



Stanovení hladin léčiv a terapeutické monitorování léčiv

Doc. MUDr. Petr Schneiderka CSc.

Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF UP a FZV UP v Olomouci

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0313

Úvod

- Terapeutické monitorování léčiv (therapeutic drug monitoring, TDM) je soubor postupů určených k optimalizaci konkrétní farmakoterapie konkrétního nemocného.
- Skládá se z **cyklu** stanovení koncentrace (“hladiny”) léčiva v biologickém materiálu, provedení farmakokinetické analýzy a interpretace nálezu, návrhu vhodného dávkovacího schématu, jeho aplikace a opakovaného stanovení koncentrace léčiva.

Cíle TDM

- TDM má smysl provádět pouze u těch léčiv, která se vyznačují úzkým terapeutickým indexem, těsným vztahem mezi koncentrací a účinkem, nelineární kinetikou a u léčiv, jejichž účinek není klinicky měřitelný a kvantifikovatelný.
- Monitoruje se také léčba takovými léčivy, u nichž je všeobecně známa velká interindividuální variabilita v procesech absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace z organismu nemocného.

Indikace TDM

- K indikacím TDM náleží

- nedostatečná terapeutická odpověď,
- výskyt nežádoucích vedlejších nebo toxických účinků léčiva,
- podezření na lékové interference,
- zahájení nebo změna terapie
- a ověření, že bylo dosaženo terapeutické koncentrace léčiva (v cirkulaci).

Co je TDM

- Za TDM nelze považovat samotné stanovení koncentrace léčiva v biologickém materiálu a k interpretaci nestačí pouhá číselná hodnota nebo srovnání číselných hodnot několika laboratorních vyšetření.
- Cílem je farmakokinetická analýza, která pomocí matematického zpracování laboratorních výsledků a výpočtu individuálních farmakokinetických parametrů pacienta určí dávkovací režimy vhodné pro dosažení terapeutických koncentrací („hladin“) léčiv.

Zpracování TDM

- Nezbytnými předpoklady jsou znalosti klinických údajů o dotyčném pacientovi a přesné informace o dávkování léčiva, době podání poslední dávky a době a způsobu odběru biologického materiálu (krve) pro analýzu.
- K výpočtu slouží různé počítačové programy založené na Bayesianské statistické metodě, např. farmakokinetický program MW-Pharm (Mediware, Groningen, Holandsko).

Charakter TDM

- TDM má typicky interdisciplinární charakter. Zatímco stanovení koncentrací léčiv se provádí téměř výlučně v laboratořích klinické biochemie, interpretace a využití farmakokinetických programů je v rukou klinických farmakologů nebo jiných příslušně kvalifikovaných odborníků a za vedení léčby pacienta odpovídá ošetřující lékař.
- TDM proto vyžaduje účinnou mezioborovou spolupráci.

Metody pro stanovení léčiv

- Pro účely stanovení léčiv v biologických materiálech jsou k dispozici metody **imunochemické** (imunoanalytické) a metody **chromatografické**. U nás byly pro tento účel oba typy metod používány paralelně už od 80. let minulého století.
- Imunoanalytické metody stanovení léčiv jsou v praxi rutinních klinických laboratoří stále velmi rozšířené a oblíbené pro svoji automatizovatelnost a možnost analýzy velkých sérií vzorků.

Imunochemické metody

- Soupravy činidel i přístrojovou techniku (automatické analyzátoři) pro imunochemické metody dodnes vyrábí řada světových firem.
- Nevýhodou imunochemických metod je výskyt nespecifických reakcí a nemožnost identifikovat metabolity léčiv.
- Bližší podrobnosti o těchto metodách jsou zmíněny v tématu **Imunochemie**.

Chromatografické metody - historie

- Mezi chromatografickými technikami pro analýzu léčiv převažovala nejprve tenkovrstevná chromatografie (TLC, viz Večerková J., 1983) a klasická kapalinová chromatografie.
- Koncem 20. století se začala uplatňovat vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), obvykle ve spojení s UV nebo fluorescenční detekcí.
- Menší podíl měla plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie s různými typy detekce.

Chromatografické metody - současnost

- Hmotnostní spektrometrie ve spojení s chromatografií se koncem 20. století teprve začínala rozvíjet.
- Poměry se však v průběhu posledních let dramaticky změnily ve prospěch vysoce účinné nebo ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS nebo UHPLC/MS), zatímco zastoupení všech ostatních jmenovaných metod výrazně pokleslo.

Tenkovrstevná chromatografie (1)

- Název chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography, TLC) vychází z toho, že materiál stacionární fáze je rovnoměrně rozprostřen na pevné podložce (sklo, plastická nebo hliníková folie).
- Může tam být různým způsobem navrstven („sypané vrstvy“) nebo vhodným pojidlem přitmělen („tmelené vrstvy“).
- Na označená místa startu se pipetou nanášejí vzorky. Celá deska se potom šikmo svisle vloží do kyvety obsahující na dně mobilní fázi, která tenkou vrstvou vzlíná vzhůru a unáší s sebou složky dělené směsi (vyvíjení chromatogramu).

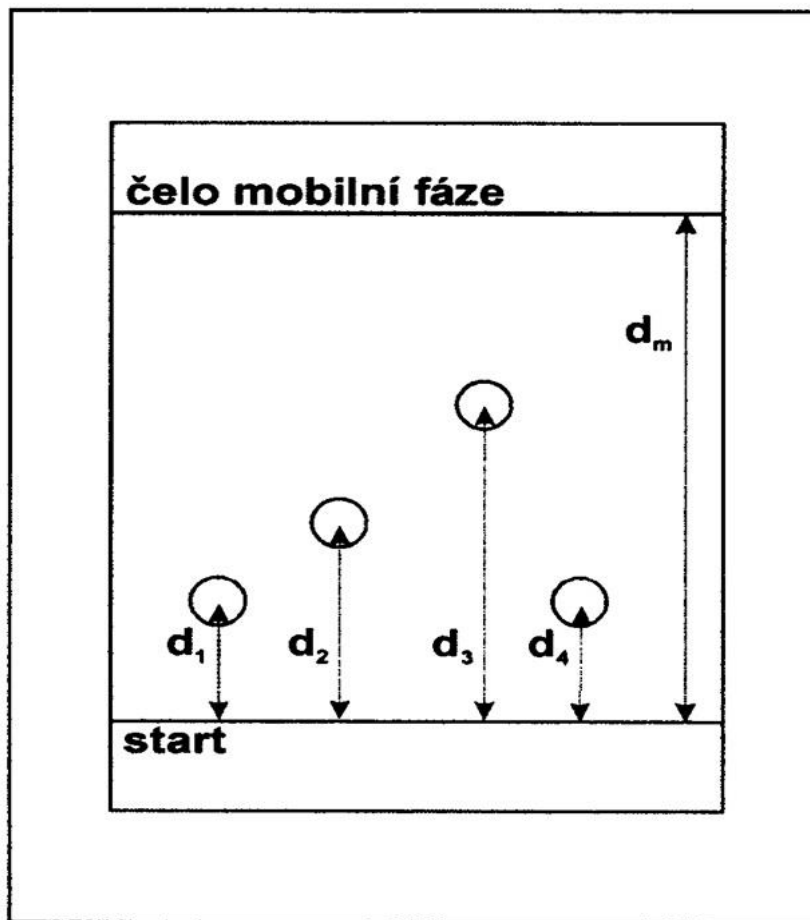
Tenkovrstevná chromatografie (2)

- Materiály pro přípravu tenkých vrstev bývají (ve vazbě na použité principy dělení) např. mikrokrystalická celulóza, silikagel, oxid hlinitý nebo dextranové gely.
- Většina materiálů pro TLC se dnes komerčně vyrábí a hotově dodává do laboratoří. Chromatografické principy využívané při TLC jsou shodné s těmi, které jsou popsány dále (**tab. 1**).
- Po skončení dělení se tenká vrstva usuší a rozdělené frakce se detekují a hodnotí. Detekce může být *barevná*, tvoří-li složky po postříkání vhodným činidlem barevnou reakci, nebo *fluorescenční* po ozáření chromatogramu UV světlem.

Hodnocení tenkovrstevné chromatografie

- Hodnotí se především poloha skvrn, tj. délka dráhy, resp. poměr délky dráhy skvrny k délce dráhy čela rozpouštědel od startu ve srovnání s příslušnými standardy, které byly na stejnou desku naneseny a děleny současně (**obr. 1**).
- Barevné skvrny lze hodnotit také kvantitativně denzitometricky nebo po vystříhnutí/vyškrábání a eluci barviva fotometricky
- Tenkovrstevná chromatografie se dodnes využívá jako rychlá a poměrně nenáročná metoda sloužící k analýze a kontrole léčiv a především ke screeningu zneužívaných drog.

Obr. 1. Tenkovrstevný chromatogram



Kapalinová chromatografie

- Kapalinová chromatografie je metoda dělení látek v trubici (sloupci, koloně, nejčastěji skleněné nebo plastové) naplněné pevným materiálem (nepohyblivá, stacionární fáze), jímž protéká kapalina (pohyblivá, mobilní fáze).
- **Klasická kapalinová chromatografie** se používá pro analytické účely kolony o průměru jeden a více centimetrů s délkou deseti- až dvacetinásobnou.
- Existují však i mikrokolony s menšími rozměry.

Charakteristika fází v kolonách (1)

- Náplň kolon bývá materiál s částicemi o průměru řádově 10^{-1} mm. Pro různé účely se používá specifických druhů náplní a odpovídajících principů dělení (**tab.1**).
- Stacionární fázi pro adsorpční chromatografii bývá oxid křemičitý, který je polární a kyselý nebo oxid hlinitý, který je polární a bazický.
- Mobilní fázi pro adsorpční chromatografii bývají podle nárůstu eluční síly pentan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol a voda.

Charakteristika fází v kolonách (2)

- Stacionární fáze pro rozdělovací chromatografii mohou být mechanicky nanesené na inertním nosiči (ethylenglykol nebo skvalan na silikagelu) nebo chemicky vázané (zakotvené) na inertním nosiči, tj. např. silikagelu.
- Mobilní fáze pro rozdělovací chromatografii s „normálními“ fázemi, tedy stacionární fází polární a mobilní fází nepolární, bývají nejčastěji látky jako pentan, heptan, chloroform a jejich směsi.

Tab. 1. Chromatografické principy a typy materiálu pevné fáze (Upraveno podle V. Doležalové 1995)

Princip chromatografie	Druh náplně
Adsorpční	Adsorbent: Al_2O_3 , MgO , CaO , H_2SiO_3 , MgCO_3 , CaCO_3 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, aktivní uhlí
Rozdělovací	Kapalina, např. polyethylenglykol, zakotvená na pevném nosiči
Iontoměničová (ionexová)	Iontoměnič: hlinitoalkalické křemičitany nebo syntetické pryskyřice nesoucí vyměnitelné skupiny $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, apod.
Gelová (dělení podle velikosti molekuly)	Gel: dextran, agaróza, polyakrylamid
Afinitní	Pevný nosič (např. agaróza) s navázaným ligandem: pro bílkovinu to může být specifická protilátka, pro enzym substrát, apod.

Další typy chromatografií

- Pro chromatografii s obrácenými (reverzními) fázemi (RP-HPLC), čili stacionární fází nepolární a mobilní fází polární se používají methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi.
- Pro analýzu léčiv v biologickém materiálu se využívala zejména iontomeničová a afinitní kapalinová chromatografie.

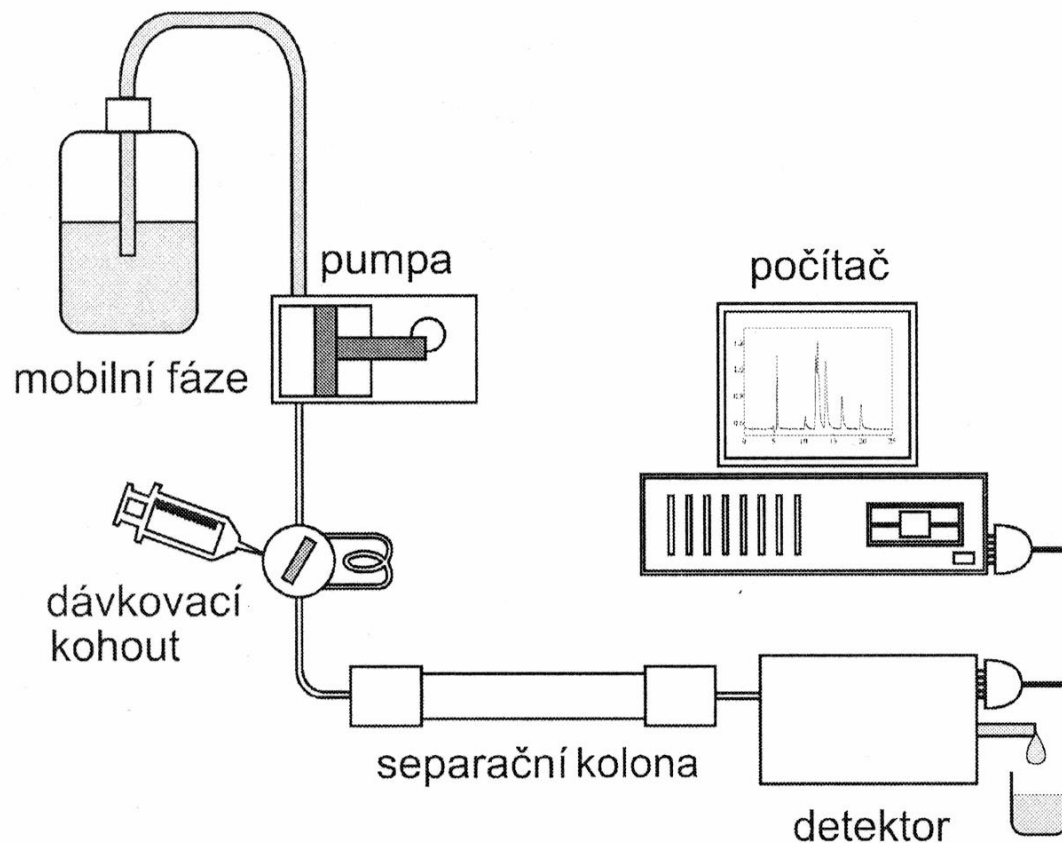
Eluce

- Kapalina opouštějící chromatografickou kolonu (eluát) se buď:
 - zachycuje do zkumavek (jímání frakcí) a v nich se detekují a stanovují sledované látky
 - nebo protéká vhodným detektorem obvykle spojeným se záznamovým a vyhodnocovacím zařízením (kontinuální analýza).

Detektory

- Detektory mohou být podle vlastností a povahy dělených látek:
 - **spektrofotometrické** pro měření absorpance ve viditelné nebo ultrafialové oblasti,
 - **fluorimetrické** pro měření fluorescence,
 - **polarimetrické** pro měření optické otáčivosti,
 - **refraktometrické** pro měření indexu lomu,
 - **konduktometrické** pro měření vodivosti,
 - **potenciometrické** pro měření pH,
 - **imunochemické**, apod.

Obr. 2. Schéma uspořádání HPLC



Vysoce účinná kapalinová chromatografie (1)

- Zařízení pro vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (high performance liquid chromatography, HPLC) se skládá z rezervoáru mobilní fáze, pumpy, dávkovacího mechanismu, dělicí kolony, detektoru a záznamového a výpočetního systému (viz. obr. 2).
- Na rozdíl od klasické kapalinové chromatografie se zde používají tenké kolony o průměru několika milimetrů, které jsou plněny jemnějším materiálem s velikostí částic řádově v mikrometrech.

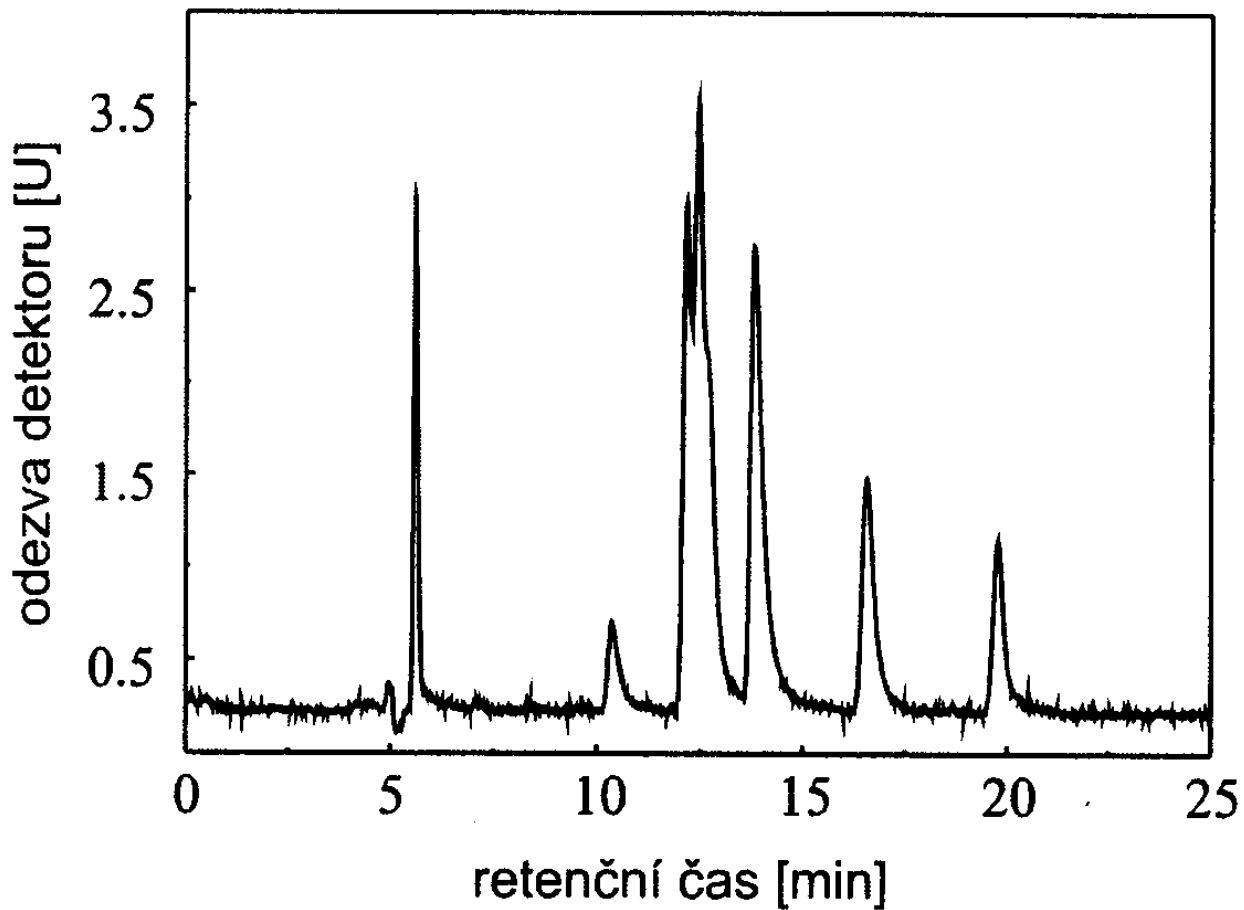
Vysoce účinná kapalinová chromatografie (2)

- Průtok mobilní fáze zajišťuje tlakové čerpadlo (tlak až 30 MPa). Integrální součástí tohoto typu chromatografů je detektorová část jak je popsána výše. Jedním z typů detektorů může být hmotnostní spektrometr (MS).
- Využívají se principy adsorpční, rozdělovací a iontoměničové chromatografie a dělení podle relativní molekulové hmotnosti.
- Tomu odpovídají i materiály stacionární fáze (tab. 1) s výjimkou gelů, které by se vyšším tlakem deformovaly.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (3)

- Výsledný grafický záznam chromatografie zachycuje odezvu detektoru proti retenčnímu času, který je při stejném experimentálním uspořádání pro danou látku charakteristický (viz obr. 3).

Obr. 3. Příklad chromatografického záznamu HPLC



Plynová chromatografie (1)

- Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je metoda pro dělení směsi látek podle rozdílné teploty varu a různého rozdělovacího koeficientu.
- Název vychází ze skutečnosti, že pohyblivou fází je v této analytické metodě plyn.
- Rozdělované látky je třeba zahřáním převést do plynného stavu.

Plynová chromatografie (2)

- Vzorky v pevném skupenství se před analýzou nejprve rozpouštějí v těkavých kapalinách, vzorky s vysokou teplotou varu se derivatizují, tj. převádí na deriváty s nižší teplotou varu.
- Pro dělení těkavých vzorků se používá metoda analýzy rovnovážné plynné fáze (head space).
- Při ní se definované množství vzorku zahřívá v uzavřené nádobce, těkavá složka přejde do plynné fáze, a ta se použije k analýze. Vzorek se na kolonu aplikuje nástřikem.

Plynová chromatografie (3)

- Příklad, plynový chromatograf, se skládá ze:
 - zdroje nosného plynu,
 - chromatografické kolony v temperované skříni,
 - aplikační mechaniky,
 - detektoru
 - a záznamového (vyhodnocovacího) zařízení.
- Nosným plynem bývá (v závislosti na detekčním principu) dusík, vodík, oxid uhličitý, helium, argon, apod.

Plynová chromatografie (4)

- Kolony jsou dlouhé skleněné nebo kovové trubice naplněné podle druhu plynové chromatografie různými pevnými materiály (viz dále).
- Kapilární kolony, které jsou často desítky metrů dlouhé, bývají svinuty do spirály.
- Dělení směsi látek může probíhat na principu adsorpční plynové chromatografie nebo rozdělovací plynové chromatografie.

Adsorpční plynová chromatografie

- Adsorpční plynová chromatografie používá soustavu plyn-pevná látka.
- Pohyblivou (mobilní) fází je nosný plyn, např. dusík, a pevnou (stacionární) fází je adsorbent, jímž je naplněna chromatografická kolona, nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, apod.
- Látky obsažené v analyzovaném vzorku se nejprve váží na sorbent podle velikosti své sorpční energie a potom jsou postupně vymývány průchodem nosného plynu.

Rozdělovací plynová chromatografie (1)

- Rozdělovací plynová chromatografie pracuje se systémem plyn-kapalina. Mobilní fází je plyn, stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči, např. křemelině.
- Látky z analyzované směsi se dělí podle svého rozdělovacího koeficientu mezi oběma fázemi.
- Nejčastěji používaným detektorem v plynové chromatografii je plamenový ionizační detektor. Měří ionizační proud, jenž je úměrný koncentraci stanovované látky.

Rozdělovací plynová chromatografie (2)

- Kromě to existuje řada dalších specifických detektorů, např.
 - teplotně-vodivostní detektor,
 - alkalický ionizační dusíkový detektor,
 - detektor elektronového záchytu,
 - apod.
- Zvláštním druhem detekce jednotlivých složek chromatograficky rozdělené směsi je použití hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrometrie (1)

- Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je metoda, která odděluje a měří elektricky nabitě částice (ionty) na základě poměru jejich hmotnosti a náboje.
- Je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu.
- Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří částí:
 - zdroje ionizace,
 - analyzátoru a
 - detektoru částic.

Hmotnostní spektrometrie (2)

- V **iontovém zdroji** přístroje se molekuly dostávají do ionizovaného stavu, tj. vznikají pozitivně nebo negativně nabitě ionty molekulové (M^+ , M^-), adduktové (např. $[M-H]^-$, $[M+NH_4]^+$) nebo ionizované fragmenty původní molekuly.
- Ionizace se dosahuje různými způsoby. Elektronová ionizace (EI) spočívá v předávání energie letících elektronů molekulám analytu.

Hmotnostní spektrometrie (3)

- Výsledkem ionizace je nejčastěji kladně nabitý zbytek molekuly, který vykazuje bohaté fragmentační spektrum.
- V technice elektrospreje (electrospray ionisation, ESI) dochází k ionizaci vlivem vysokého napětí, v technice APPI vlivem UV záření, v technice MALDI vlivem laserové desorpce z povrchu pevné matrice, apod. (obr. 4).

Hmotnostní spektrometrie (4)

- Klíčovou částí hmotnostního spektrometru je tzv. **analyzátor**, v němž probíhá separace iontů ve vakuu na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z).
- Existuje několik druhů analyzátorů, ale na tomto místě se zmíníme pouze o kvadrupólových analyzátorech.
- **Kvadrupólové analyzátory** patří mezi skenující analyzátory, které kontinuálně v čase separují a k detektoru vysílají pouze ionty s určitou hodnotou m/z .

Hmotnostní spektrometrie (5)

- Kvadrupól je rezonanční komora obsahující 4 kovové tyče, na něž se přivádí kombinace střídavého a stejnosměrného napětí.
- Ionty s určitou hodnotou m/z prolétají tímto zařízením po stabilní trajektorii buď k dalšímu analyzátoru nebo k detektoru (podle konstrukce), zatímco ostatní ionty narazí na tyče nebo na stěny vakuové komory a jsou neutralizovány.

Hmotnostní spektrometrie (6)

- Ionty, které hmotnostní analyzátor vybere, jsou zaznamenány **detektorem** a signál je převeden do digitálního formátu.
- Existují dva typy detektorů, které jsou oba založeny na přímém měření elektrického proudu vznikajícího při srážce iontu s dynodou.

Hmotnostní spektrometrie (7)

- První z detektorů zaznamenává všechny ionty bez ohledu na velikost m/z .
- Druhý typ detektorů registruje ionty ve vztahu k hodnotě m/z .
- V závěru vyhodnocovací software zpracuje a graficky znázorní závislost relativní četnosti iontů (osa y) na poměru hmotnosti (m) a náboje (z) (osa x).

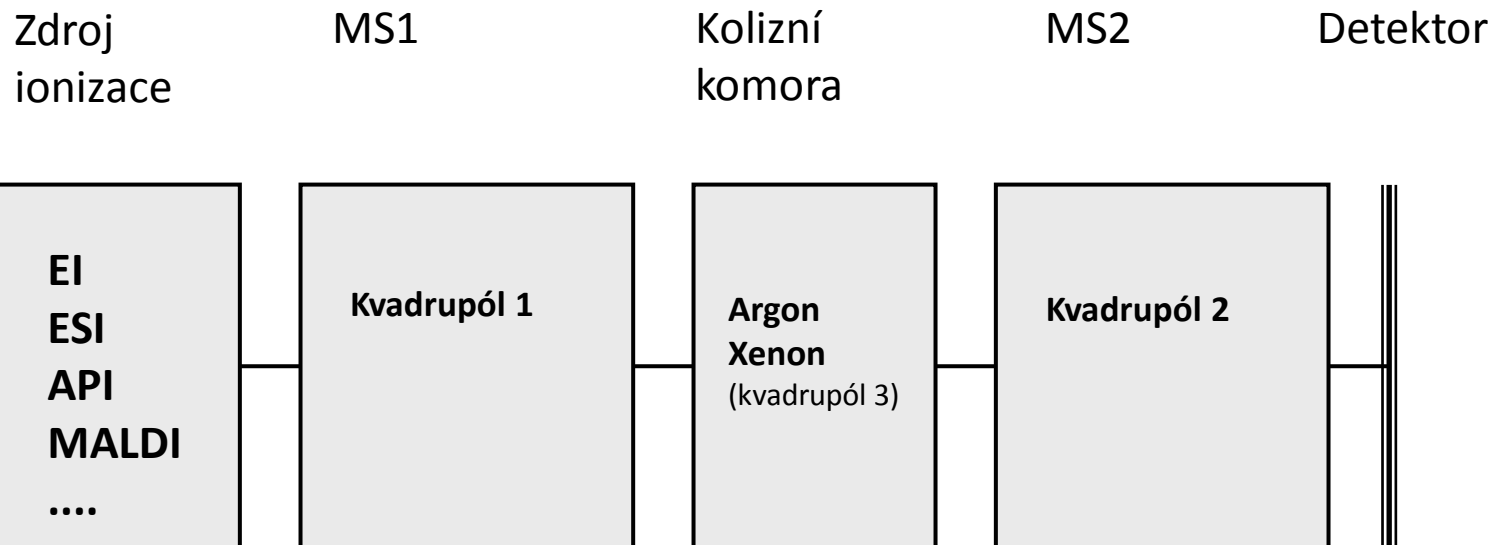
Tandemová hmotnostní spektrometrie (1)

- V posledních letech se rozšiřují kombinace dvou a více hmotnostních analyzátorů v jednom přístroji známé pod názvem **tandemová hmotnostní spektrometrie** (obecně označována jako MS/MS) (obr. 4).
- Velmi populární díky cenové dostupnosti, vysoké citlivosti, specifitě a robustnosti při analýze biologických materiálů se složitou maticí je tzv. trojitý kvadrupól.

Tandemová hmotnostní spektrometrie (2)

- Přístroj je složen ze dvou kvadrupólů pracujících jako hmotnostní analyzátoři. Mezi nimi je třetí kvadrupól fungující jako kolizní komora.
- V kolizní komoře dochází vlivem vyššího tlaku a elektrického pole ke srážkám iontů letících z prvního kvadrupólu s molekulami inertního plynu.
- Zvýší se tím energie iontů, dochází k jejich rozpadu na specifické fragmenty (produktové ionty), a ty vstupují do dalšího kvadrupólu.

Obr. 4. Schéma tandemového hmotnostního spektrometru



Pozn.:

EI – electron ionisation, ESI – electrospray ionisation, API – atmospheric pressure ionisation, MALDI – matrix-assisted laser desorption ionisation

Tandemová hmotnostní spektrometrie (3)

- Tandemová hmotnostní spektrometrie se využívá např. ve farmaceutickém výzkumu a výrobě a biotechnologiích k určování chemické struktury, při analýze kapalných směsí a při detekci a stanovení léčiv a jejich metabolitů.
- V klinických laboratořích a v toxikologii se MS/MS používá např. k diagnostice dědičných metabolických poruch, identifikaci zneužívaných drog, stanovení léčiv a stanovení nejrůznějších xenobiotik v biologických materiálech.

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Univerzita Palackého
v Olomouci

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Pro stanovení léčiv v biologickém materiálu se v současnosti začíná rozvíjet technika ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií na principu trojitého kvadrupolu.
- Tento typ hmotnostního spektrometru umožňuje rychlou a přesnou kvantifikaci s vysokým dynamickým rozsahem, a to především díky sledování produktu rozpadu molekulového iontu.

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Další výhodou této technologie je vysoká citlivost.
- Před analýzou není nutná složitá úprava a koncentrování vzorku, ale stačí pouze jednoduchá deproteinace.
- V OKB FN Olomouc jsou touto metodou rutinně v biologickém materiálu stanovována imunosupresiva takrolimus, sirolimus, everolimus a cyklosporin.

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Analýzy se provádějí na přístroji UHPLC (Dionex Ultima 3000 RS) vybaveném kolonou s reverzní fází Acquity BEH C18 (Waters) a doplněném o detekci tandemovým hmotnostním spektrometrem API 4000 (Applied Biosystems).
- Spektrometr pracuje s ionizací elektrosprejem (ESI) a v režimu sledování produktu rozpadu molekulového iontu (multiple reaction monitoring, MRM).

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Na celkovém pohledu lze vidět kompletní sestavu přístrojů (kromě počítačové řídicí jednotky).
- Vlevo jsou ve skříňové sestavě součásti automatizované ultraúčinné kapalinové chromatografie a vpravo je horizontálně uložen tandemový hmotnostní spektrometr.
- Detail ukazuje prostor s dávkovacími stříkačkami Hamilton odměřujícími objemy nasávaných vzorků a elučního roztoku.

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Deproteinované vzorky jsou předem rozplněny do jamek mikrotitrační plotny.
- Ta se uloží na pult přístroje a nasávací jehly z jamek automaticky odebírají potřebné objemy, které systém dopraví a aplikuje na chromatografickou kolonu (2,1 x 50 mm).
- Následuje gradientová eluce směsí mravenčanu amonného a acetonitrilu při teplotě 50 °C a nakonec detekce frakcí hmotnostní spektrometrií.

Videosekvence „Stanovení léčiv metodou UHPLC-MS/MS“

- Analýza jednoho vzorku trvá přibližně 2 minuty.
- Závěrečný detail ukazuje výsledný chromatogram v režimu MRM, jak je zobrazen na displeji řídicího počítače.

Doporučená literatura (1)

- Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5
- Friedecký D., Švábová M., Semeniuk T., Peřinová J., Míčová K., Adam T.: Vyšetřování imunosupresiv metodikou LC/MS na OKB FN Olomouc. FONS, inf. Bulletin, Stapro Pardubice, 2/2011, s. 12-13
- Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii. 2.část. Karolinum, nakl. UK, Praha 2006. ISBN 80-246-1189-9

Doporučená literatura (2)

- Tichá J.: Praktické zkušenosti s terapeutickým monitorováním léčiv. FONS, inf. bulletin, Stapro Pardubice, 3/2010, s. 29-32
- Večerková J.: Postupy záchytu a identifikace léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
- Warner A., Annesley T. (Eds.): Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring Services. National Academy of Clinical Biochemistry, American Association for Clinical Chemistry, 1999