

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

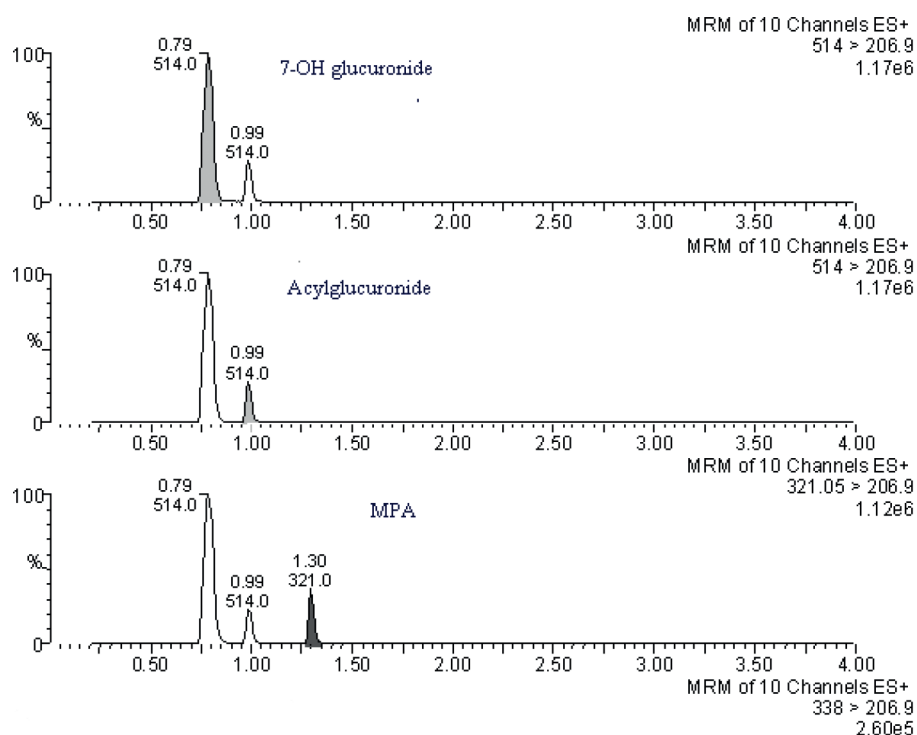
daný typ matrice jako je sérum, plasma, likvor nebo např. mateřské mléko. V rámci validace se zjišťuje stabilita jednotlivých analytů a tyto poznatky se využívají při transportu vzorků a během celé preanalytické fáze (42, 43).

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)