

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

Stanovení hladin léčiv a terapeutické monitorování léčiv

Úvod

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

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.

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).

Za TDM nelze považovat samotné stanovení koncentrace léčiva v biologickém materiálu a k interpretaci nestačí pouhé 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. 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).

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**. Oba typy metod byly pro tento účel používány paralelně už od 80. let minulého století. Imunoanalytické metody stanovení léčiv jsou v praxi rutinních klinických laboratořích stále velmi rozšířené a oblíbené pro svoji automatizovatelnost a možnost analýzy velkých sérií vzorků. Soupravy činidel i přístrojovou techniku (automatické analyzátoři) pro ně 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.

Mezi chromatografickými technikami pro analýzu léčiv převažovala nejprve tenkovrstevná chromatografie (TLC, viz Večerková J., 1983) a klasická kapalinová chromatografie, a koncem 20. století potom 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. Hmotnostní spektrometrie se v té době teprve začínala rozvíjet. Tyto poměry se však v průběhu posledních let dramaticky změnilы 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

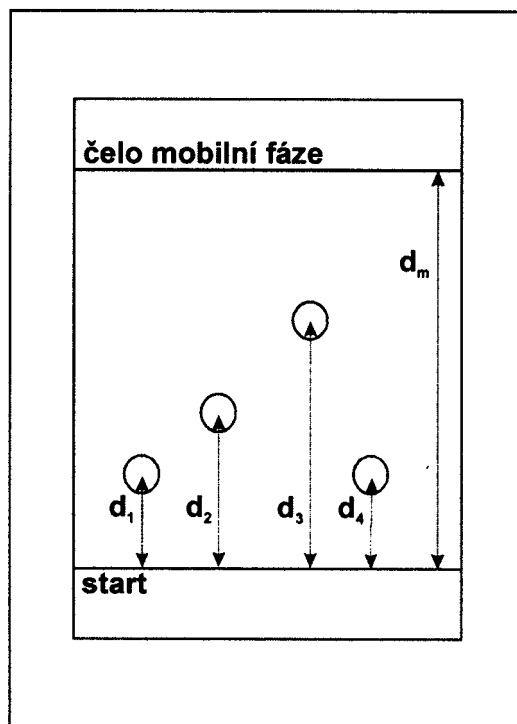
Název chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography, TLC) vychází z toho, že materiál stacionární fáze je rovnoměrně rozprostřen na pevné podložce (sklo, plastická nebo hliníková folie).

Může tam být různým způsobem navrstven („sypané vrstvy“) nebo vhodným pojídkem přitmělen („tmelené vrstvy“). Na označená místa startu se pipetou nanáší vzorky. Celá deska se potom šikmo svisle vloží do kyvety obsahující na dně mobilní fázi, která touto vrstvou vztlíná vzhůru a unáší s sebou složky dělené směsi (vyvíjení chromatogramu).

Materiály pro přípravu tenkých vrstev bývají (ve vazbě na použité principy dělení) např. mikrokrystalická celulóza, silikagel, oxid hlinitý nebo dextranové gely. Dnes se většina materiálů pro tento účel 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 postřikání vhodným činidlem barevnou reakci, nebo fluorescenční po ozáření chromatogramu UV světlem. 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). Chromatogram lze hodnotit také kvantitativně denzitometricky nebo po vystřihnutí či vyškrábnutí a eluci skvrn také např. 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** používá pro analytické účely kolony o průměru jeden a více centimetrů s délkou deseti- až dvacetinásobnou. Existují však i mikrokolony s menšími rozměry. Náplň 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 fází pro adsorpční chromatografii bývá oxid křemičitý, který je polární a kyselý nebo oxid hlinitý, který je polární a bazický. Mobilní fází pro tuto chromatografii bývají podle nárůstu eluční síly pentan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol a voda.

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.

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, vázaná 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. |

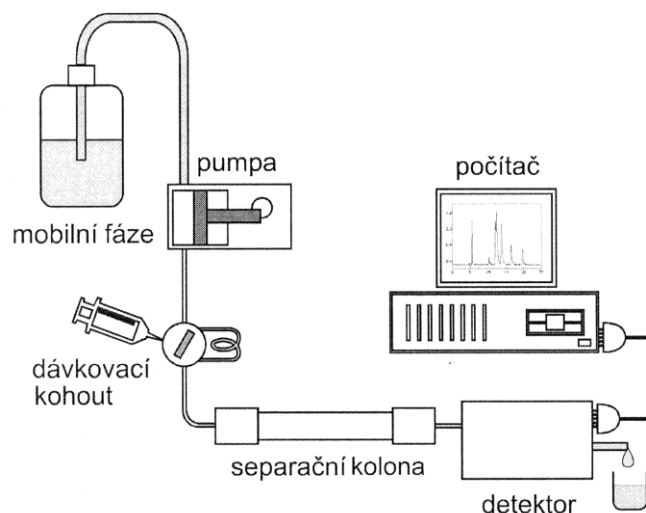
Mobilní fáze pro rozdělovací chromatografii s „normálními“ fázemi (tj. stacionární fází polární a mobilní fází nepolární) bývají nejčastěji látky jako pentan, heptan, chloroform a jejich směsi. Pro chromatografii s obrácenými, reverzními fázemi (RP-HPLC), čili stacionární fází nepolární a mobilní fází polární se používají methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi.

Pro analýzu léčiv v biologickém materiálu se využívala zejména iontoměničová a afinitní kapalinová chromatografie.

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 mohou být podle vlastností a povahy dělených látek: spektrofotometrické pro měření absorbance 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, elektrochemické, apod.

Obr. 2 Schéma uspořádání HPLC



Vysoce účinná kapalinová chromatografie

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 (obr. 2).

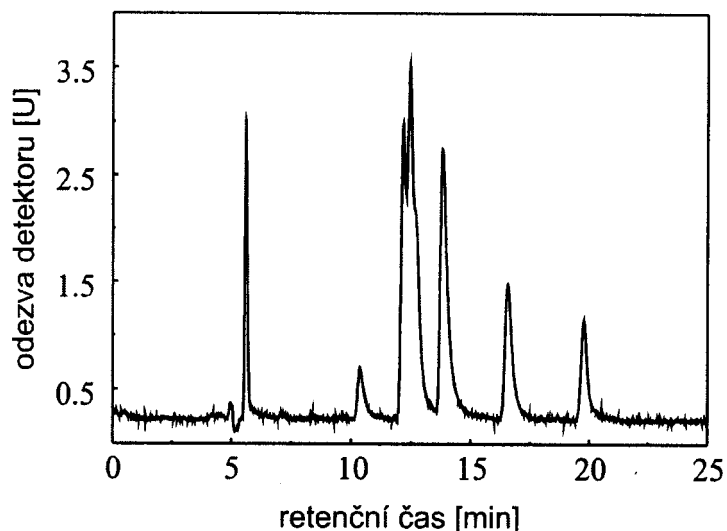
Na rozdíl od klasické kapalinové chromatografie se zde používají tenké kolony o průměru několika milimetrů, které jsou plněny jemnějším materiálem s velikostí částic řádově v mikrometrech.

Průtok mobilní fáze zajišťuje tlakové čerpadlo (tlak až 30 MPa). Integrovanou 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.

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

Obr. 3 Příklad chromatografického záznamu HPLC



Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je metoda pro dělení směsi látek podle rozdílné teploty varu a různého rozdělovacího koeficientu. Název pochází ze skutečnosti, že pohyblivou fází je v této analytické metodě plyn.

Rozdělované látky je třeba zahřátím převést do plynného stavu. 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 a pro stanovení 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.

Přístroj, plynový chromatograf, se skládá ze zdroje nosného plynu, chromatografické kolony v temperované skříně, aplikační mechaniky, detektoru a záznamového (vyhodnocovacího) zařízení. Nosným plynem bývá (v závislosti na detekčním principu) dusík, vodík, oxid uhličitý, helium, argon, apod. 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 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 vážejí na sorbent podle velikosti své sorpční energie a potom jsou postupně vymývány průchodem nosného plynu.

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 stanovené látky. 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

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.

V **iontovém zdroji** přístroje se molekuly dostávají do ionizovaného stavu, tj. vznikají pozitivně nebo negativně nabitě molekulové ionty (M^+ , M^-), adduktové ionty (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. Výsledkem je nejčastěji kladně nabitý zbytek molekuly, který vykazuje bohaté fragmentační spektrum. V technice elektrospreje (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).

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. Patří mezi skenující analyzátoře, které kontinuálně v čase separují a k detektoru vysílají pouze ionty s určitou hodnotou m/z .

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.

Ionty, které hmotnostní analyzátor vybere, jsou zaznamenány **detektorem** a signál je převeden do digitálního formátu. Existují dva typy detektorů. První z nich zaznamenává všechny ionty bez ohledu

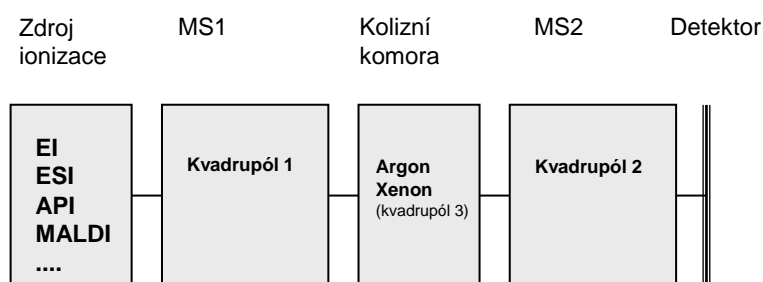
na velikost m/z . Jsou založeny na přímém měření elektrického proudu vznikajícího při srážce iontu s dynodou. Druhý typ registruje ionty ve vztahu k hodnotě m/z . V závěru vyhodnocovací software zpracuje a graficky znázorní závislost relativní četnosti iontů (osa y) na poměru hmotnosti (m) a náboje (z) (osa x).

Tandemová hmotnostní spektrometrie a její použití

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.

Přístroj je složen ze dvou kvadrupólů pracujících jako hmotnostní analyzátoři. Mezi nimi je třetí kvadrupól fungující jako kolizní komora. Tam 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 se využívá např. ve farmaceutickém výzkumu/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“

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

iontu. 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 v biologickém materiálu rutinně stanovována imunosupresiva takrolimus, sirolimus, everolimus a cyklosporin.

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).

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

Deproteinované vzorky jsou předem rozplněny do jamek mikrotitrační plotny. Ta se uloží na pult přístroje a nassávací jehly z jamek automaticky odebírají potřebné objemy, které systém dopraví a aplikuje na chromatografickou kolonu.

Následuje gradientová eluce směsí mravenčanu amonného a acetonitrilu při teplotě 50 °C a nakonec detekce složek eluátu hmotnostní spektrometrií. Analýza jednoho vzorku trvá přibližně 2 minuty.

Závěrečný detail ukazuje výsledný chromatogram v režimu MRM, jak je zobrazen na displeji řídicího počítače.

Doporučená literatura

Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5

Friedecký D., Šváblová 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

Friedecký D., Lemr K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. Klin. Biochem. Metabol., 2012 (v tisku)

Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii. 2.část. Karolinum, nakl. UK, Praha 2006. ISBN 80-246-1189-9

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