerar-los sistemes de mesura de referència.

L'objectiu d'aquest treball és validar un procediment de mesura per al mesurament de la concentració de micofenolat en el plasma emprant un sistema de mesura que es basa en la cromatografia líquida d'alta i ràpida eficàcia o UPLC (acrònim de l'anglès *ultra high-performance liquid chromatography*) acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat (UV).

## 2. Material i mètodes

### 2.1. Productes químics i reactius

L'acetonitril, l'aigua i el metanol de qualitat HPLC són proporcionats per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya).

S'utilitza l'equip de reactius ClinRep® Complete kit for Mycophenolic Acid in plasma de Recipe® (Munich, Alemanya). Cada equip conté: una ampolla d'1 L de fase mòbil, un material de calibratge, una ampolla de 20 mL d'una solució precipitant de proteïnes i una ampolla de 2 mL d'estàndard intern.

S'empren 3 materials de control plasmàtic ClinChek® Plasma Control for Mycophenolic Acid de Recipe®.

El material de calibratge i els materials de control es preparen seguint les instruccions i recomanacions descrites pel 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-K<sub>3</sub> com anticoagulant (Vacuette, Kremsmünster, Àustria). Les mostres són centrifugades a 1200 g durant 10 minuts a temperatura ambient i emmagatzemades a (2-8) °C fins al seu processament durant un temps inferior a un dia.

### 2.3. Preparació de les mostres

La preparació de les mostres consisteix en una precipitació de proteïnes. En un tub tipus Eppendorf, s'afegeixen 100 µL de cada calibrador, control o mostra de plasma i 20 µL de la solució d'estàndard intern inclosa en l'equip de reactius. La mescla s'agita breument en un agitador tipus vòrtex i, posteriorment, s'afegeixen 200 µL de la solució precipitant. Després de l'agitació de la mescla resultant en un vòrtex durant 5 segons, els tubs se centrifuguen durant 5 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 detector ultraviolat ACQUITY® UV®, ambdós de Waters Cromatografia (Milford, Estats Units).

#### 2.5. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels components de la mostra es porta a terme a 30 °C utilitzant una columna analítica C<sub>18</sub> en fase reversa Acquity UPLC® BEH 2,1 x 50 mm; 1,7 µm de Waters a la qual se li ha incorporat un suport que conté un filtre de 0,2 µm (Waters). Les mostres es mantenen a 15 °C a l'interior del mostrejador. Es treballa a un flux de 0,4 mL/min en modalitat isocràtica. El volum d'injecció de la mostra és de 7,5 µL en un bucle de 10 µL treballant en la modalitat d'injecció parcial amb l'agulla sobreeixida.

#### 2.6. Condicions del detector ultraviolat

La longitud d'ona de treball emprada és 215 nm.

#### 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) (15-22).

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 i la recuperació. Per altra banda, també es realitza un estudi d'intercanviabilitat de valors mesurats entre el sistema en estudi i l'emprat habitualment al nostre laboratori..

##### 2.7.1. Calibratge

Cada deu mostres es processa el material de calibratge de matriu plasmàtica inclòs a l'equip de reactius.

La integració de les àrees sota la corba dels pics cromatogràfics suavitzats i el càlcul de la concentració de micofenolat es realitza utilitzant el programa informàtic Empower® versió 3.0 de Waters. El programa informàtic calcula la concentració de micofenolat en el plasma seguint l'equació següent:

$$[\text{Micofenolat}] \text{ (mg/L)} = \frac{\text{Àrea pic}_{\text{Mostra}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Cal}}}{\text{Àrea pic}_{\text{Cal}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Mostra}}} \cdot [\text{Cal}]$$

on [Micofenolat] = concentració de micofenolat en les mostres o materials de control; IS = estàndard intern; Cal = calibrador i [Cal] = Concentració del calibrador.

##### 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 plasmàtica. Es calcula la imprecisió intraserial mitjançant la fórmula:

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

on  $CV_{\text{INTRA}}$ ,  $s_{\text{INTRA}}$  i  $\bar{x}_{\text{INTRA}}$  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  $\mu$  és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control per un procediment i sistema de mesura de referència (HPLC-MS/MS).

Seguint els criteris de l'EMA (22), els valors del  $CV_{\text{INTRA}}$  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 intraserial emprant mostres de pacients

Es realitzen tres barreges de mostres de plasmes de pacients amb concentracions similars a les dels materials de control. Les barreges són homogeneïtzades, aliquidades i emmagatzemades a -80 °C fins al moment del seu processament.

Cada una de les barreges de plasmes de pacients es processa 16 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 (22), els valors de  $CV_{\text{INTRA}}$  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 27 vegades, en 27 dies repartits en cinc mesos, els tres materials de control de matriu plasmàtica.

Es calculen la mitjana ( $\bar{x}_{\text{INTER}}$ ), la desviació estàndard ( $s_{\text{INTER}}$ ) i el coeficient de variació ( $CV_{\text{INTER}}$ ) 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  $\mu$  és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control per un procediment i sistema de mesura de referència (HPLC-MS/MS).

Seguint els criteris de l'EMA (22), els valors de  $CV_{\text{INTER}}$  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 interdiària emprant mostres de pacients

Les mateixes barreges preparades a l'apartat 2.7.3 es processen 27 vegades, en 27 dies repartits en cinc mesos. Es calcula la imprecisió interdiària de la mateixa manera que a l'apartat 2.7.4.

Seguint els criteris de l'EMA (22), els valors de  $CV_{\text{INTER}}$  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 (24), utilitzant el programa estadístic Analyse-it® Method Evaluation Edition versió 2.14 d'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

S'estima l'error de mesura utilitzant tres materials de control de matriu plasmàtica que pertanyen al Programa Internacional d'Avaluació Externa de la Qualitat (IPTS) de l'empresa Servei d'Avaluació Externa de la Qualitat del Regne Unit (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 (21, 25):

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

on  $x$  és el valor mesurat obtingut i  $\mu$ , el valor convencional. Com a valors de  $\mu$  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 de  $e_{rel.}$  han de ser inferiors o iguals a  $\pm 30 \%$ .

### 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 (15, 16, 18, 19). Es realitza una barreja de mostres de pacients que no han ingerit micofenolat (material de blanc). La barreja és homogeneïtzada, aliquidada i emmagatzemada a  $-80$  °C fins al moment del seu processament. Aquesta barreja es processa 15 vegades, en 15 dies repartits en cinc mesos.

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 (22), aquest valor de  $y$  és 20 %.

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

Seguint les guies de l'EMA (22) i del CLSI EP6-A (20), per a l'estudi de l'interval de mesura, es realitzen tres dilucions seriadades (proporcions 3:1; 2:2 i 2:3) a

partir d'un material de blanc al qual se li ha afegit una quantitat de micofenolat determinada fins aconseguir una solució plasmàtica del fàrmac de 15 mg/L (material d'alt valor). Com a diluent per fer les distintes solucions, s'utilitza el material de blanc.

Es processen, aleatòriament, per quadruplicat i en un únic dia, les tres solucions així com els materials de blanc i d'alt valor (proporcions 4:0 i 0:4, respectivament). Seguint els criteris de l'EMA (22) es comprova que, per a cada una de les solucions i per als dos materials, 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 (18, 19).

#### 2.7.10. 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 material de blanc (L) i el material d'alt valor (H) preparats a l'apartat 2.7.9 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).

#### 2.7.11. Estudi de la recuperació

Aquest estudi es realitza seguint el procediment emprat per Matuszewski *et al.* (26) a una concentració de 0,5, 2,5 i 7,5 mg/L de micofenolat. S'empren dos grups de mostres: un grup compost per vuit mostres de plasma de pacients que no han ingerit el fàrmac en estudi i a les que se'ls afegeix micofenolat després del procés d'extracció (Mostres A); i l'altre grup amb les mateixes vuit mostres a les quals se'ls afegeix micofenolat abans del procés d'extracció (Mostres B). Emprant les àrees dels pics cromatogràfics obtingudes després de processar totes aquestes mostres, la recuperació es calcula com:

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{\text{Mitjana Àrees MostreB}}{\text{Mitjana Àrees MostresA}} \cdot 100$$

Per altra banda, es calcula el coeficient de variació obtingut després de processar les mostres B per tal d'estimar la variabilitat entre les diferents mostres de plasma utilitzades. El valor del coeficient de variació ha de ser inferior al 15 %, tal i com indica l'EMA (22).

#### 2.7.12. Estudi d'intercanviabilitat entre sistemes de mesura

Per a l'estudi de la intercanviabilitat es processen, durant cinc mesos, 126 mostres de pacients que han estat sotmesos a un trasplantament renal, hepàtic o cardíac, amb valors representatius de tot l'interval de mesura, pel sistema de mesura en estudi i per un sistema que empra l'equip de reactius EMIT<sup>®</sup> Mycophenolic Acid (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Alemanya) adaptat a l'analitzador Cobas Mira<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Suïssa). Posteriorment, es porta a terme un estudi dels possibles valors aberrants individuals emprant la prova paramètrica de Grubbs (27) i la prova paramètrica de Bland-Altman (28) per als possibles

valors aberrants per parelles. Seguidament, es realitza una regressió no paramètrica de Passing i Bablok (29, 30) dels valors mesurats obtinguts, emprant el programa estadístic Analyse-it® Method Evaluation Edition versió 2.14 (Analyse-it Software, Ltd., Leeds, Regne Unit).

### 3. Resultats

En les condicions cromatogràfiques descrites en aquest estudi, el temps de retenció per al micofenolat i el seu estàndard intern és 1,03 minuts i 1,27 minuts, respectivament (Figura 1).

El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives) és 3,0 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 1. 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 i interdiàries obtingudes utilitzant materials de control i barreges de plasmes (Taula 2 i 3).

Els errors de mesura obtinguts poden visualitzar-se a la Taula 4 observant-se que, en cap cas, se supera el requisit metrològic establert al nostre laboratori (30 %).

El valor crític i els límits de detecció i quantificació són, respectivament, 0,02, 0,03 i 0,05 mg/L. Per altra banda, l'interval de mesura és lineal entre (0,05–16,0) mg/L ( $r^2=0,999$ ).

El percentatge d'arrossegament obtingut és 0,2 % i per tant, es pot considerar que no existeix contaminació per arrossegament o residualitat.

Els valors de recuperació són 97,3 % a una concentració de micofenolat de 0,5 mg/L, 99,4 % a 2,5 mg/L i 99,0 a 7,5 mg/L. Els coeficients de variació intermostrals són 5,9 %, 2,8 % i 3,5 % a una concentració de micofenolat de 0,5 mg/L, 2,5 mg/L i 7,5 mg/L, respectivament.

Els valors mesurats obtinguts mitjançant ambdós sistemes de mesura no són intercanviables, existeix un biaix proporcional i constant. Els paràmetres  $a$  (ordenada a l'origen) i  $b$  (pendent) de la recta de regressió (Figura 2), així com els respectius intervals de confiança obtinguts amb una significació estadística de 0,05 (valors entre parèntesi) són  $a = 0,33$  (0,19 – 0,45) i  $b = 1,17$  (1,10 – 1,24).

Taula 1. Imprecisions i biaixos intraserials i interdiaris emprant materials de control per al sistema de mesura Acquity UPLC®-UV® per a la concentració de micofenolat en el plasma.

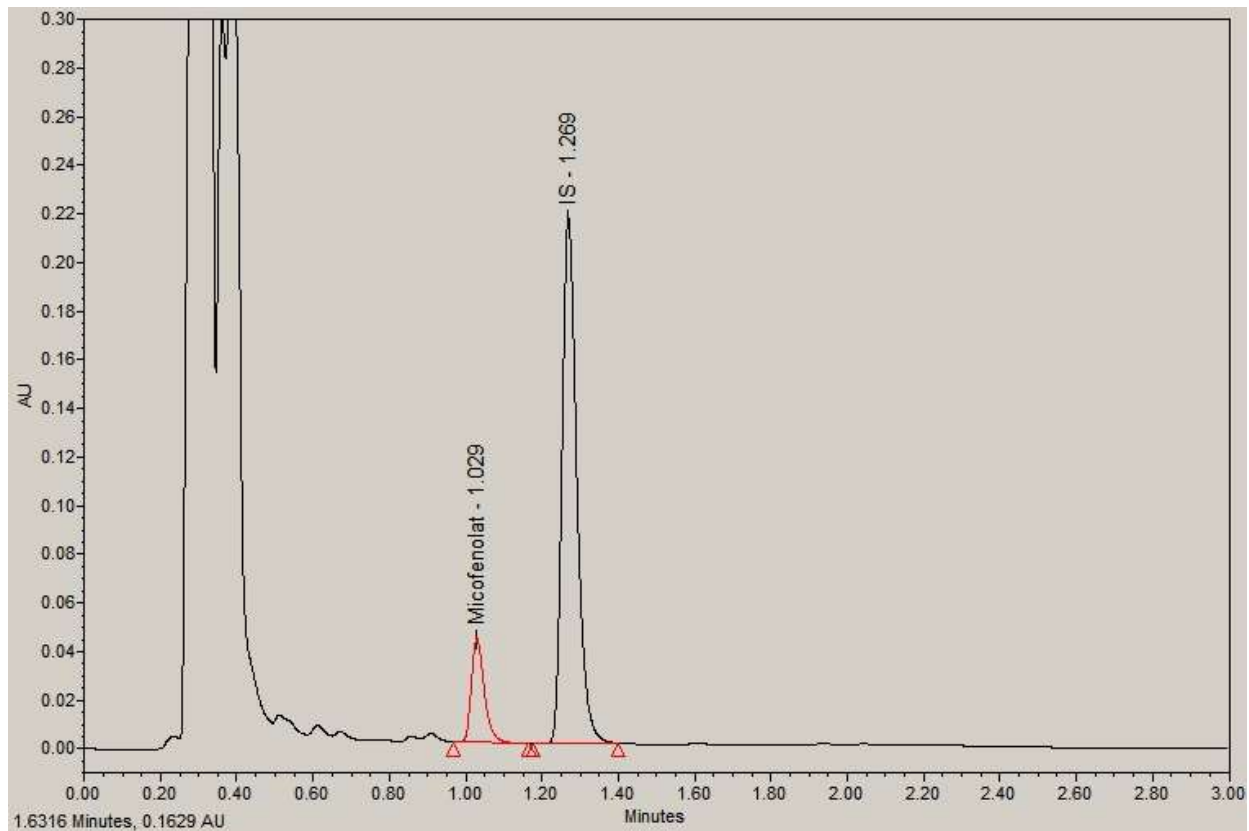
Magnitud	$\bar{x}_{\text{INTRA}}$ (mg/L)	$n_{\text{INTRA}}$	Biaix relatiu intraserial		Imprecisió intraserial		$\bar{x}_{\text{INTER}}$ (mg/L)	$n_{\text{INTER}}$	Biaix relatiu interdiari		Imprecisió interdiària	
			$\mu$ (mg/L)	$\delta_{\text{INTRA}}$ (%)	$s_{\text{INTRA}}$ (mg/L)	$CV_{\text{INTRA}}$ (%)			$\mu$ (mg/L)	$\delta_{\text{INTER}}$ (%)	$s_{\text{INTER}}$ (mg/L)	$CV_{\text{INTER}}$ (%)
Pla—Micofenolat; c.massa	0,41	16	0,46	-12,4	0,017	4,3	0,47	27	0,46	-2,0	0,040	8,5
	2,33	16	2,35	-1,0	0,017	0,7	2,35	27	2,35	0,1	0,097	4,1
	4,84	16	4,72	2,5	0,044	0,9	4,72	27	4,72	0,0	0,249	5,3

$\bar{x}_{\text{INTRA}}$ , mitjana intraserial;  $n_{\text{INTRA}}$ , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie;  $\mu$ , valor convencional (assignat com la mitjana obtinguda per diferents laboratoris de referència que empren sistemes de mesura de referència (HPLC-MS/MS));  $\delta_{\text{INTRA}}$ , biaix relatiu intraserial;  $s_{\text{INTRA}}$ , desviació estàndard intraserial;  $CV_{\text{INTRA}}$ , coeficient de variació intraserial;  $\bar{x}_{\text{INTER}}$ , mitjana interdiària;  $n_{\text{INTER}}$ , nombre de materials de control processats en dies diferents;  $\delta_{\text{INTER}}$ , biaix relatiu interdiari;  $s_{\text{INTER}}$ , desviació estàndard interdiària;  $CV_{\text{INTER}}$ , coeficient de variació interdiari.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (23): c.massa, concentració de massa; Pla, Plasma..



Figura 1. Cromatograma obtingut després de processar una mostra de plasma de pacient a una concentració de 2,05 mg/L.



AU, unitats d'absorbància, IS, estàndard intern.

Taula 2. Intercanviabilitat entre els valors d'imprecisió intraserial utilitzant materials de control i barreges de plasmes de pacients.

Magnitud	$\bar{x}_{INTRA}$ ( $\mu\text{g/L}$ )		Imprecisió intraserial emprant materials de control		$\bar{x}_{INTRA}$ ( $\mu\text{g/L}$ )		Imprecisió intraserial emprant mostres de pacients		P ( $\alpha=0,05$ )
	$n_{INTRA}$	$s_{INTRA}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$CV_{INTRA}$ (%)	$n_{INTRA}$	$s_{INTRA}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$CV_{INTRA}$ (%)			
Pla—Micofenolat; c.massa	0,41	16	0,017	<b>4,3</b>	0,54	16	0,028	<b>5,2</b>	0,0339
	2,33	16	0,017	<b>0,7</b>	2,52	16	0,073	<b>2,9</b>	<0,0001
	4,84	16	0,044	<b>0,9</b>	4,99	16	0,150	<b>3,0</b>	<0,0001

$\bar{x}_{INTRA}$ , mitjana intraserial;  $n_{INTRA}$ , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie;  $s_{INTRA}$ , desviació estàndard intraserial;  $CV_{INTRA}$ , coeficient de variació intraserial; P ( $\alpha=0,05$ ), probabilitat obtinguda en la prova paramètrica d'homogeneïtat de variàncies de F de Snedecor amb un nivell de significació estadística de 0,05.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (23): c.massa, concentració de massa; Pla, Plasma.

Taula 3. Intercanviabilitat entre els valors d'imprecisió interdiària utilitzant materials de control i barreges de plasmes de pacients.

Magnitud	Imprecisió interdiària emprant materials de control				Imprecisió interdiària emprant mostres de pacients				P ( $\alpha=0,05$ )
	$\bar{x}_{\text{INTRA}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$n_{\text{INTRA}}$	$s_{\text{INTRA}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$CV_{\text{INTRA}}$ (%)	$\bar{x}_{\text{INTRA}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$n_{\text{INTRA}}$	$s_{\text{INTRA}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$CV_{\text{INTRA}}$ (%)	
Pla—Micofenolat; c.massa	0,47	27	0,040	<b>8,5</b>	0,61	27	0,061	<b>10,0</b>	0,0188
	2,35	27	0,097	<b>4,1</b>	2,46	27	0,142	<b>5,8</b>	0,0276
	4,72	27	0,249	<b>5,3</b>	5,07	27	0,352	<b>6,9</b>	0,0408

$\bar{x}_{\text{INTRA}}$ , mitjana intraserial;  $n_{\text{INTRA}}$ , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie;  $s_{\text{INTRA}}$ , desviació estàndard intraserial;  $CV_{\text{INTRA}}$ , coeficient de variació intraserial; P ( $\alpha=0,05$ ), probabilitat obtinguda en la prova paramètrica d'homogeneïtat de variàncies de F de Snedecor amb un nivell de significació estadística de 0,05.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (23): c.massa, concentració de massa; Pla, Plasma.

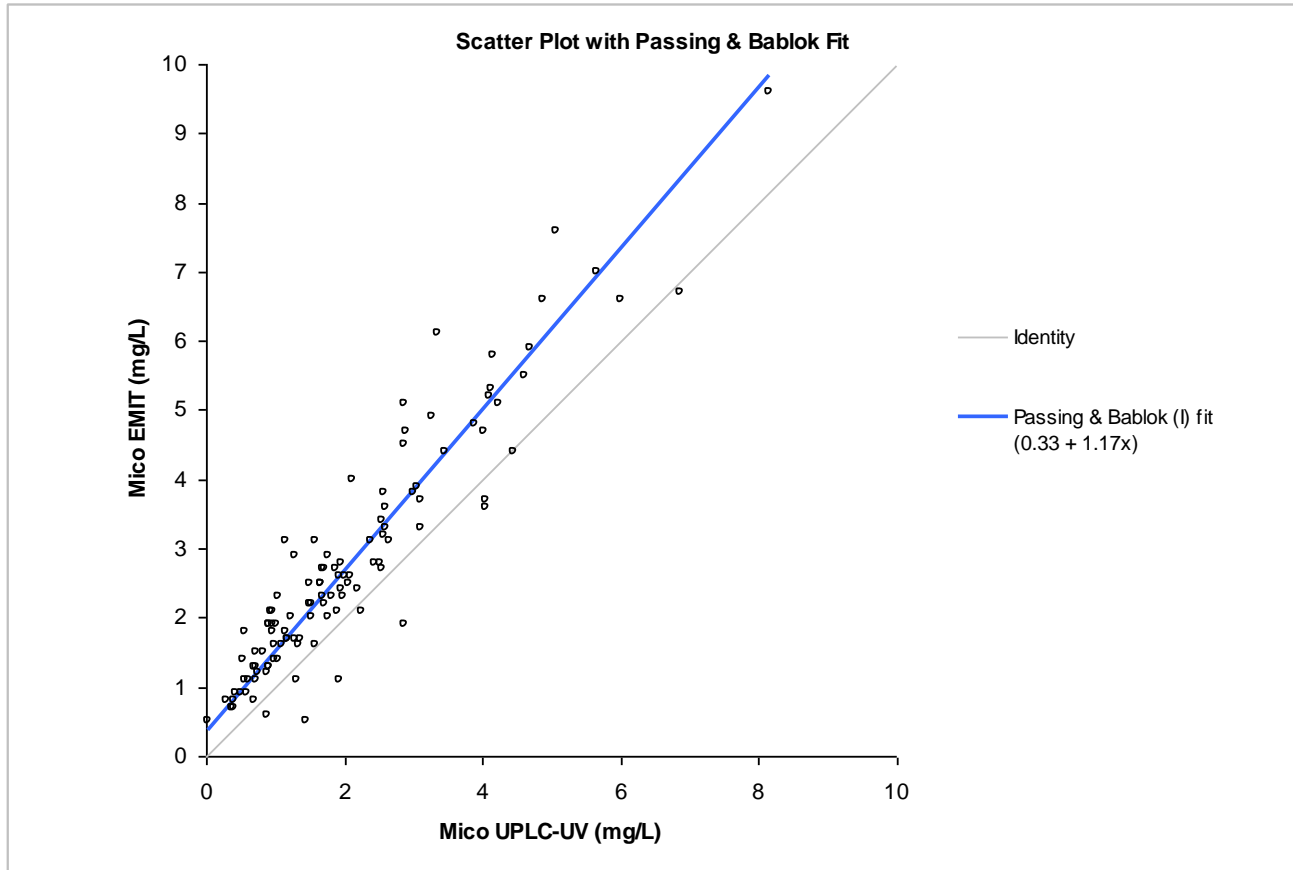
Taula 4. Errors de mesura relatius per al sistema de mesura Acquity UPLC®-UV® per a la concentració de micofenolat en el plasma del programa d'avaluació externa de la qualitat IPTS d'UK-NEQAS.

Magnitud	Cicle de control / Mostra	x (mg/L)	$\mu$ (N) (mg/L)	$e_{\text{rel}}$ (%)
Pla—Micofenolat; c.massa	56/A	8,0	8,0 (-)	<b>0,0</b>
	56/B	2,1	2,1 (42)	<b>0,0</b>
	57/A	3,3	3,0 (-)	<b>10,0</b>
	57/B	3,0	3,0 (-)	<b>0,0</b>
	60/A	5,1	5,0 (-)	<b>2,0</b>
	60/B	10,4	10,0 (-)	<b>4,0</b>

x, valor mesurat de control;  $\mu$ , valor convencional: l'assignat mitjançant un procediment 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 o HPLC-MS); N, nombre de valors mesurats que corresponen als laboratoris participants en el programa;  $e_{\text{rel}}$ , error de mesura relatiu.

Seguint les recomanacions de la IUPAC i la IFCC (23): c.massa, concentració de massa; Pla, Plasma.

Figura 2. Recta de regressió dels valors mesurats de micofenolat obtinguts mitjançant el sistema de mesura Acquity UPLC®-UV® i un sistema que empra l'equip de reactius EMIT® Mycophenolic Acid adaptat a l'analitzador Cobas Mira®.



#### 4. Discussió i conclusions

En la majoria de laboratoris clínics la concentració de micofenolat en el plasma es mesura 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 la manca d'especificitat de l'anticòs, entre d'altres). Les millores metrològiques que comporta la utilització de sistemes basats en la HPLC-UV respecte als que empen les immunoanàlisis com a principi de mesura, i la importància que suposen

aquestes millores en la monitorització farmacoterapèutica del tractament d'aquest fàrmac immunosupressor en pacients trasplantats, ens va conduir a validar un sistema de mesura (Acquity UPLC® UV®) que empra la UPLC-UV per al mesurament de la concentració de micofenolat en el plasma.

El procediment de mesura utilitzat, per al mesurament de la concentració de micofenolat en el plasma, en aquest treball està basat en les recomanacions del fabricant de l'equip de reactius. Tot i així, degut a que es fa servir un cromatògraf líquid d'alta i ràpida eficàcia (UPLC) enlloc d'un d'alta eficàcia (HPLC) i per tal d'aprofitar els

avantatges que comporta la utilització del primer — proporciona una major resolució i eficàcia cromatogràfiques en un menor temps permetent escurçar els temps de retenció— les condicions cromatogràfiques emprades varien respecte a les recomanades pel fabricant de l'equip de reactius, fet que ens va conduir a realitzar un estudi de validació i no de verificació tal i com recomana l'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic (31).

En referència a l'estudi de les propietats metrològiques, el sistema de mesura presenta un ampli interval de linealitat així com imprecisions, biaixos, errors de mesura i un límit de detecció i quantificació acceptables per al nostre laboratori.

Per altra banda, els valors d'imprecisió obtinguts emprant materials de control i mostres de pacients no són intercanviables. 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 (32).

En conclusió, el sistema de mesura Acquity UPLC® UV® permet mesurar la concentració de micofenolat en el plasma amb una preparació mínima de la mostra i utilitzant volums reduïts de mostra. Aquest sistema de mesura és una millor alternativa als sistemes basats en mètodes d'immunoanàlisis, i s'adapta bé a la pràctica hospitalària diària per a la monitorització farmacoterapèutica del micofenolat tenint en compte el seu temps d'anàlisi, versatilitat, flexibilitat i propietats metrològiques tals com l'exactitud, la precisió, la veracitat, la capacitat de detecció i l'interval de mesura.

## 5. Bibliografia

1. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:13-58.
2. Kuypers DRJ, Meur YL, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D *et al.* Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:341-58.
3. Tsina I, Chu F, Hama K, Kaloostian M, Tam YL, Tarnowski T, Wong B. Manual and automated(robotic) high-performance liquid chromatograph methods for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma. *J Chromatogr B* 1996;675:119-29.
4. Jones CE, Taylor PJ, Johnson AG. High-performance liquid chromatography determination of mycophenolic acid and glucuronide metabolite in human plasma. *J Chromatogr B* 1998;708:229-34.
5. Shipkova M, Niedmann PD, Armstrong VW, Schütz E, Wieland E, Shaw LM *et al.* Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide in human plasma using a simple high-performance liquid chromatography procedure. *Clin Chem* 1998;44:1481-8.
6. Streit M, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M. Validation of a rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for free and total mycophenolic acid. *Clin Chem* 2004;50:152-9.
7. Khoschorur G, Erwa W. Liquid chromatographic method for simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenol- and acylglucuronide metabolite in plasma. *J Chromatogr B* 2004;799:355-60.
8. Watson DG, Araya FG, Galloway PJ, Beattie TJ. Development of a high pressure liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in small volumes of plasma from paediatric patients. *J Pharm Biomed Anal* 2004;35:87-92.
9. Barzoki MA, Rouini MM, Gholami K, Lessan-Pezeshki M, Rezaee S. Determination of mycophenolic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *DARU* 2005;13:120-6.
10. Westley IS, Sallustio BC, Morris RG. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the measurement of mycophenolic acid and its

- glucuronide metabolites in plasma. Clin Biochem 2005;38:824-9.
11. Musuamba FT, Di Fazio V, Vanbinst R, Wallemacq P. A fast ultra-performance liquid chromatography method for simultaneous quantification of mycophenolic acid and its phenol- and acyl-glucuronides in human plasma. Ther Drug Monit 2009;31:110-5.
  12. Figurski MJ, Korecka M, Fields L, Waligórska T, Shaw LM. High-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy method for simultaneous quantification of total or free fraction of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites. Ther Drug Monit 2009;31:717-26.
  13. Delavenne X, Juthier L, Pons B, Mariat C, Basset T. UPLC MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study. Clin Chim Acta 2011;412:59-65.
  14. Kunithala VK, Chinthakindi KK, Vemula SK, Garepally P, Bontha VK. A new rapid and simple analytical method development and validation of estimation the mycophenolate in dosage form by UPLC technique. Asian J Pharm Clin Res 2012;5:233-7.
  15. 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.
  16. International Organization for Standardization, Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. ISO-11843-1. Ginebra: ISO; 1997.
  17. 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. Ginebra, 2008.
  18. 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.<<http://old.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>> (accés: 2013-06-19).
  19. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl Chem 2002;74:835-55.
  20. Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. EP6-A. Wayne: CLSI; 2003.
  21. 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.
  22. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on validation of bioanalytical methods. Londres: European Medicines Agency; 2009. <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)> (accés: 2013-06-19).
  23. 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.
  24. Xavier Fuentes-Arderiu, Bernardino González-de-la-Presa. Interchangeability of estimates of day-to-day imprecision between commercial control materials and serum pools. Clin Chem 2002;48:573-4.
  25. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. Bioquímica clínica y Patología Molecular. Barcelona: Reverté; 1998.
  26. 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.
  27. Barnett V, Lewis T. Outliers in Statistical Data. Nova York: Wiley; 1994.
  28. Altman DG. Practical statistics for medical research. Londres: Chapman and Hall; 1991.
  29. Passing H, Bablok WA. New biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20.
  30. Passing H, Bablok WA. General regression procedure for method transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-90.

31. Miró Balagué J, Fuentes Arderiu X, Jordi Baiges A, Martínez Casademont M, Pastor Ferrer C, Pérez Remón, *et al.* Guia per a la verificació dels sistemes de mesura de magnituds biològiques per a l'acreditació segons la norma ISO 15189. *In vitro veritas* 2009;10: <<http://www.acclc.cat/continguts/ivv113.pdf>> (accés: 2013-06-19).
32. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* 1983;29:25-30.