

TAMOXIFENE/ENDOXIFENE PLASMATICI in LC/MS – Codice LC92010

INTRODUZIONE

Il tamoxifene ha rappresentato negli ultimi decenni il più importante agente terapeutico per il trattamento del carcinoma mammario positivo per recettori agli estrogeni. Il tamoxifene si lega al recettore ER inibendo il legame degli estrogeni e la conseguente proliferazione del tumore. Il farmaco viene metabolizzato a livello epatico dall'isoforma del citocromo P450 CYP2D6, con conseguente formazione di metaboliti attivi. L'endoxifene ed il 4-OH-tamoxifene presentano la stessa affinità di legame per il recettore estrogeno ER-alfa e la medesima capacità di inibire la proliferazione estrogeno-dipendente di cellule di tumore mammario che esprimono tale recettore.

In alcuni individui una minore formazione dei metaboliti attivi, dovuta ad una ridotta o assente funzionalità dell'enzima CYP2D6, può determinare una peggiore risposta terapeutica al farmaco. Infatti, nonostante il beneficio terapeutico del tamoxifene sia stato dimostrato in oltre tre decenni di utilizzo clinico dalla riduzione della ricomparsa del tumore (47%) e dei tassi di mortalità (26%) in pazienti con tumore della mammella ER+, circa il 30%-50% delle donne trattate con questo chemioterapico va incontro ad eventi di recidiva/morte. Diversi studi clinici hanno dimostrato che pazienti con metabolismo nullo o ridotto, trattate con tamoxifene, hanno un peggiore outcome terapeutico, sia in termini di maggiore rischio di recidiva, sia in termini di tempo libero da malattia/recidiva rispetto a pazienti portatrici di alleli CYP2D6 funzionanti. Recenti studi clinici hanno evidenziato che pazienti con CYP2D6 wild-type, trattate contemporaneamente con tamoxifene e farmaci antidepressivi forti inibitori del CYP2D6, hanno livelli plasmatici di endoxifene minori rispetto a pazienti che non assumono tali inibitori e ricevono quindi un minor beneficio terapeutico dal trattamento con tamoxifene.

Fatte queste debite premesse risulta evidente come il TherapeuticDrugMonitoring (TDM) per il tamoxifene e l'endoxifene rappresenta un argomento di grande attualità. Le metodiche analitiche ad oggi disponibili (HPLC UV-VIS/FLD) rendono il TDM di questi analiti indaginosi e poco allineati a quella che è la normale richiesta di una routine assistenziale in termini di sensibilità, affidabilità e rapidità di refertazione. Questo metodo permette di analizzare sia il tamoxifene che il suo principale metabolita attivo (endoxifene) mediante la tecnica di riferimento LC-MS/MS, quindi, la naturale risposta alle esigenze diagnostiche e cliniche per determinare in modo affidabile, robusto, sensibile e rapido i livelli plasmatici e/o sierici di tamoxifene e dei suoi metaboliti attivi.

 EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 005	Tamoxifene/Endoxifene plasmatici in LC/MS	10/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

Il Tamoxifene ed il suo metabolita attivo principale vengono analizzati trattando il plasma con un opportuno reagente di deproteinizzazione. La soluzione viene direttamente iniettata in LC/MS.

Recupero:

Endoxifene 99,5%
Tamoxifene 102,7%

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

Endoxifene 0,17 ng/ml
Tamoxifene 0,033 ng/ml

Minima Concentrazione analizzabile (LLOQ):

Endoxifene 0,5 ng/ml
Tamoxifene 0,1 ng/ml

Linearità:

Endoxifene 0,5 – 100 ng/ml
Tamoxifene 0,1 – 1000 ng/ml

Range terapeutico nel siero :

Endoxifene valori normali > 5,6 ng/ml
Tamoxifene valori normali >130 ng/ml

1) N. G. L. Jager, H. Rosing, J. H. M. Schellens, S. C. Linn, J. H. Beijnen Tamoxifen dose and serum concentrations of tamoxifen and six of its metabolites in routine clinical outpatient care. Breast Cancer Res Treat (2014) 143:477–483 DOI 10.1007/s10549-013-2826-1

2) Lisa Madlensky, Loki Natarajan, Simone Tchu, Minya Pu, Joanne Mortimer, Shirley W. Flatt, D. Michele Nikoloff, Grantland Hillman, Marcel R. Fontecha, H. Jeffrey Lawrence, Barbara A. Parker, Alan H.B. Wu, and John P. Pierce. Tamoxifen Metabolite Concentrations, CYP2D6 Genotype and

Breast Cancer Outcomes. Clin Pharmacol Ther. 2011 May ; 89(5): 718–725. doi:10.1038/clpt.2011.32.

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Endoxifene :

C1	C2	C3
2 ng/ml	6 ng/ml	12 ng/ml
7,7%	7,3%	3,7%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Endoxifene :

C1	C2	C3
2 ng/ml	6 ng/ml	12 ng/ml
5,3%	5,7%	3,1%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)

Endoxifene :

Ci	Cm	Cs	
1 ng/ml	4 ng/ml	8 ng/ml	
13,9%	11,0%	3,6%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Endoxifene :

Ci	Cm	Cs	
1 ng/ml	4 ng/ml	8 ng/ml	
11,6%	5,6%	5,0%	

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9937 ± 0,0053 Endoxifene

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Tamoxifene :

C1	C2	C3
10 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml
19,5%	3,4%	3,4%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)**Tamoxifene :**

C1	C2	C3	
10 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	
6,3%	7,8%	4,3%	

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)**Tamoxifene :**

Ci	Cm	Cs
1 ng/ml	50 ng/ml	150 ng/ml
3,8%	7,7%	2,3%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Tamoxifene :

Ci	Cm	Cs	
1 ng/ml	50 ng/ml	150 ng/ml	
8,8%	6,3%	2,7%	

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9922 ± 0,0074 Tamoxifene

Contenuto della confezione :Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C, eccetto **Reagente A**.**Reagente A** – Soluzione Deproteinizzante + Standard interno, **1 x 30 ml** **Stoccare a -20 °C****Reagente B** – Soluzione Stabilizzante, **1 x 20 ml****Calibratore plasmatico – Livello 1, 1 x 1 ml****Codice LC92016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)****Calibratore plasmatico – Livello 2, 1 x 1 ml****Codice LC92016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)****Calibratore plasmatico – Livello 3, 1 x 1 ml****Codice LC92016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)****Calibratore plasmatico – Livello 4, 1 x 1 ml****Codice LC92016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)****Calibratore plasmatico – Livello 5, 1 x 1 ml****Codice LC92016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)****Reagente M1** – Fase Mobile M1, **2 x 500 ml****Reagente M2** – Fase Mobile M2, **2 x 500 ml****Dotazione strumentale minima richiesta :**Strumento LC-MS triplo quadrupolo
Modalità di lavoro MRM, ESI positivo**Dotazione opzionale :**

Autocampionatore

Modalità per il prelievo ematico :Prelevare 3 ml di sangue in una provetta con anticoagulante **EDTA**. Centrifugare **immediatamente** a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il plasma e stoccarlo a -20 °C. Stabile 1 mese.**Indice Riferimenti Bibliografici**

- 1- Tamoxifen dose and serum concentrations of tamoxifen and six of its metabolites in routine clinical outpatient care. N. G. L. Jager • H. Rosing • J. H. M. Schellens • S. C. Linn • J. H. Beijnen
Breast Cancer Res Treat (2014) 143:477–483 DOI 10.1007/s10549-013-2826-1
- 2- Tamoxifen Metabolite Concentrations, CYP2D6 Genotype and Breast Cancer Outcomes. Lisa Madlensky1, Loki Natarajan1, Simone Tchu2, Minya Pu1, Joanne Mortimer3, Shirley W. Flatt1, D. Michele Nikoloff4, Grantland Hillman4, Marcel R. Fontecha4, H. Jeffrey Lawrence4, Barbara A. Parker1, Alan H.B. Wu2, and John P. Pierce1.
Clin Pharmacol Ther. 2011 May ; 89(5): 718–725. doi:10.1038/clpt.2011.32.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 :

In eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Calibratore – Livello 1	100 µl						
Calibratore – Livello 2		100 µl					
Calibratore – Livello 3			100 µl				
Calibratore – Livello 4				100 µl			
Calibratore – Livello 5					100 µl		
Campione						100 µl	
Controlli							100 µl
Reagente A – Soluzione Deproteinizzante + Standard interno	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Al vortex per 20 secondi

FASE 2: Centrifugare a 13.000 giri per 5 minuti.

FASE 3: Prelevare 200 µl di surnatante in una vial e aggiungere 200 µl di **Reagente B – Soluzione Stabilizzante** (o un volume adeguato per la sensibilità strumentale)

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 20 µl del surnatante nel sistema LC

TAMOXIFENE/ENDOXIFENE PLASMATICI - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova RRHD Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm), termostata a 40 °C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Acetonitrile : Acqua (95 : 5 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con una soluzione di Fase Mobile M1 : Acqua (98 : 2 v/v) al flusso di 300 µl / minuto per 15 minuti. Effettuare due iniezioni di Acqua di grado HPLC prima di procedere con la serie analitica.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Lavare con una soluzione contenente Fase Mobile M2 : Fase Mobile M1 (95 : 5 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.** La colonna va stoccata in una soluzione contenente Fase Mobile M2 : Fase Mobile M1 (95 : 5 v/v).

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Lavare con una soluzione contenente Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).

PARAMETRI ESI Sciex 4500

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spray Voltage: (IS): 4500 V
Temperature (TEM): 550°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 60
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE UHPLC			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0.01	98	2	300
0.50	98	2	300
6.00	2	98	300
7.00	2	98	300
7.01	98	2	300
8.00	98	2	300

GRADIENTE HPLC			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	98	2	300
0.50	98	2	300
6.00	2	98	300
7.00	2	98	300
7.1	98	2	300
13.00	98	2	300

FRAMMENTAZIONI (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO Sciex 4500)

Analita	Q1	Q3	ENERGIA DI COLLISIONE
ENDOXIFENE	374.3	223.0 – 145.0	25.0 – 33.0
TAMOXIFENE	372.3	72.1 – 129.2	50.0 – 35.0
ENDOXIFENE-D5	379.5	379.5	10.0

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC92016	Calibratore plasmatico per Tamoxifene/Endoxifene	5 x 2 x 1 ml
LC92019	Controllo plasmatico per Tamoxifene/Endoxifene – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Colonna Analitica per sistemi UHPLC		
Z959757902	Colonna analitica RRHD Eclipse Plus C 18 (50 x 2.1 mm - 1.8 µm)	1 Pz
Colonna Analitica per sistemi HPLC		
Z959793902	Colonna analitica Eclipse Plus C 18 (100 x 2.1 mm – 3.5 µm)	1 Pz
S51843550	Vial di vetro a volume ridotto	1 x 100 Pz
S51820717	Tappi per vial a volume ridotto	1 x 100 Pz
SK92010	Starter kit per Tamoxifene/Endoxifene	3 x 1 ml

TAMOXIFENE/ENDOXIFENE PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento per sistemi UHPLC)

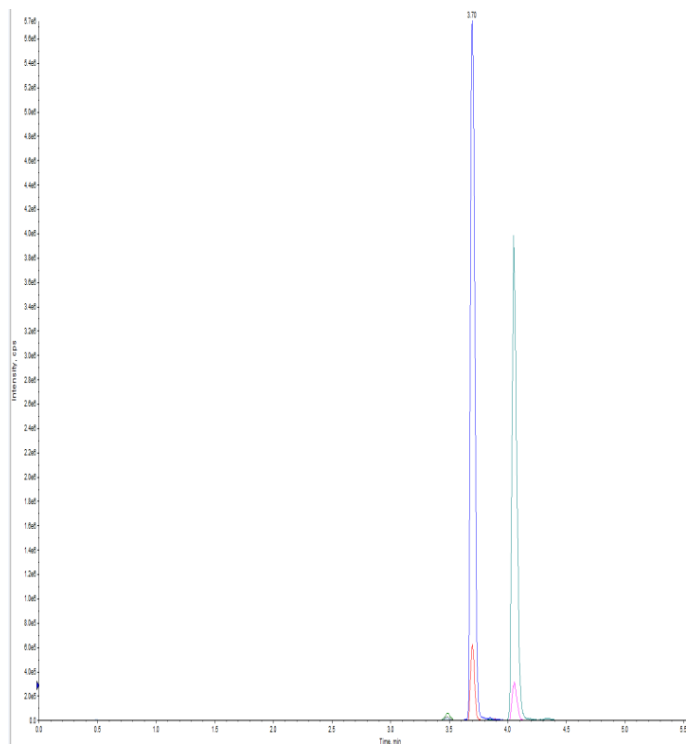


Fig. 1 : Calibratore plasmatico		
R.T. 3.48	Endoxifene	30 ng/ml
R.T. 3.70	Tamoxifene	50 ng/ml
R.T. 4.05	IS	

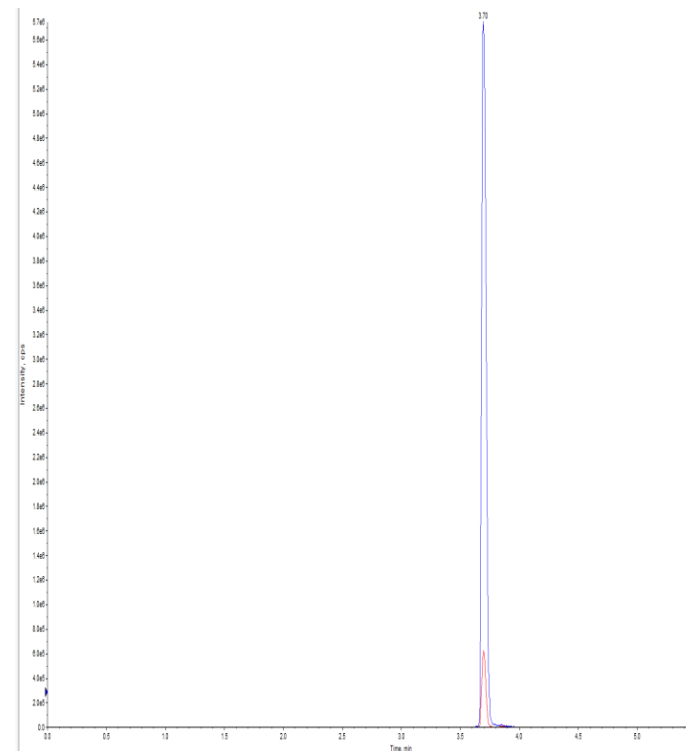


Fig. 2 : Calibratore plasmatico		
R.T. 3.70	Tamoxifene	50 ng/ml

TAMOXIFENE/ENDOXIFENE PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento per sistemi UHPLC)

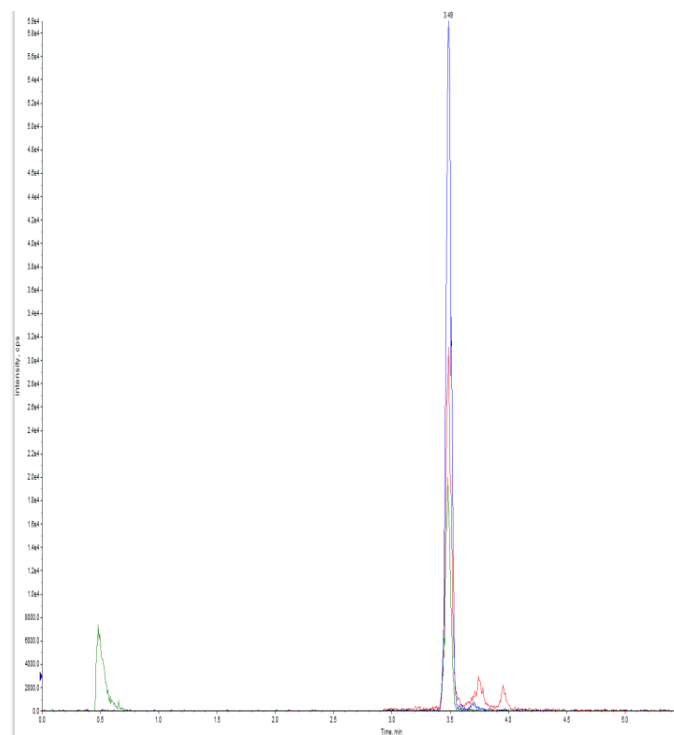


Fig. 3 :	Calibratore plasmatico		
R.T.	3.49	Endoxifene	30 ng/ml

TAMOXIFENE/ENDOXIFENE PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento per sistemi HPLC)

