

klozapin, risperidon, 9-hydroxyrisperidon, olanzapin, 2-hydroxymethylolanzapin, N-desmethylo-lanzapin, quetiapin).

Analýza se provádí na kapalinovém chromatografu Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford Ma, USA) ve spojení s hmotnostním detektorem Quattro Micro API triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK). Separace látek probíhá na koloně RP column BEH C18, 2,1x50 mm, 1,7 µm za použití gradientu mobilní fáze (voda:acetonitril:octan amonný) s dobou analýzy 5 minut. Přechody použité pro kvantifikaci a kolizní energie jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 2. Příprava vzorku séra spočívá v precipitaci proteinů směsí metanol/acetonitril (40:60, v/v) s 0,05% síranem zinečnatým.

Metoda byla validována podle FDA pravidel. Korelační koeficienty kalibračních křivek a koncentrační rozsah jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 3. Výtěžnost metody se nachází v rozmezí 70 – 114,3 %.

Matricový efekt

Při zavádění metody byl testován i matricový efekt, který je jedním z mnoha důležitých zdrojů chyb v LC/MS/MS. Příčin vzniku matricových efektů je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny, důsledkem je pak potlačení nebo naopak zvýšení ionizace, což může v konečném důsledku ovlivnit správnost analýzy. Matricové efekty mohou způsobit jednak látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou, dále se mohou na vzniku podílet některé složky mobilní fáze, ale také exogenní materiály (např.

polymery obsažené v odběrových plastických nádobách, některá antikoagulantia např. heparin litný apod.). Nejdůležitější je samotná příprava vzorku. Precipitace proteinů pouze acetonitrem vykazuje největší matricový efekt s mohutnou supresí zejména na začátku a na konci chromatogramu, protože se tímto způsobem dostatečně neodstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Na hodnocení matricového efektu se používají dvě metody, infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přírůdek po extrakci. K matricovým efektům je citlivější ESI než APCI.

Analýza patientských vzorků

Ve spolupráci se Oddělením psychiatrie FN Ostrava byli odebíráni pacienti v den přijetí k hospitalizaci a následně 3-4. den hospitalizace před podáním léku a 2 nebo 6 hodin po podání na základě jejich farmakokinetiky. U pacientů užívajících citalopram, venlafaxin, klozapin, quetiapin a risperidon byl odběr proveden za 2 hodiny po podání, u pacientů užívajících fluoxetin, paroxetin, sertralín a olanzapin za 6 hodin po užití. Trazodon a mirtazapin je podáván jedenkrát denně večer, proto byl odběr prováděn až 12 hodin po podání. Celkem bylo provedeno 904 stanovení hladin, přičemž u některých pacientů byl odběr vzorku proveden opakovaně.

Závěr

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je velmi citlivou metodou umožňující stanovení velké skupiny psychofarmak a jejich metabolitů ve velmi krátkém čase.

Tabulka č.1: Stupeň doporučení pro TDM a terapeutická rozmezí

léčivo	stupeň doporučení pro TDM	terapeutické rozmezí (ng/ml)
citalopram	2	50-110
escitalopram	2	15-80
fluoxetine	2	120-500
mirtazapine	2	30-80
paroxetine	3	30-120
sertraline	2	10-150
trazodone	2	700-1000
venlafaxine+O-desmethylvenlafaxin	2	100-400
klozapin	1	350-600
olanzapin	1	20-80
quetiapin	2	100-500
risperidon+9-hydroxyrisperidon	2	20-60

(1= strongly recommended, 2 = recommended)

Tabulka č. 2: Přejchody a kolizní energie stanovovaných psychofarmak

léčivo	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE	léčivo	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE
risperidon	411,3	191,1	30	klozapin	327	269,6	25
9-hydroxyrisperidon	427,2	206,9	30	N-desmethylklozapin	313,2	270,2	24
sertralin	306	158,6	24	venlafaxin	278,6	57,6	17
N-desmethylsertralin	292,2	158,9	24	O-desmethylvenlafaxin	264,3	57,7	18
fluoxetin	310,2	43,6	11	N-desmethylvenlafaxin	264,2	120,8	29
norfluoxetin	296,2	133,7	7	olanzapin	313,3	212,8	30
citalopram	325,2	109,2	27	N-desmethylolanzapin	2992	197,8	40
desmethylcitalopram	311,2	108,8	25	2-hydroxyolanzapin	329,2	271,9	23
didesmethylcitalopram	297,2	108,9	25	trazodon	370,4	241,9	26
paroxetin	330	191,7	30	mirtazapin	265,8	194,9	22
quetiapin	384,2	252,8	20	alprenolol (IS)	250,2	91	34

Tabulka č. 3: Korelační koeficienty a koncentrační rozmezí

léčivo	korelační koeficient	koncentrační rozmezí (ug/l)
risperidon	0.998	0,5-100
9-hydroxyrisperidon	0.998	0,5-100
sertralin	0.998	5-500
N-desmethylsertralin	0.999	5-500
fluoxetin	0.999	5-1000
norfluoxetin	1.0	5-1000
desmethylcitalopram	0.999	5-500
didesmethylcitalopram	0.999	5-500
paroxetin	0.995	5-500
quetiapin	0.999	5-1000
klozapin	0.997	5-2000
N-desmethylklozapin	0.998	5-1000
venlafaxine	0.998	5-1000
O-desmethylvenlafaxin	0.998	5-1000
N-desmethylvenlafaxin	0.998	5-1000
olanzapin	0.999	2,5-500
N-desmethylolanzapin	0.996	2,5-500
2-hydroxyolanzapin	0.998	2,5-500
trazodon	0,999	5-2000
mirtazapin	0,995	2,5-500

Literatura

1. Fujáková M, Kopeček M. Antidepressiva-od terapie ke klinické praxi. *Klin. Farmakol. Farm.* 2012; 29-37.
2. Bouček J, Pidrman V. *Psychofarmak v medicíně* 1.vyd. Praha, Grada Publishing. 2005: 9-162.
3. Kopeček M. Aktualizované klinické a teoretické aspekty podání antipsychotik. *Klin. Farmakol. Farm.* 2012; 26(1): 18-28.
4. Uřinová R, Brozmanová H., Šišťák P, Šilhán P, Kacířová I., Lemr K., Grundmann M. 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*, 907 (2012) 101-107,
5. Uřinová R., Turjap M., Brozmanová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, *Čes. Slov. Farm.*, 2010; 59, 103-111
6. Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. of Chromatography B*, 2009, 887, p. 2198–2207.
7. Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., Murphy, C. M. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14, p. 1290–1294.
8. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry*. 2011; 44(6): 195-235.
9. Grundmann M., Kacirova I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, *Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic*, 2013, 157

Standardizace měření vitamínu D je nedílnou součástí obecného procesu harmonizace výsledků měření v klinických laboratořích

Friedecký B., Kratochvíla J.

Čerstvé informace o měření a klinickém využití stanovení vitamínu D

můžeme nalézt v červencovém čísle časopisu *Clinical Chemistry* v řízené diskusi expertů u kulatého stolu (Scott MG, Gronowski AM.: Vitamin D: The more we know, the less we know. *Clin Chem* 60/12 July 2014, DOI 10.1373/clinchem.2014.222521). Tam diskutují mimo jiné i velmi známí experti na stanovení vitamínu D (mohlo by se napsat „D-celebrity“) Michael F. Holick a Karen Phinney. Stručně shrnuté závěry z tohoto diskuzního fóra jsou:

- Problémy nedostatku standardizace stanovení vitamínu D mají za následek problémy s hodnotami rozhodovacích limitů pro posouzení stavu suplementace.
- Zejména imunochemické metody jsou problematické a málo srovnatelné jak s metodou LC-MS/MS, tak i vzájemně mezi sebou.
- Velkým problémem imunochemických (nikoliv separačních) metod jsou rozdíly v jejich schopnosti vyrovnat se s VDBP (vazebným proteinem vitamínu D, na který se váže asi 80 % všech forem vitamínu D). VDBP je navíc geneticky polymorfní (3 základní izoformy).
- Populační screening vitamínu D není doporučován, stanovení by mělo být indikované a zejména zaměřené na sledování účinnosti nutriční suplementace.
- V případě bioaktivního vitamínu D (bioavailable) máme zatím málo podložených znalostí.

Aktuálnost problémů měření a interpretace stanovení vitamínu D byla velmi výrazně podtržena na Světovém kongresu IFCC WORLDLAB 2014 Istanbul v červnu 2014. Tomuto tvrzení nasvědčují i čtyři tam uskutečněná sympozia. Tři přímo o 25-hydroxyvitamínu D, čtvrté o kostních markerech včetně vitamínu D. Tři z nich byla organizovaná a sponzorovaná výrobcí (Dia Sorin, IDS, Siemens).

Dvě z nich byla věnována explicitně standardizaci stanovení vitamínu D. Přes 30 posterů s tímto tématem situaci dokresluje.

Vitamin D Standardization Program (VDSP)

Ohlasy intenzivního zájmu o vitamin D nalézáme (konečně) i u výrobců IVD produktů. Jednak v článku L. Palivce v tomto čísle FONS (Dia Sorin), a dále pak v (anonymním) článku firemního bulletinu *Trend* 2/2014, s. 8-9 (Siemens, dostupné na webové adrese: <https://www.cee.siemens.com/web/cz/cz/corporate/portal/home/healthcare/Pages/Healthcare.aspx>). To je rozhodně pozitivní jev!

Šířeji pojaté, na hlediska výrobců nezúžené informace o programu VDSP lze vyhledat i na volně přístupné webové adrese: <http://ods.od.nih.gov/Research/vdsp.aspx>. První dobře informativní článek o VDSP byl uveřejněn v roce 2012 (Sempos CT a spol.: Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest* 2012 Suppl. 243 32 – 40), a prezentace tohoto programu z úst prof. L.Thienpontové zazněla v Istanbulu na sympoziu firmy Dia Sorin.

Primárním cílem VDSP je standardizace laboratorních měření vitamínu D, s cílem dosáhnout možnosti efektivní nutriční suplementace a jejího úspěšného sledování u indikovaných skupin pacientů (odborníci ve výživě jsou hlavními iniciátory vzniku programu). Jedná se tedy o dosažení stavu, který je zatím v praxi nedosažený. Nástrojem je jako vždy standardizace a metrologická návaznost na referenci, jak bylo již mnohokrát popsáno a jak je konkrétně pro vitamin D a program VDSP uvedeno ve výše zmíněných článcích Palivce a v *Trendu*. Jen by bylo dobré si uvědomit, že data, uvedená ve zmíněných firemních publikacích mají obecnější význam, než by z nich plynulo po pouhém přečtení.

Za výsledky standardizace měření vitamínu D metod jednotlivých výrobců je nutné primárně vidět nutnost úspěšně prováděné a kontrolované suplementace populace vitamínem D. Za standardem měření vitamínu D, jak je uvedeno v tiráži článku v *Trendu*, je pak nutné vidět obecný požadavek na kvalitu metody stanovení vitamínu D a za certifikátem firem, účastnících se VDSP záruku harmonizace výsledků měření, odstraňující závislosti na zvolené metodě a laboratoři. Globální charakter VDSP je nesporný. Je zřejmý ze zaštitění 9 významnými institucemi od národních zdravotních orgánů přes analytické referenční laboratoře a metrologické instituce až po mezinárodní odborné profesní

společnosti (NIH, IFCC a další). Na všestranném zajištění činnosti se zatím podílí i nutriční společnosti osmi zemí.

Od klinických laboratoří by se pak měly očekávat tři základní věci. Za prvé preference metod, certifikovaných v programu VDSP, za druhé přísně indikované použití stanovení vitamínu D, za třetí dostatečně prováděná kontrola kvality, protože, jak je zřejmé, jen samotné certifikáty kvalitu bez jejího kontinuálního a kvalifikovaně vyhodnocovaného sledování nezajistí.

Stanovisko AACC k harmonizaci výsledků měření klinických laboratoří (listopad 2013) a jeho komentář

Uveřejněno na www.aacc.org. Vypracovalo International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory results (dostupné na <http://www.harmonization.net/Pages/default.aspx>), jako oficiální stanovisko přijaté Americkou asociací klinické chemie (AACC) koncem roku 2013.

Souhrn

Výsledky laboratorních vyšetření jsou kritickým faktorem péče o pacienta a musí být harmonizovány pro zajištění správné diagnózy a optimálních terapeutických rozhodnutí u pacientů.

V kontextu s výše uvedenými informacemi o vitamínu D je nezbytné zdůraznit, že potřeba harmonizace výsledků laboratorních vyšetření je obecná, platí pro všechna a pro všechny. Důsledky, plynoucí z potřeb harmonizace pro výrobce:

- Metrologicky návazná kalibrace na referenční materiál/referenční metodu, jsou-li tyto dostupné.

- Konsensus mezi výrobci, odbornými společnostmi a klinickými laboratořemi v případě, že reference není dostupná.

Dalšími účastníky procesu harmonizace jsou odborné společnosti a klinické laboratoře samotné. Oba subjekty by měly, stejně jako výrobci, brát potřeby harmonizace zcela vážně.

Stručný komentář

Výrobci stále produkují nestandardizované verze standardizovaných metod (například stanovení kat. k. ALT a AST bez pyridoxalfosfátu, stanovení kat. k. LD s pyruvátém jako substrátem a řada dalších případů). Klinické laboratoře je široce používají v naději na úsporu finančních nákladů (na úkor pacientů). Harmonizace představuje ekonomicky silný nástroj, v současné finanční situaci nezbytný (lze očekávat jeho vymáhání ze strany úřadů a vládních orgánů). Vědecké základy harmonizace není nutné zdůrazňovat, jsou nezpochybnitelné.

Všestranný konsensus jako klíčový aspekt harmonizace omezuje konkurenční chování firem (jak si to lze představit v ČR bez regulačních opatření?)

Neměla by harmonizace začít hrát hlavní roli i v další fázi akreditací?

Texty odborných doporučení a lékařských pokynů (Guidelines) musí začít respektovat harmonizační procesy, jinak nemohou naplnit požadovanou efektivitu diagnostických a terapeutických procesů. Harmonizace je cílová vlastnost výsledků měření v laboratorní medicíně.

Standardizace je vědecký nástroj metrologické návaznosti kalibrace metod na referenci.