

Laboratorní metody v terapeutickém monitorování léků

Hana Brozmanová

Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava

Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

Významnou součástí terapeutického monitorování léků jsou laboratorní metody, používané na stanovení koncentrace léčivých látek v plné krvi séru, plasmě, příp. dalších biologických matricích. V článku je uveden přehled rutinních analytických metod a postupně se zvyšující význam kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v analytice léčivých látek.

Klíčová slova: imunoanalýza, kapalinová chromatografie, hmotnostní detekce, validace.

Laboratory methods in therapeutic drug monitoring

An important part of therapeutic drug monitoring are laboratory methods used to determine the concentration of drugs in the whole blood of serum, plasma, or other biological matrices. The article provides an overview of routine analytical methods and the gradually increasing importance of liquid chromatography with mass detection in the analysis of drugs.

Key words: immunoassay, liquid chromatography, mass detection, validation.

Úvod

Terapeutické monitorování léků (TDM) je součástí personalizované medicíny a využívá se v případě léčivých látek, které mají úzký vztah mezi koncentrací a účinkem, když je účinek léku obtížně klinicky měřitelný, dále u léků s nelineární kinetikou a také v případech, když má lék úzkou terapeutickou šíří. TDM zahrnuje stanovení koncentrace daného léčiva v krvi, popř. v séru nebo plasmě (mateřském mléku nebo slinách), případnou úpravu dávkovacího schématu často s využitím farmakokinetické analýzy, která zajistí dosažení optimální terapeutické koncentrace léčiva s minimálním výskytem jeho nežádoucích účinků.

Protože koncentrace léčivé látky se mění v průběhu každého dávkovacího intervalu, musíme znát jednak způsob a dobu podání léku a také dobu odběru krve. Standardně se krev odebírá před aplikací další dávky a stanoví se tak nejnižší, údolní koncentrace léčiva. Pokud chceme stanovit nejvyšší dosaženou koncentraci,

odběry krve se provádí v závislosti na způsobu aplikace: u intravenózního podání za 30 minut po skončení infuze, u intramuskulárního podání za 1 hodinu a u perorální aplikace stanovujeme nejvyšší dosaženou koncentraci v době t_{max} , která je u každého léku jiná.

Léčivé látky se nacházejí v krvi popř. séru jednak volné a jednak vázané na plasmatické bílkoviny. Míra a způsob této vazby závisí na vlastnostech jednotlivých látek a také na klinickém stavu pacienta. Množství plasmatických bílkovin a jejich vazebné vlastnosti mohou být ovlivněny probíhající chorobou, těhotenstvím nebo interakcemi se současně podávanými léky. Nutno mít na paměti, že se měří vždy celková koncentrace daného léčiva, a že volná, to je účinná složka může být ovlivněna především u látek s vysokou vazebností (98 %) jako je např. fenytoin nebo kyselina valproová (1). V současné době se diskutuje o významu stanovení volné frakce v souvislosti s TDM beta laktamových

antibiotik, především těch, která jsou významně vázána na bílkoviny plasmy jako např. ceftriaxon. Někteří autoři doporučují stanovovat volnou frakci těchto látek rutinně za použití ultrafiltrace nebo ji určit přepočtem na základě dostupných biochemických parametrů (2). Významnou součástí TDM je i měření koncentrace metabolitů, a to především aktivních, které se na konečném účinku léčiv podílí společně s parentní látkou (1).

Metody na stanovení koncentrace léčivých látek v biologických tekutinách se vyvíjely paralelně od šedesátých let minulého století a v současnosti je můžeme rozdělit na dvě základní skupiny: 1) metody imunoanalytické a 2) metody fyzikálně-chemické (spektrofotometrie, elektromigrační metody a především chromatografické metody).

Imunoanalytické metody

Historie imunoanalytických metod se začíná psát v roce 1959, kdy američtí vědci R. Yalowová a S. Berson poprvé popsali princip imunoanalýzy

na příkladu radioimunoanalýzy inzulinu (3). Za tento počin získali mnoho vědeckých ocenění, které se v roce 1977 završilo Nobelovou cenou pro R. Yalowovou. Vstup imunoanalytických metod umožnil poměrně jednoduchou a přesnou kvantifikaci látek, které se doposud nedaly stanovit, anebo se používaly metody velmi pracné a méně přesné. Imunoanalytické metody se postupně rozšířily za hranice endokrinologie a začaly se využívat v biochemii, imunologii a také v TDM při stanovení koncentrace léčivých látek.

Základem všech imunoanalytických metod je reakce antigenu s protilátkou, z nichž jedna složka (častěji antigen-léčivá látka) je označena tak, aby mohlo dojít k následné identifikaci volné a vázané frakce. Protilátky jsou imunoglobuliny, které vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny. Protože léčiva patří mezi nízkomolekulární látky (tzv. hapteny), mohou vyvolat imunitní reakci a tvorbu protilátek jen když jsou navázány na bílkovinný nosič. Protilátky mohou být polyklonální nebo monoklonální a jejich kvalita významně ovlivňuje specifitu a selektivitu imunoanalytických metod.

Imunoanalytické metody se v podstatě dělí na heterogenní a homogenní podle toho, zda se musí před vlastním měřením vázaná a volná frakce antigenu oddělit (heterogenní), anebo zda separace vázaného imunokomplexu není nutná a celý proces proběhne tzv. v jedné zkumavce (homogenní). Dále se dělí na kompetitivní (kdy dochází k soutěži o protilátku/antigen) a nekompetitivní s protilátkou/antigenem v nadbytku většinou navázanou na vhodný nosič. Kvantifikace dané látky je pak umožněna buď

měřením koncentrace označeného imunokomplexu, který vzniká v rovnováze mezi značeným a nezačeným antigenem nebo stanovením koncentrace volného značeného antigenu. V obou případech se jedná o nelineární závislost.

Mezi první imunoanalytické metody patřila radioimunoanalýza (Radioimmunoassay RIA), kdy se k označení antigenu/protilátky používal radio-nuklid, především jód 125 nebo jód 131. Později se hledal jiný způsob značení, který by méně zatěžoval životní prostředí než radioizotopy. Vznikly první enzymoimunoanalýzy (Enzymoimmunoassay EIA), které k označení antigenu nebo protilátky používaly enzymy jako je alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza, beta-galaktozidáza, glukózo-6-fosfát dehydrogenáza apod. Mezi prvními byla heterogenní kompetitivní enzymová imunoanalýza ELISA s enzymem peroxidázou (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), kde se detekce imunokomplexu prováděla fotometricky za vzniku barevného produktu. Mezi další heterogenní imunoanalýzy patří enzymová analýza na mikročásticích (Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA) která používala ke značení alkalickou fosfatázu a k detekci fluorescenční methylumbelliferon.

Dále se vyvíjely především homogenní kompetitivní enzymové imunoanalýzy jako EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) s glukózo-6-fosfát dehydrogenázou, kde se spektrofotometricky v UV oblasti detekovala měnící se koncentrace NADH. Další homogenní imunoanalýzou byla v analýze léků poměrně rozšířená polarizační fluoroimunoanalýza (Polarisation Fluorescence Immunoassay FPIA) s beta galaktozidázou a s fluoresceinem. Měřila se změna

v polarizaci emitované fluorescence po vytvoření imunokomplexu (4).

K dalším významným imunoanalytickým metodám na stanovení léků patří metody luminiscenční (Luminiscence Immunoassay LIA), které mohou pracovat na principu chemiluminiscence nebo elektrochemiluminiscence. Mezi první typ patří heterogenní chemiluminiscenční imunoanalýza (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, CMIA), kde je antigen označený akridinium esterem a protilátka je vázána na paramagnetické částice v pevné fázi. Měří se kvantitativní množství světla emitovaného během oxidace peroxidu vodíku v alkalickém prostředí. Dalším typem je elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (Electro-chemiluminescence immunoassay ECLIA). Antigen je označen rutheniovým komplexem a protilátka je obvykle vázána na mikročástice, které se zachytí na povrchu elektrody. Po vložení napětí na elektrodu dochází k emisi světla, která je úměrná koncentraci analytu (5).

V současnosti patří mezi rozšířené imunoanalytické metody takové, které využívají k detekci imunokomplexu nefelometrii nebo turbidimetrii.

Imunoanalytické metody se často používají pro rutinní stanovení koncentrace léčiv vzhledem k možnosti automatizace, rychlosti analýzy a velké průchodnosti vzorků. Soupravy činidel spolu s přístrojovou technikou (automatickými analyzátory) jsou dodávány celou řadou firem především pro nejčastěji monitorované léky, jako jsou antiepileptika první a druhé generace, digoxin, teofylin, vankomycin, aminoglykosidová antibiotika a imunosupresiva.

Tab. 1. Přehled metod používaných pro TDM

látko	Fotometrie	Fluorescence	Luminiscence	Imuno turbidimetrie	HPLC	LC-MS/MS
digoxin	21		214	122		
gentamicin	28	20	47	143		
teofylin	19	15	47	104	4	9
kofoin					10	7
karbamazepin	28	15	78	106	9	7
ethosuximid					44	19
fenobarbital	15	8	34	69	32	8
fenytoin	18	12	45	71	27	8
primidon					44	17
valproát	98	20	89	89		
cyklosporin A	7		113			57
takrolimus			95			61
sirolimus			29			63
everolimus	5		9			64

Údaje z prvního cyklu EHK RfB (Referenzinstitut für Bioanalytik) pro rok 2019 CS1/19 a AK1/19. V tabulce je uveden přehled používaných metod a počty analýz pro jednotlivé léčivé látky.

Zastoupení jednotlivých firem: Fotometrie (Roche, Becman Coulter, Siemens), Fluorescence (Roche), Luminiscence (Abbot, Roche, Siemens), Imunoturbidimetrie (Abbot, Becman Coulter, Roche, Siemens), HPLC (Chromsystems, Recipe, vlastní), LC-MS/MS (Chromsystems, Recipe, vlastní)

Nevýhodou imunoanalytických metod je možný výskyt zkřížených reakcí s metabolity léčiv, což vede k falešnému navýšení jejich koncentrace. Především imunoanalytické metody s polyklonálními protilátkami byly méně specifické a interference se projevovala hlavně u léčiv s velkým množstvím metabolitů jako je např. cyklosporin A a takrolimus nebo u látek, kde došlo jen k malé změně struktury. Poprvé byla tato interference popsána u vankomycinu podávaného pacientům se sníženou funkcí ledvin, kdy docházelo k jeho kumulaci v organismu a následně přeměně vankomycinu na látku strukturálně blízkou tzv. CDP (crystalic degradation protein), který vyvolával zvýšení koncentrace vankomycinu o více než 60 % (6). Podobně se chovaly metabolity cyklosporinu A, kde docházelo až ke 100 % navýšení koncentrace cyklosporinu A (7).

Tyto poznatky vedly k rozvoji imunoanalytických metod s monoklonálními protilátkami a k jejich standardnímu testování na zkřížené reakce s metabolity i dalšími strukturálně blízkými látkami. Nově zaváděné metody byly specifitější a interference, pokud k nim docházelo, byly už podstatně menší. U cyklosporinu A byly testovány především primární metabolity a prokázalo se, že metabolit AM1 zvyšuje koncentraci cyklosporinu A o 40 % u FPIA a metabolit AM9 o 20 % u EMIT v porovnání s kapalinovou chromatografií (HPLC) (8). Na našem pracovišti jsme porovnávali cyklosporin A měřený metodou RIA s monoklonální protilátkou s metodou HPLC a našli jsme významně rozdílné hodnoty především u nejvyšších koncentrací cyklosporinu A a také u AUC (9). Poměrně vysoké nadhodnocení

koncentrace cyklosporinu A (53,7 %) a takrolimu (48,1 %) bylo zjištěno i při porovnání chemiluminiscenční metody CMIA a metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí LC-MS/MS (10). Podobně jsme porovnávali výsledky vankomycinu, získané metodou FPIA s monoklonální protilátkou a metodou LC-MS/MS u tří skupiny pacientů, s normální a zvýšenou koncentrací kreatininu a u pacientů na dialýze. Pouze u dialyzovaných pacientů byla metodou FPIA naměřena koncentrace vankomycinu o 13 % vyšší (11).

V tab. 1 je uveden přehled metod a počet stanovení některých léčivých látek na základě údajů z prvního cyklu EHK (Externího hodnocení kvality) RfB (Referenstinstitut für Bioanalytik) pro rok 2019 CS1/19 a AK1/19. Do systému EHK musí být zapojeny všechny akreditované laboratoře s požadovanou četností 2× ročně. Imunoanalytické metody s různým typem detekce zde stále tvoří významný podíl v rutinním TDM.

Fyzikálně-chemické metody

Spektrofotometrie

Spektrofotometrické metody se v analytice léčivých látek příliš nerozšířily, protože jejich použití bylo limitováno jednak časovou náročností a také častým výskytem interferencí se současně podávanými léky nebo endogenními faktory. Např. koncentrace teofylinu měřená spektrofotometricky v UV oblasti byla několikanásobně navýšena u pacientů s kotrimoxazolem jako výsledek interference s jeho složkou sulfametoxazolem, který má podobné absorpční maximum.

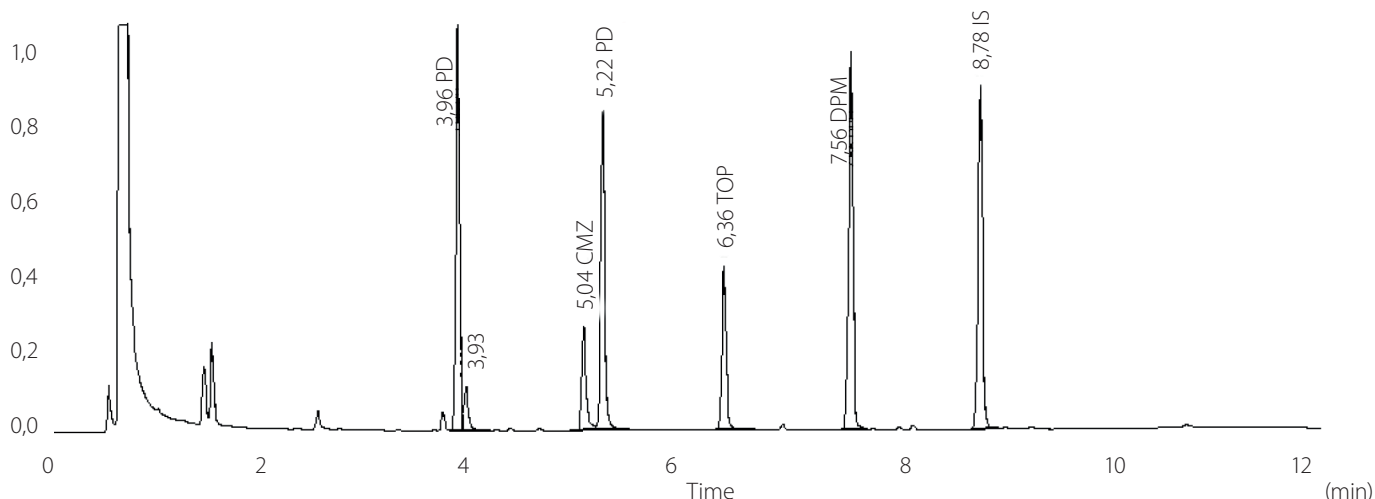
U intoxikací paracetamolem může zase zvýšená koncentrace bilirubinu interferovat při jeho stanovení a ovlivnit kvalitu výsledku. Protože na koncentraci paracetamolu závisí dávkování antidota N-acetylcysteinu, bylo použití této metody při zvýšené koncentraci bilirubinu nevhodné (12).

Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou techniky, které využívají pohyb nabitých částic v elektrickém poli a lze je použít pro detekci nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek. Mezi přednosti těchto metod patří vysoká separační účinnost a nízká spotřeba vzorku i chemikálií, což v konečném důsledku vede ke snížení nákladů na analýzu. Mezi elektromigrační separační metody patří kapilární elektroforéza (CE) a její módy, tj. kapilární zónová elektroforéza (CZE) a nevodná zónová elektroforéza (NACE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), a izotachoforéza (ITP). Běžné postupy přípravy vzorku před vlastní analýzou zahrnují precipitaci proteinů, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci z kapaliny do kapaliny. U některých stanovení lze využít i přímý nástřik vzorku.

CE využívá k dělení látek kapiláru naplněnou základním elektrolytem, který vede proud a následná separace je založena na odlišnosti elektroforetických mobilit iontů v elektrickém poli. Poloha píků určuje kvalitu a plocha nebo výška píků kvantitu analyzované látky. Jedná se o výkonnou separační techniku, která má vysoké rozlišení a podobný separační čas jako HPLC. Podobně je to u NACE, která se provádí v nevodném, především metanolovém prostředí a MEKC, kde se na

Obr. 1. Analýza antiepileptik metodou GLC (V)



Analýza antiepileptik plynovou chromatografií po derivatizaci trimethylfenylamonium hydroxidem s termionickou detekcí. (PB – fenobarbital, CMZ – karbamazepin, PD – primidon, TOP – topiramát, DPD – fenytoin a IS – vnitřní standard)

dělení spolupodílí detergenty např. dodecylsírán sodný. K detekci se používají UV/VIS detektory, elektrochemické a laserem indukované fluorescenční detektory a v poslední době i hmotnostní detektory (13). Citlivá vodivostní detekce se provádí u izotachofórey (ITP) založené na separaci iontů ve stejnosměrném elektrickém poli (14).

I když elektromigrační metody představují standardní analytický přístup, mají omezené rutinnímu použití. Testovaly se pro stanovení antiepileptik, benzodiazepinů, některých psychofarmak, diklofenaku a vybraných beta-blokátorů (13).

Chromatografické metody

Chromatografické metody mají při analýze léčivých látek významné zastoupení. Jednotlivé chromatografické techniky se vyvíjely postupně a vždy ve své době představovaly významný pokrok. Na počátku to byla tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC) a plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC), které dosáhly svůj vrchol ještě před rozšířením kapalinové chromatografie a v současnosti je jejich využití jen okrajové. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s různými typy detekce se začala rozvíjet od šedesátých let minulého století a v současnosti je to především ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) s hmotnostní detekcí (Mass Detection, MS), která se stala zlatým standardem při analýze léčivých látek.

Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie má své stálé místo v toxikologii při identifikaci léčivých látek. Po nanesení analyzované látky a standardu na start destičky pokryté stacionární fází se chromatografická destička vloží do vyvíjecí komory, která obsahuje směs rozpouštědel (mobilní fáze) a ponechá se zde tak dlouho, až rozpouštědlo dosáhne čelo destičky. Po dokonalém vysušení se jednotlivé látky detekují buď pod UV lampou nebo na základě barevné reakce s různými činidly. Hodnota RF (poměr vzdálenosti skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědel od startu) a barevná reakce jsou pro jednotlivé látky charakteristické a dokážou v mnoha případech jednoznačně identifikovat danou toxu i bez použití instrumentální techniky (15).

Plynová chromatografie

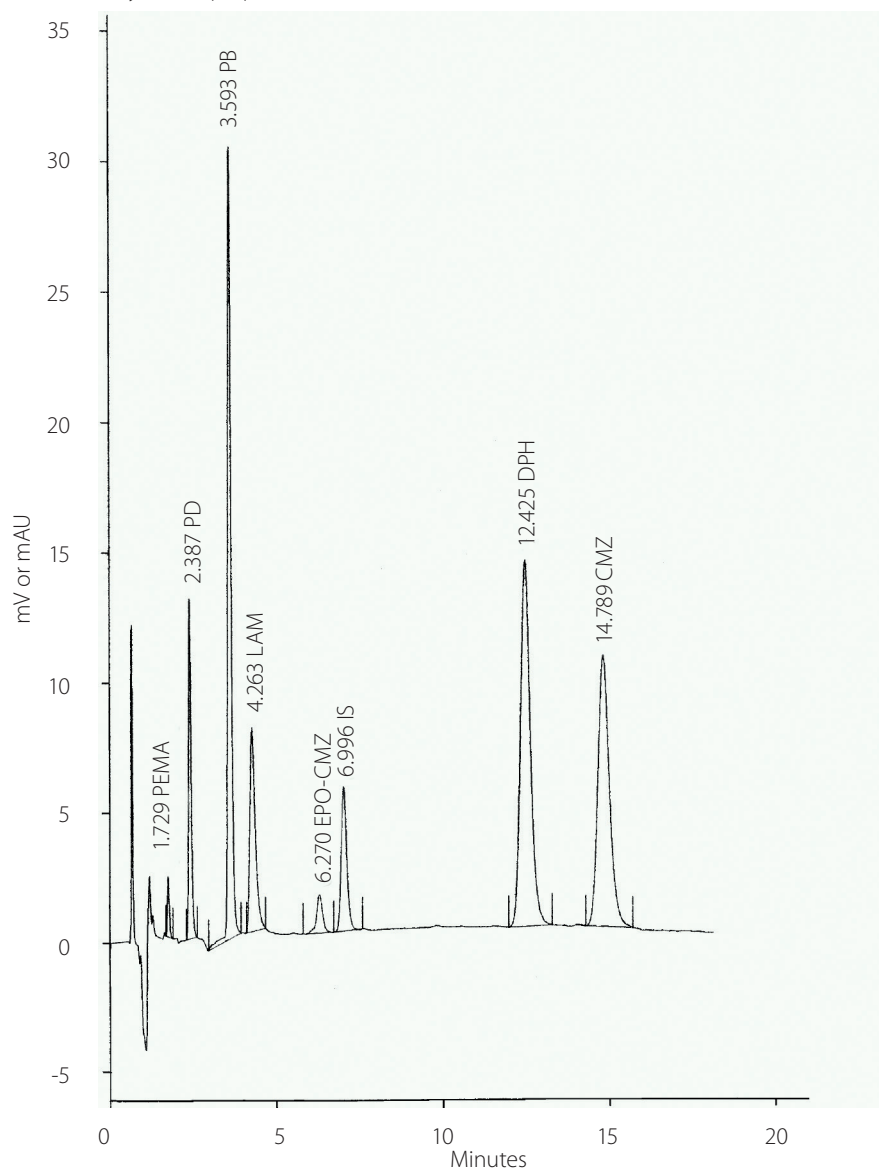
Plynová chromatografie (GC) se při analýze léčiv začala uplatňovat od 60. let minulého století

pro látky, které se daly při vysoké teplotě převést do plynného stavu, popř. tyto vlastnosti získaly chemickou reakcí tzv. derivatizací. Většinou se pracovalo v módu rozdělovací plynové chromatografie (Gas Liquid chromatography, GLC), kde k separaci jednotlivých látek dochází na základě interakcí mezi stacionární fází (tenkou vrstvou kapalné fáze navázanou na nosič) a analytem. Jako mobilní fáze se používají plyny, nejčastěji dusík, helium nebo vodík a detekce se provádí buď plamenově ionizačním detektorem (FID) nebo se používá upravená tryska s navázaným alkalickým kovem AFID nebo termionický detektor, oba se zvýšenou citlivostí na přítomnost dusíku a fosforu. Z počátku se používaly náplňové kolony, což byly skleněné nebo kovové trubice plněné stacionárními fázemi. Později to byly ka-

pilární kolony dlouhé až několik desítek metrů s tenkým filmem stacionární fáze naneseným na vnitřní straně kapilární kolony, které jsou spojené především s hmotnostními detektory.

Metoda GLC se používala hlavně pro stanovení antiepileptik první a druhé generace jako je kyselina valproová, fenytoin, fenobarbital, primidon a karbamazepin, ale dá se použít i pro topiramát, který představuje antiepileptikum třetí generace (16, 17, 18). Pracuje se s náplňovými kolonami se stacionárními fázemi na bázi polysiloxanu nejčastěji OV-17 nebo SE-30 a s dusíkem jako mobilní fází. Kyselina valproová se stanovuje přímo na fázi SP-1000. U ostatních antiepileptik, která jsou tepelně nestálá, se prováděla on column derivatizace za vzniku metylderivátů a jako derivatizační činidlo se používal tetramethylamonium hydroxid nebo

Obr. 2. Analýza antiepileptik metodou HPLC s UV/VIS detekcí



Analýza antiepileptik metodou kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí (PD – primidon, PB – fenobarbital, LAM – lamotrigin, IS – vnitřní standard, DPH – fenytoin, CMZ – karbamazepin a dva aktivní metabolity PEMA – phenethylmalonamid a EPO-CMZ-epoxy-karbamazepin)

trimethylphenylamonium hydroxid. V praxi to probíhalo tak, že po extrakci léčiva do organického rozpouštědla, nejčastěji éteru se éter odpařil, k odparce se přidal roztok derivatizačního činidla a vzorek se aplikoval na kolonu. Reakce pak proběhla přímo při nástřiku za vysoké teploty (16). Na obr. 1 je uveden příklad analýzy antiepileptik.

V současnosti se plynová chromatografie s hmotnostní detekcí používá především při toxikologické analýze. Po nástřiku extraktů z biologického materiálu na kapilární kolonu a následnou separaci se hmotnostní spektra jednotlivých látek porovnávají s knihovnými spektry léčivých látek a dokážou poměrně průkazně identifikovat neznámé léčivo.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti nejrozšířenější chromatografickou metodou. Je to separační technika, která využívá kontinuální opakování rovnovážné distribuce mezi pevnou (stacionární) a kapalnou (mobilní) fází. Mezi základní instrumentální vybavení patří vysokotlaká pumpa se zásobníky na mobilní fázi, dávkovací zařízení spojené většinou s automatickým dávkováním vzorků (autosampler), kolona, detektor a zařízení na záznam a zpracování signálu (chromatografický software a počítač). Pumpy mohou pracovat v izokratickém (stejně složení mobilní fáze) nebo gradientovém módu, kdy dochází v průběhu každé analýzy ke změně složení mobilní fáze ve prospěch organické složky a tím k urychlení separace složitějších směsí látek. Kolony představují kovové trubice nejčastěji o délce mezi 5–25 cm a vnitřním průměrem 1, 2, 1, 3, 4, 6 mm, které jsou plněné sorbenty s velikostí částic 1,7, 2,6, 3, 5, a 7 µm. Na zpracování signálu v eluátu z chromatografické kolony se mohou použít různé typy detekce, podmínkou je, že musí poskytovat odezvu úměrnou koncentraci přítomných látek. Nejčastěji se používají spektrofotometrické UV/VIS detektory, které pracují v oblasti ultrafialového a viditelného spektra (200–600 nm) a hmotnostní detektory na principu trojitěho kvadrupólu. Detektory fluorimetrické nebo elektrochemické se v analýze léků využívají jen okrajově.

Nejprve se v kapalinové chromatografii používaly metody s polárními stacionárními fázemi představované silikagelem a nepolárními mobilními fázemi jako je pentan, hexan, chloroform apod. Tento typ se při analýze léčivých látek příliš neprosadil

a k významnějšímu použití došlo až s rozvojem techniky nepolární stacionární fáze tzv. reverzní fáze, kdy se na hydroxylové skupiny silikagelu navázaly uhlovodíkové řetězce C8 (oktyl) nebo C18 (oktadecyl), popř. fenyl nebo skupiny CN a NH₂, které změnily významně jeho vlastnosti. Zbývající volné OH skupiny, kde už vazba nebyla ze sférických důvodů možná, byly často ještě upraveny např. trimethylmonochlorsilanem tak, aby se zabránilo chvostování separovaných látek. Jako mobilní fáze se pak používá voda, popř. pufr, acetonitril, metanol, tetrahydrofuran a jejich kombinace. Pro zlepšení a zrychlení separace se do mobilních fází přidávají v nízké koncentraci modifikátory jako je triethylamin, octan amonný, mravenčan amonný nebo se upravuje pH (19).

Běžné úpravy biologických vzorků (sérum, plasy, popř. plné krve) před vlastní analýzou zahrnují precipitaci proteinů (PPT) acetonitrem a metanolem, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) za použití organických rozpouštědel jako je éter, chloroform, dichlórmetan a toluen. Po extrakci se organické rozpouštědlo odstraní, odparek se rozpustí ve vodě nebo mobilní fázi a nastříkuje se na kolonu. Protože u většiny extrakčních metod dochází ke ztrátám analyzované látky (extrakční výtěžek bývá ideálně 80–95 %, ale i méně) používají se tzv. vnitřní standardy (internal standard, IS). Jsou to látky strukturálně blízké stanovovaným léčivům s podobnými vlastnostmi, které se přidávají ke vzorku před extrakcí a jsou podrobeny stejným postupům jako stanovovaná látka. U HPLC s UV/VIS detekcí musí být jejich retenční čas odlišný v porovnání s analyzovanými léčivy, u kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) se jako vnitřní standardy často používají stejná léčiva jen izotopově značená např. deuteriem (meropenem a meropenem d6) a jejich retenční čas je totožný. (19, 20)

HPLC s UV/VIS detekcí se používá při analýze léčivých látek ve všech farmakologických skupinách. Jsou to např. antiepileptika včetně farmakologicky aktivních metabolitů, teofylin, kofein, methotrexat, amiodaron a desethyl- amiodaron, benzodiazepiny apod. (21, 22, 23, 24, 25). Příklad analýzy antiepileptik je uveden na obr. 2.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí je založena na separaci a stanovení látek na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z).

Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí - iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul za vzniku pozitivně nebo negativně nabitých iontů. Nejpoužívanějšími iontovými zdroji je elektrosprej (ESI) a chemické ionizace (APCI). V analyzátoru dochází k separaci iontů ve vakuu na základě poměru jejich hmotnosti a náboje a do detektoru jsou propouštěny jen ty, která mají odpovídající hodnotu m/z daného skenovacího režimu. V detektoru se měří změna signálu např. měřením změny elektrického proudu. Při analýze léčiv se nejčastěji používají trojitě kvadrupóly (tandemová hmotnostní spektrometrie, (MS/MS), které jsou vysoce citlivé a specifické. Tyto přístroje jsou složeny ze dvou kvadrupólů, které pracují jako hmotnostní analyzátoři. Třetí kvadrupól uložený mezi nimi slouží jako kolizní cela, kde za přítomnosti inertního plynu, nejčastěji argonu dochází k fragmentaci stanovované látky. Každá látka je pak charakterizována prekurzorovým (parentním) iontem a specifickými produktovými (dceřinými) ionty a na základě těchto údajů pak může být velmi přesně a specificky kvantifikována. Vzhledem k tomuto způsobu kvantifikace nemusí být jednotlivé látky na rozdíl od HPLC s UV/VIS detekcí zcela separovány, což urychluje analýzu složitějších směsí (26). Nutno ale mít na paměti, že pokud tato léčiva existují v organismu nejen volná ale i ve formě glukuronidů (např. kyselina mykofenolová) nebo sulfátů (např. cyklosporin A) musí se obě složky chromatograficky oddělit, jinak by došlo k falešnému navýšení koncentrace měřeného léčiva (27). Příklad analýzy kyseliny mykofenolové je uveden na obr. 3.

Hmotnostní průletové spektrometrie (Time of Flight, TOF) s vysokým rozlišením se ve spojení s kapalinovou chromatografií používají v toxikologii a v metabolomice při studiu metabolitů léčivých látek (26).

K úpravě vzorků krve, séra nebo plazmy se u hmotnostní detekce nejčastěji používá precipitace metanolem nebo acetonitrem, popř. jejich kombinace a také se přidává síran zinečnatý nebo jiná aditiva pro zvýšení účinnosti (28). Protože precipitace úplně neodstraní příměsi doprovodných složek přítomných v biologických vzorcích jako jsou endogenní fosfolipidy nebo aditiva heparin a EDTA, musí se tyto extrakty testovat na tzv. maticový efekt (29, 30). Ten se zjistí porovnáním plochy píku stanovované látky bez a po přidání

extraktu matrice (séra popř. krve) a rozdíl by neměl být vyšší než $\pm 15\%$. V opačném případě by mohlo dojít k významnému ovlivnění výsledku analýzy. Matricový efekt se dá snížit několika způsoby: používat co nejmenšího množství aditiv přítomných v odběrových systémech (pokud je to možné pracovat se vzorky séra), používat izotopově značené vnitřní standardy, které eluují ve stejném retenčním čase jako analyzovaná látka a pracovat v nízkých koncentracích, kde jsou matricové efekty významně nižší (31).

Metoda LC-MS/MS se používá při stanovení léčivých látek a jejich aktivních metabolitů ze všech farmakologických skupin. Jsou to především antiepileptika, psychofarmaka, imunosupresiva, antihypertenziva, antimykotika, antivirotika a antibiotika (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 20). Hmotností detekce umožnila přímo stanovovat i takové látky, které ve své molekule nemají chromofory, což jsou skupiny atomů, které umožňují absorpci světla. Tyto látky se při měření metodou HPLC s UV/VIS detekcí musely nejprve převést na barevné produkty chemickou reakcí tzv. derivatizací, což bylo časově náročné a nevhodné pro rutinní použití (40). Mezi takové látky patří např. topiramát, gabapentin a vigabatrin ze skupiny antiepileptik a celá skupina aminoglykosidových antibiotik, jako je amikacin, gentamicin a tobramycin, pro které se dříve výlučně používaly imunoanalytické metody. Ty se většinou vyvíjely v době, kdy se aminoglykosidová antibiotika podávala 3x denně v nižších dávkách s dosažením nižších vrcholových koncentrací, než je tomu u současného podávání jednou denně. Tato skutečnost často vede k vysokým píkovým koncentracím antibiotik, které se nacházejí nad rozsahem kalibračních křivek komerčních imunoanalytických metod, a proto se musí tyto vzorky často ředit a měření opakovat. LC-MS/MS má výhodu v nastavení optimálních podmínek analýzy např. rozsahu kalibračních křivek a umožňuje celkově nižší náklady na analýzu při zachování podobné průchodnosti vzorků (41).

Validace chromatografických metod

Chromatografické metody se většinou vyvíjejí individuálně pro jednu nebo více léčivých látek z dané farmakologické skupiny vždy na základě požadavků z klinických pracovišť.

Označují se jako „home made“ metody a musí se před zavedením do rutinní praxe validovat podle FDA (Food and drug administration) kritérií. Mezi požadované validační parametry patří linearita, opakovatelnost, mezilehlá preciznost, kvantifikační a detekční limit. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost se stanoví na základě měření 10 vzorků připravených nejméně ze tří různých koncentračních hladin a měřených buď během jednoho dne (opakovatelnost) nebo v průběhu několika následujících dnů (mezilehlá preciznost). Variační koeficienty (VK) musí být do $\pm 15\%$ a jednotlivé koncentrace látek se musí pohybovat mezi 85–115 % nominální hodnoty. Pracovní rozsah měření je dán lineární závislostí mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační křivky. Kvantifikační limit je nejnižší koncentrace (obvykle nejnižší bod kalibrační křivky), která se dá měřit s akceptovatelnou chybou s VK do $\pm 20\%$ a koncentrací mezi 80–120 % nominální hodnoty. Kvantifikační limit a detekční limit se dají odečíst i z chromatografického záznamu porovnáním s rozkmitem nulové linie jako 10S (kvantifikační limit) a 3S (detekční limit). Součástí validace je testování selektivity a robustnosti chromatografických podmínek a u metod s hmotnostní detekcí se testují matricové efekty vždy cíleně pro

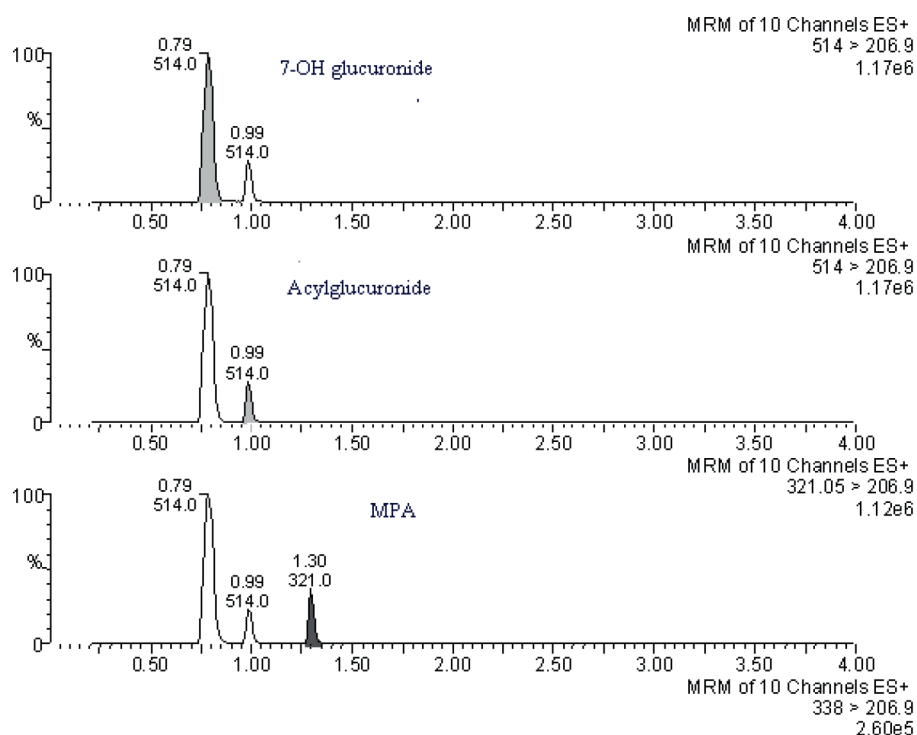
daný typ matrice jako je sérum, plasma, likvor nebo např. mateřské mléko. V rámci validace se zjišťuje stabilita jednotlivých analytů a tyto poznatky se využívají při transportu vzorků a během celé preanalytické fáze (42, 43).

HPLC i LC-MS/MS metody jsou v současnosti dostupné i ve formě komerčně dodávaných diagnostických souprav, které osahují vše potřebné k provedení analýzy, jako jsou kolony, standardy, mobilní fáze a pracovní postupy. Pracoviště musí být vybavena pouze vhodnou instrumentální technikou. Takovéto metody, podobně jako ostatní komerčně dostupné metody jsou plně validovány výrobcem a jejich diagnostické soupravy bývají označeny značkou CE.

Závěr

Z celé škály analytických metod se v TDM nejčastěji používají metody imunoanalytické a metody kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí nebo s hmotnostní detekcí, která se stala zlatým standardem při analýze léčivých látek. Imunoanalytické metody se používají především pro TDM dále monitorovaných látek jako je digoxin, aminoglykosidová antibiotika, vankomycin, teofylin a antiepileptika první a druhé generace. U antiepileptik se poprvé začaly používat chromatografické metody, které

Obr. 3. Analýza kyseliny mykofenolové a jejich metabolitů metodou LC-MS/MS



Chromatogram kyseliny mykofenolové a jejich dvou metabolitů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. 7-OH glukuronid (RT 0,79), acylglukuronid (RT 0,99), MPA – kyselina mykofenolová (RT 1,30)

umožnily stanovit více látek různých generací i farmakologicky aktivních metabolitů v jedné analýze. Pro analýzu imunosupresiv, především cyklosporinu A a takrolimu bylo vyvinuto množství imunoanalytických metod od RIA, EMIT, FPIA a CMLA, ale žádná z těchto metod nedokázala

úplně eliminovat možnost zkřížených reakcí s metabolity a tím nadhodnocení parentní látky. Proto dochází k jejich postupnému nahrazování metodami chromatografickými. U sirolimu a everolimu, které se jako imunosupresiva začaly používat později, už nabídka imunoanalýz ne-

byla tak široká, a proto se především používají metody LC-MS/MS. Tyto metody se využívají i pro všechny další farmakologické skupiny, které se začaly monitorovat později, jako jsou psychofarmaka, beta-laktamová antibiotika, antivirotika, antihypertenziva a antimykotika.

LITERATURA

1. Grundmann M, Kacířová I. Význam TDM, fenotypizace a genotypizace pro správné dávkování léčiv. Čas Lék Čes 2010; 149: 482–487.
2. Wong G, Briscoe S, Adnan S, et al. Protein binding of β -lactame antibiotics in critically ill patients: Can we successfully predict unbound concentration? Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 6165–6170.
3. Yalow RS, Berson SA. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. Nature 1959; 184: 1648–1649
4. Doležalová V, a kol. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno 1995 ISBN 80-7013-198-5.
5. Štern P. Pokroky v imunoanalýzách s luminiscenční elektrochemickou detekcí. Klin Biochem Metab 2016; 24(45): 120–126.
6. Najjar TA, Al-Dhuhailie AA, Tekle A. Comparison of high-performance liquid chromatography with fluorescence polarization immunoassay for the analysis of vancomycin in patients with chronic renal failure. J Chromatogr B 1995; 672: 295–299.
7. Safarčík K, Brozmanová H, Bartoš V, Jegorov A, Grundmann M. Evaluation and comparison of therapeutic monitoring of whole-blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods. Clin Chim Acta 2001; 310: 165–171.
8. Soldin SJ, Steele BW, Witte DL, Wang E, Elin RJ. Lack of specificity of cyclosporine immunoassays. Arch Pathol Lab Med 2003; 127: 19–22.
9. Grundmann M, Peřinová I, Brozmanová H, Kořistková B, Šafarčík K. Significant discrepancy in cyclosporin A post-dose concentrations when analyzed with specific RIA and HPLC method. Int J Clin Pharmacol Ther 2010; 48: 87–92.
10. Mei S, Wang J, Chen D, et al. Simultaneous determination of cyclosporine and tacrolimus in human whole blood by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and comparison with a chemiluminescence micro-particle immunoassay. J Chromatogr B 2018; 1087–1088: 36–42.
11. Brozmanová H, Kacířová I, Uřinová R, Šišťák P, Grundmann M. New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal function and comparison with results of polarization fluorimetric immunoassay in light of varying creatinine concentrations. Clin. Chim. Acta 2017; 469: 136–143.
12. Wiener K. A review of methods for plasma paracetamol estimation. Ann Clin Biochem 1978; 15: 187–196.
13. Pavlíková L, Brozmanová H, Kvasnička F, Grundmann M. Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. Klin Farmakol Farm 2007; 21(2): 79–83.
14. Budáková L, Brozmanová H, Kvasnička F, Grundmann M. Stanovení kyseliny valproové pomocí on-line spojení izota-chografie a kapilární zónové elektroforézy s vodivostní detekcí. Čes slov Farm 2007; 56: 249–253.
15. Večerková J. Postupy zachytu a identifikace léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
16. Dudley KH, Bius DL, Kraus BL, Boyles LW. Gas Chromato-

- graphic on-column methylation technique for the simultaneous determination of antiepileptic drugs in blood. Epilepsia 1977; 18(2): 259–286.
17. Kacířová I, Grundmann M, Brozmanová H, Serum levels of valproic acid during delivery in mothers and in umbilical cord – correlation with birth length and weight Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015; 159(4): 569–575.
18. Malakova J, Brozmanova H, Vorisek V, Prochazkova V, Palicka V. A capillary GC method using nitrogen phosphorus detection for determination of topiramate in patients with epilepsy. Chromatographia 2007; 66: 363–367.
19. Novakova L, Douša M, a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, Praha 2013 ISBN 978–80.260.42443-3.
20. Rigo-Bonnin R, Ribera A, Arbiol-Roca, et al. Development and validation of a measurement procedure based on ultra-high performance chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of β -lactam antibiotic concentration in human plasma. Clin Chim Acta 2017; 468: 215–224.
21. Budakova L, Brozmanova H, Grundmann M, Fischer J. Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their two active metabolites by HPLC. J Sep Sci 2008; 31(1): 1–8.
22. Schreiber-Deturmeny E, Bruguerolle B. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and theophylline for routine drug monitoring in human plasma. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl 1996; 677(2): 305–312.
23. Albertoni F, Rask C, Eksborg S, et al. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma Clin Chem 1996; 42: 139–144.
24. Rodrigues M, Alves G, Rocha M, Queiroz J, Falcão A. First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure. J Chromatogr B 2013; 913–9: 90–97.
25. Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. Separation and HPLC analysis of 15 benzodiazepines in human plasma. J Sep Sci 2008; 31(4): 2619–2626.
26. Herbert GC, Johnstone RAW. Mass spectrometry basics. CRC Press 2003, ISBN 0–8493–1354–6.
27. Streit F, 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(1): 152–159.
28. Brozmanová H, Peřinová I, Halvová P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three primary metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients. J Sep Sci 2010; 33(15): 2287–2293.
29. Van Eckhout A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assay: evaluation of matrix effects. J Chromatogr B 2009; 877: 2198–2207.
30. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effect on an LC-MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. J Pharm Biomed Anal 2004; 35: 1149–1167.
31. Fan Y, Peng X, Yu J, et al. An ultra-performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference. Bioanalysis 2019; 11(10): 941–955.
32. Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsurama T, Yano I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. Biomed Chromatogr 2012; 26(12): 1519–1528.
33. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. Pharmacopsychiatry 2011; 44(6): 195–235.
34. Uřinová R, Brozmanová H, Šišťák P, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2012; 907(15): 101–107.
35. Sistik P, Uřinová R, Brozmanová H, Kacířová I, Silhan P, Lemr K. Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication. Biomed Chromatogr 2016; 30(2): 217–224.
36. Pohanka A, Rosenborg S, Lindh JD, Beck O. Experiences from using LC-MS/MS for analysis of immunosuppressive drugs in a TDM service. Clin Biochem 2016; 49(13–14): 1024–1031.
37. Gunderon POM, Helland A, Spigset O, Hegstad S. Quantification of 21 antihypertensive drugs in serum using UHPLC-MS/MS. J Chromatogr B 2017; 1089: 84–94.
38. Xiao Y, Kang Xu Y, Pattengale P, O’Gorman M, Fu X. A rapid high-performance LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of voriconazole, posaconazole, fluconazole, and itraconazole in human serum. J Applied Lab Med 2017; 1(6): 626–636.
39. Quaranta S, Woloch Ch, Paccou A, Giocanti M, Solas C, Lacarelle B. Validation of an electrospray ionization LC-MS/MS method for quantitative analysis of raltegravir, etravirine, and 9 other antiretroviral agents in human plasma samples. Ther Drug Monit 2009; 31(6): 695–702.
40. Vermeij TAC, Edelbroek PM. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. J Chromatogr B 2004; 810(2): 297–230.
41. Bijleveld Y, de Haan T, Toersche J, et al. A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. J Chromatogr B 2014; 951–952: 110–118.
42. US Food and drug administration Guidance for industry. Bioanalytical method validation US department of health and human services, Food and drug administration, 2001.
43. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM), 2018.