Analitske prednosti masne spektrometrije na področju TDM

Matej Somrak, spec. med. biokem.

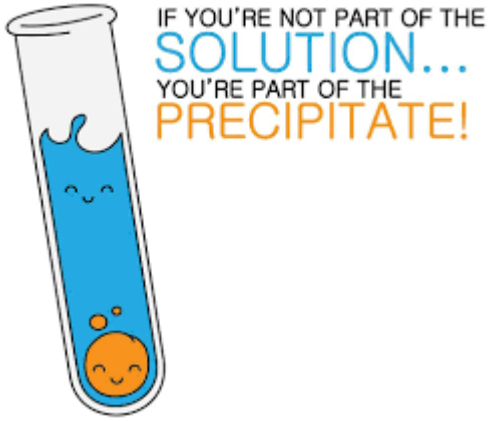
5.12.2025

Uvod

Tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC - MS/MS) = ref. metoda

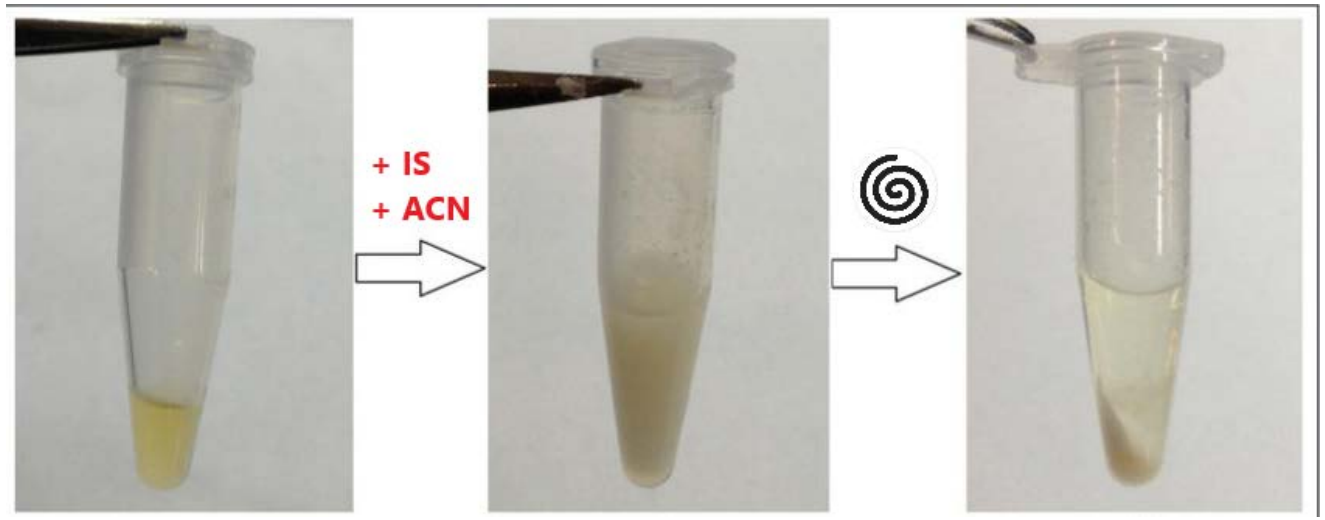
- Visoka selektivnost → parametri
- Praktičnost uporabe izotopsko označenih internih standardov
- Prednosti LC - MS/MS na področju TDM

Uvod

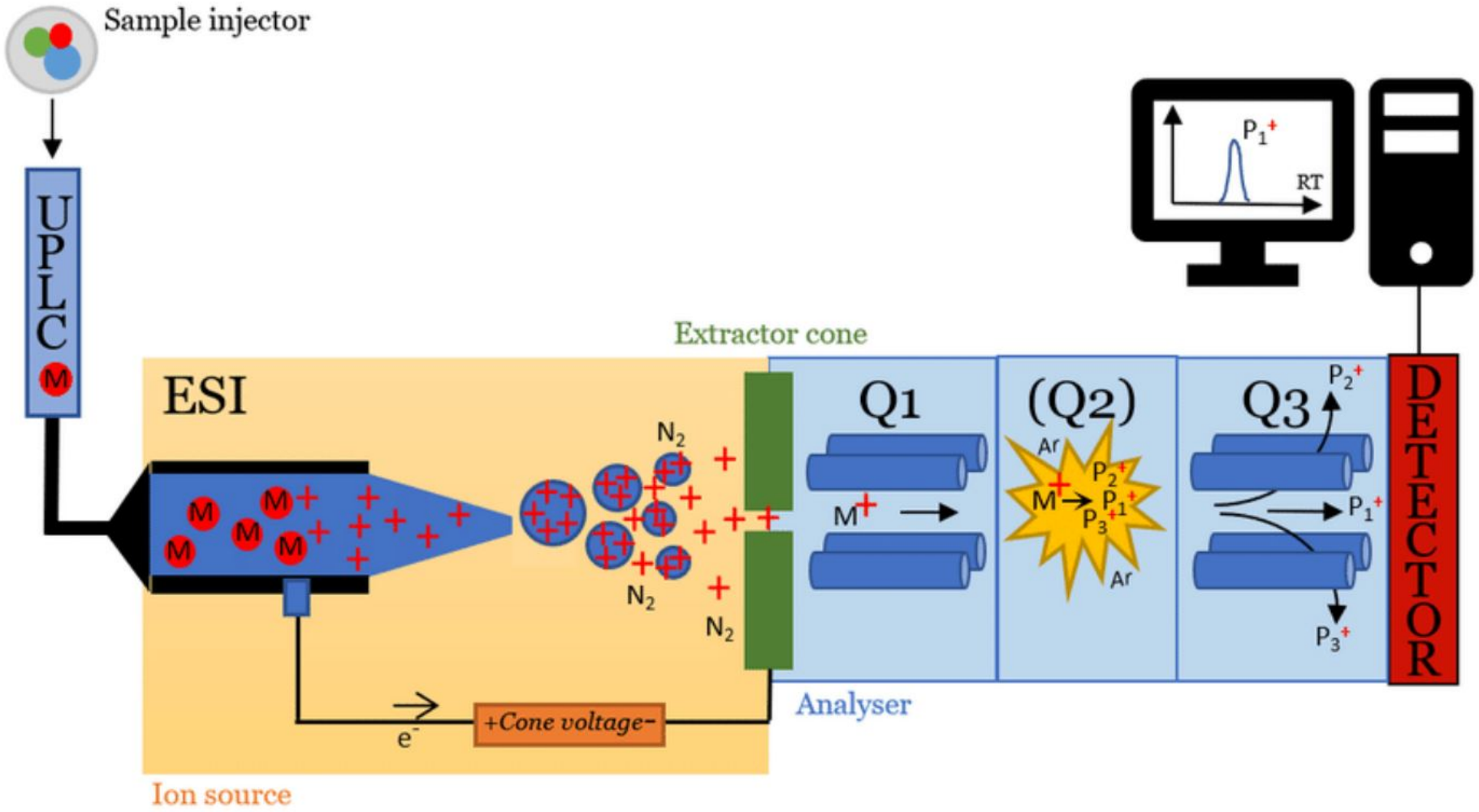


- Vzorec:
  - serum / plazma - večina
  - polna kri - redkeje (nekateri imunosupresivi)

- Predpriprava vzorca (serum / plazma):
  - Ročna
  - Dodatek IS (!) → obarjanje proteinov s prebitkom acetonitrila → centrifugiranje → nanos supernatanta na LC.



Parametri selektivnosti



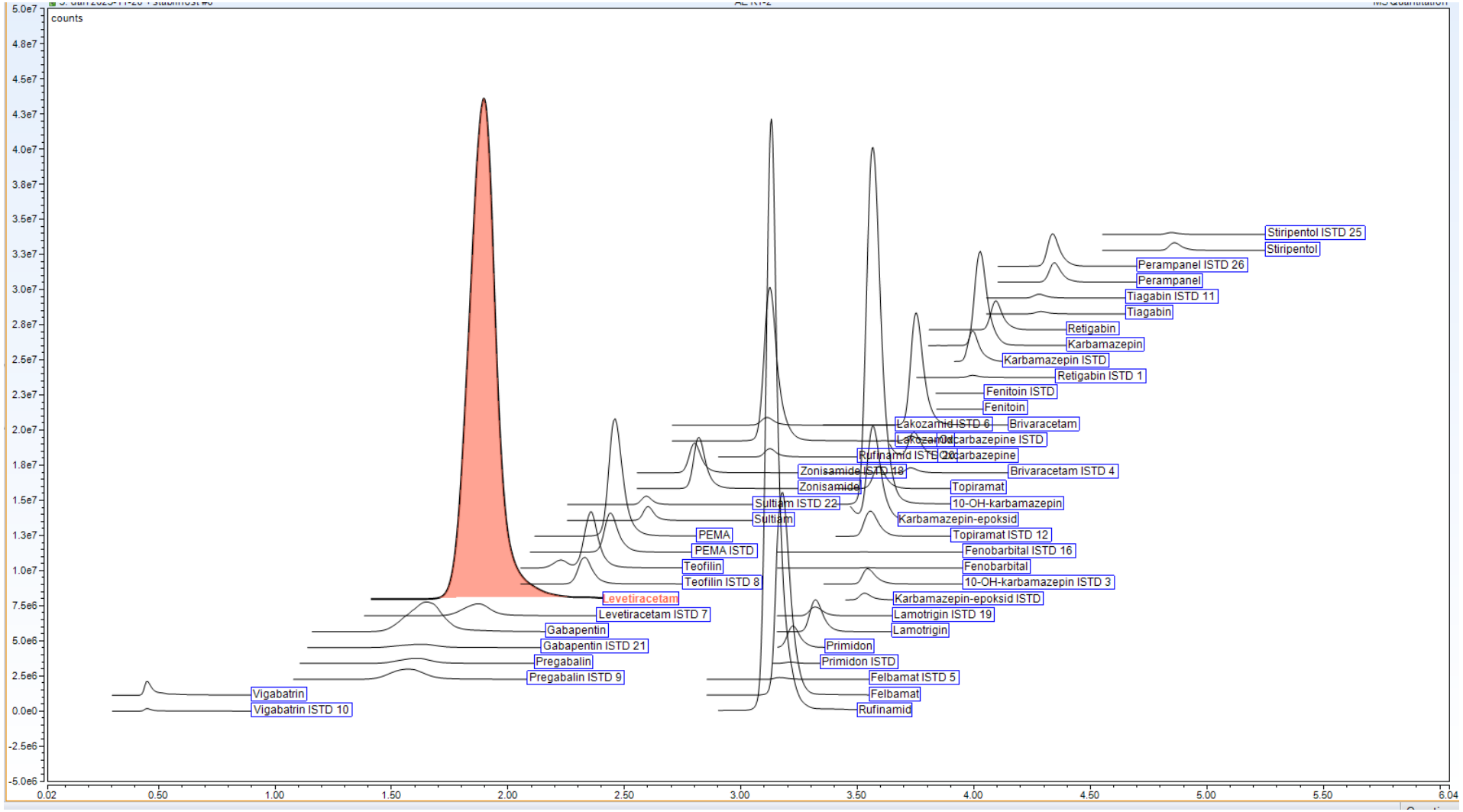
- retenzijski čas analita = čas zadrževanja analita na koloni (konstanten)
- osnovna masa intaktne molekule (M+)
- masi dveh najintenzivnejših specif. fragmentov (P_1+, P_2+)
- razmerje intenzitet signalov obeh fragmentov (P_2+ / P_1+) = konstantno pri danih pogojih.

Visoka hitrost menjavanja nastavitev na masnih filtrih → spremljanje in določitev koncentracije do ~ 30 analitov v 1 kromatografski ločbi (~ 6 minut)

Trenuten obseg TDM na KIKKB

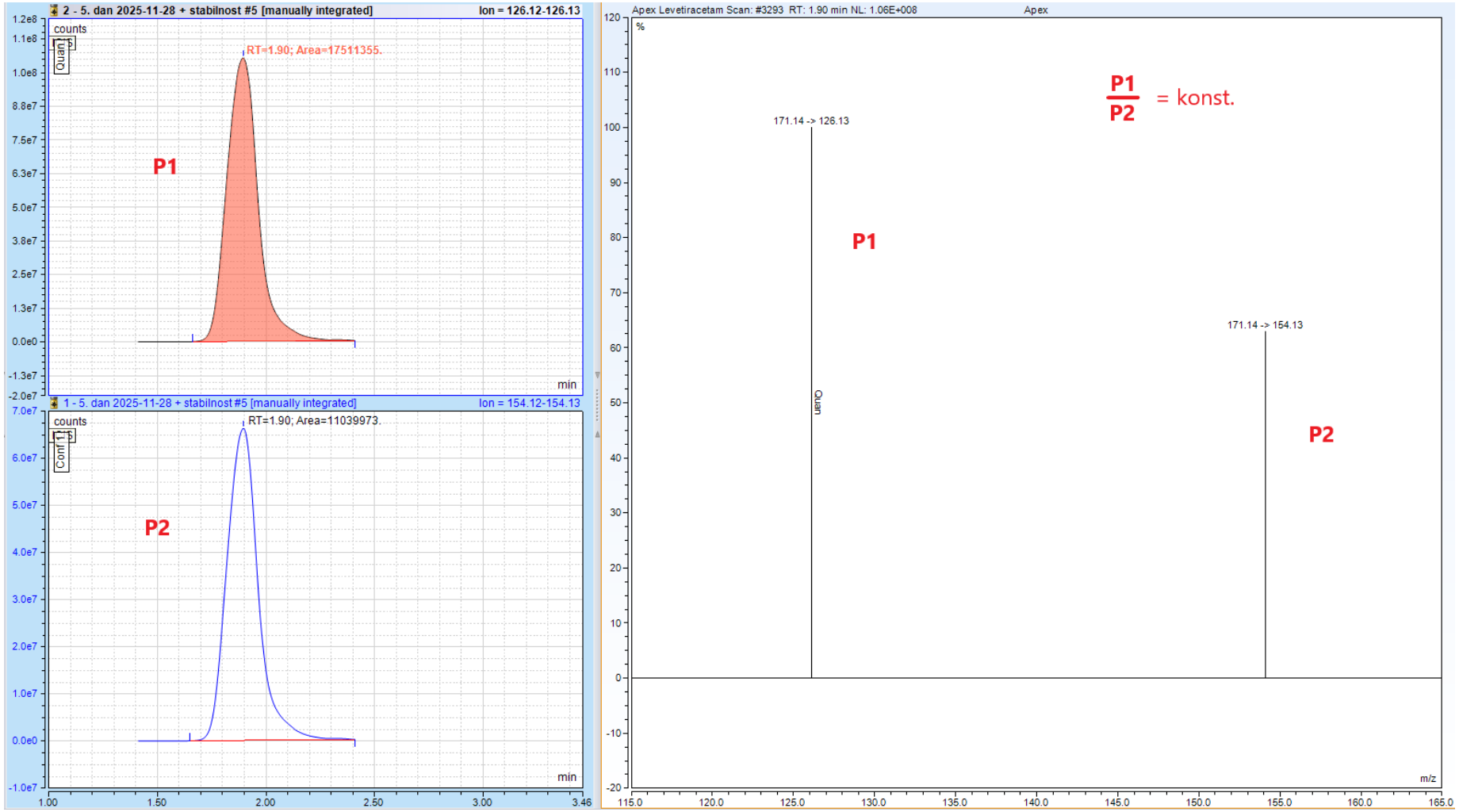
4 SKLOPI:

- 27 antiepileptikov
- 10 antimikotikov
- 10 antibiotikov
- 4 imunosupresivi



Določitev koncentracije analitov

- Osnova: površina vrha v kromatogramu pri RT
- kromatogram = krivulja signala fragmenta na detektorju v času trajanja kromatografske ločbe.
- Površina vrha je premo sorazmerna konc. analita.
- P1 / P2 = konst., če ni interferenc
  - P1 = signal najintenzivnejšega fragmenta
  - P2 = signal drugega najintenzivnejšega fragmenta
- Za samo kvantifikacijo se uporablja samo najintenzivnejši fragment (P1). P2 se spremlja samo zaradi razmerja P1 / P2.



Določitev koncentracije analitov – izotopsko označen interni standard

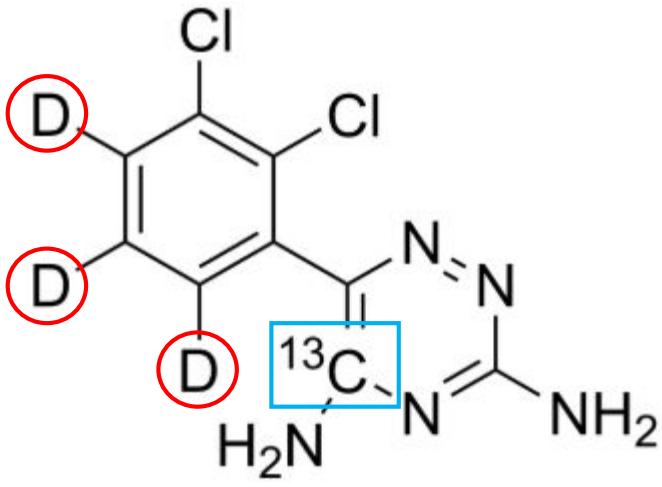
- Izotopsko označen interni standard = spojina, ki je sicer enaka kot analit, le določeni atomi so zamenjani s težjimi izotopskimi oblikami, običajno je nekaj ogljikov zamenjanih z izotopom ^{13}C ali pa nekaj vodikov z devteriji.

- Težji izotopi ne vplivajo bistveno na kemijske lastnosti spojine, zato pričakujemo enako obnašanje analita in IS v ključnih fazah analitskega procesa:

  - Enako odstotne izgube analita in IS pri predpripravi vzorca (recovery)

  - Enak retenzijski čas → istočasno v ionskem izvoru → enako odstotni vpliv matriksa na oba!

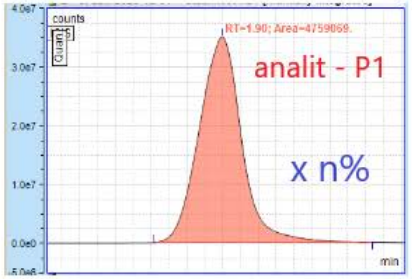
- Razlika v masi → MS razlikuje med obema

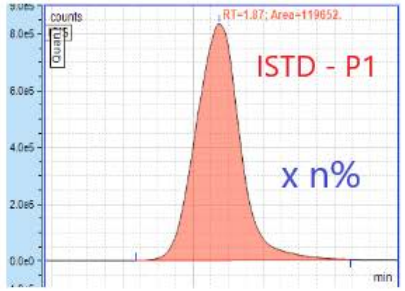


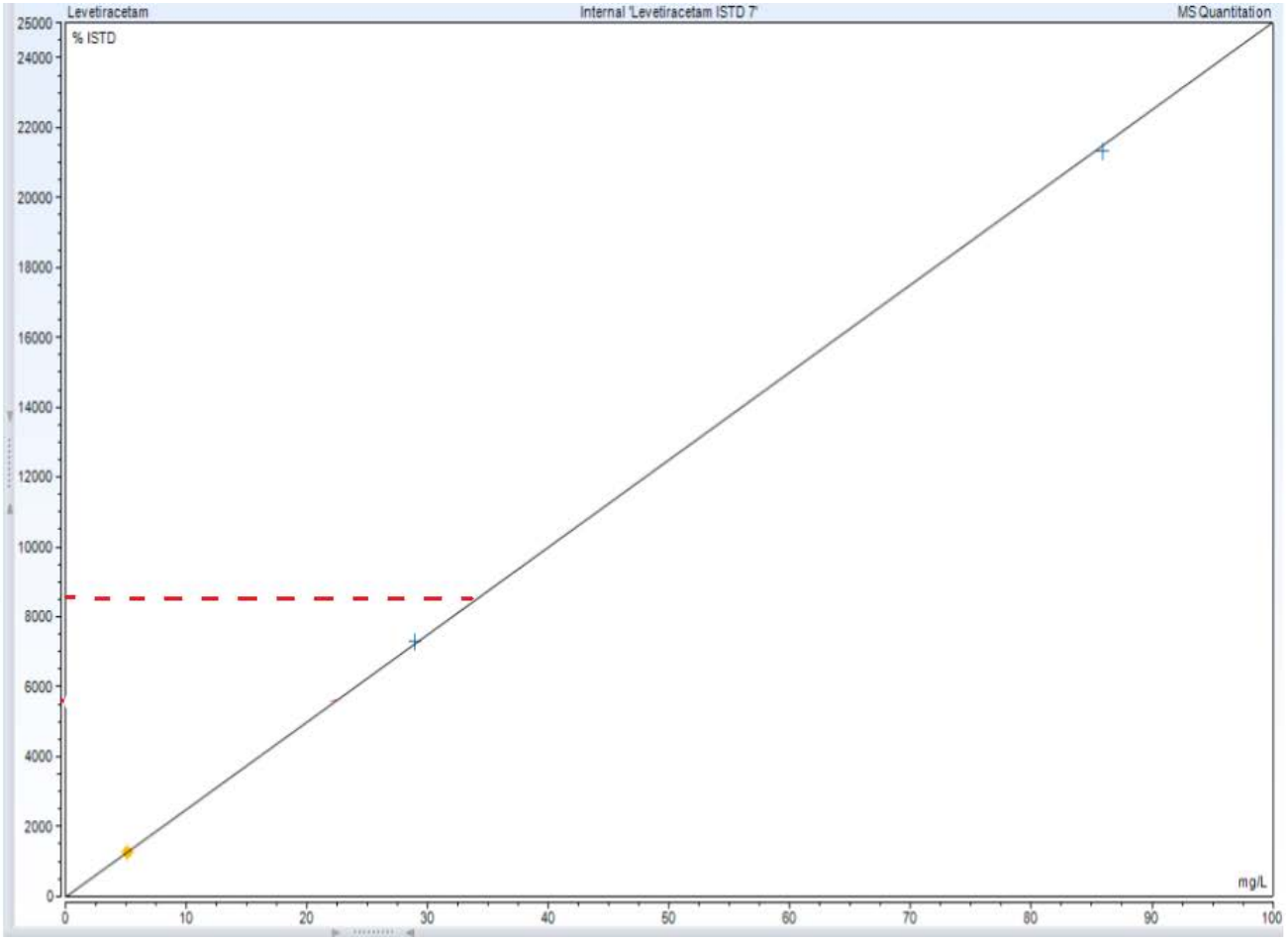
Lamotrigine-$^{13}C,d_3$ Chemical Structure

Določitev koncentracije analitov – umeritvena krivulja

- Kompenzacija vseh odstotno enakih vplivov na analit in ISTD → izračun količnika med obema:
  - <u>števec:</u> površina vrha najintenzivnejšega fragmenta pri analitu
  - <u>imenovalec:</u> površina vrha najintenzivnejšega fragmenta pri ISTD
- Količnik se ne spremeni, če je pomnožen z isto vrednostjo oz. istim % vpliva.
- Na količnik ne vplivajo napake pri injiciranju vzorca na kolono.
- Umeritvena krivulja:
  - Y os: količnik kalibratorja
  - X os: koncentracija kalibr.
  - vsak kalibrator je zmes vseh analitov, ki so v kitu.

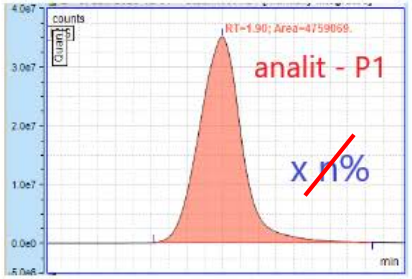


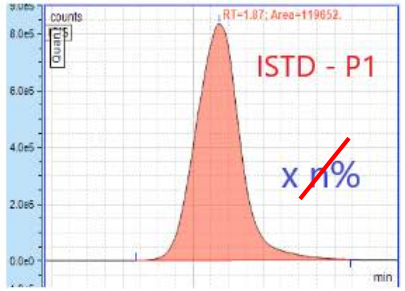


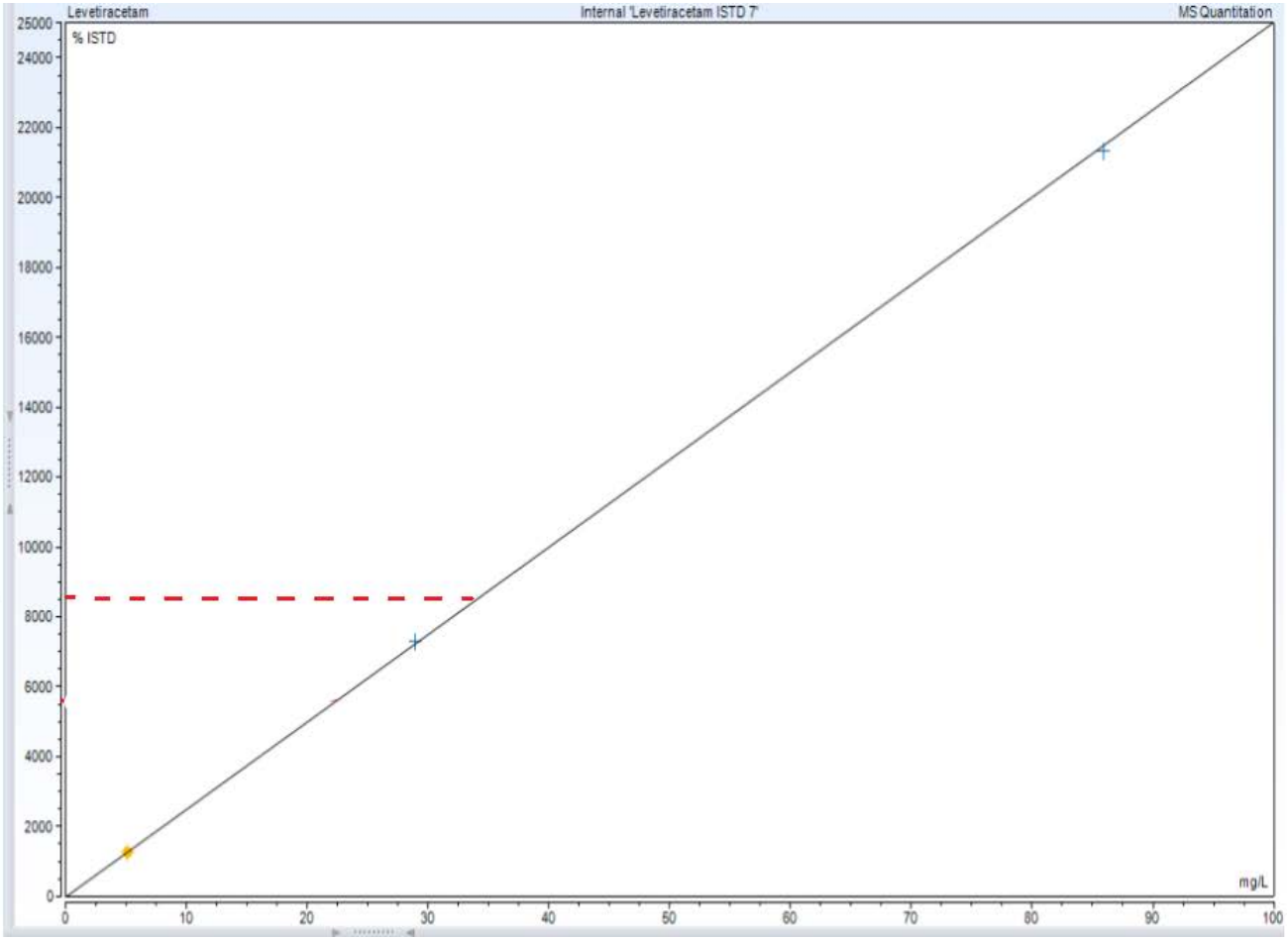


Določitev koncentracije analitov – umeritvena krivulja

- Kompenzacija vseh odstotno enakih vplivov na analit in ISTD → izračun količnika med obema:
  - <u>števec:</u> površina vrha najintenzivnejšega fragmenta pri analitu
  - <u>imenovalec:</u> površina vrha najintenzivnejšega fragmenta pri ISTD
- Količnik se ne spremeni, če je pomnožen z isto vrednostjo oz. istim % vpliva.
- Na količnik ne vplivajo napake pri injiciranju vzorca na kolono.
- Umeritvena krivulja:
  - Y os: količnik kalibratorja
  - X os: koncentracija kalibr.
  - vsak kalibrator je zmes vseh analitov, ki so v kitu.



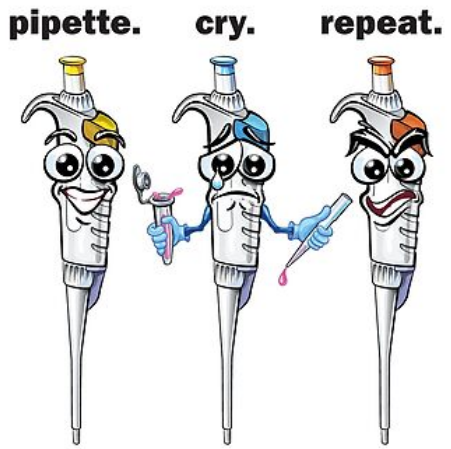


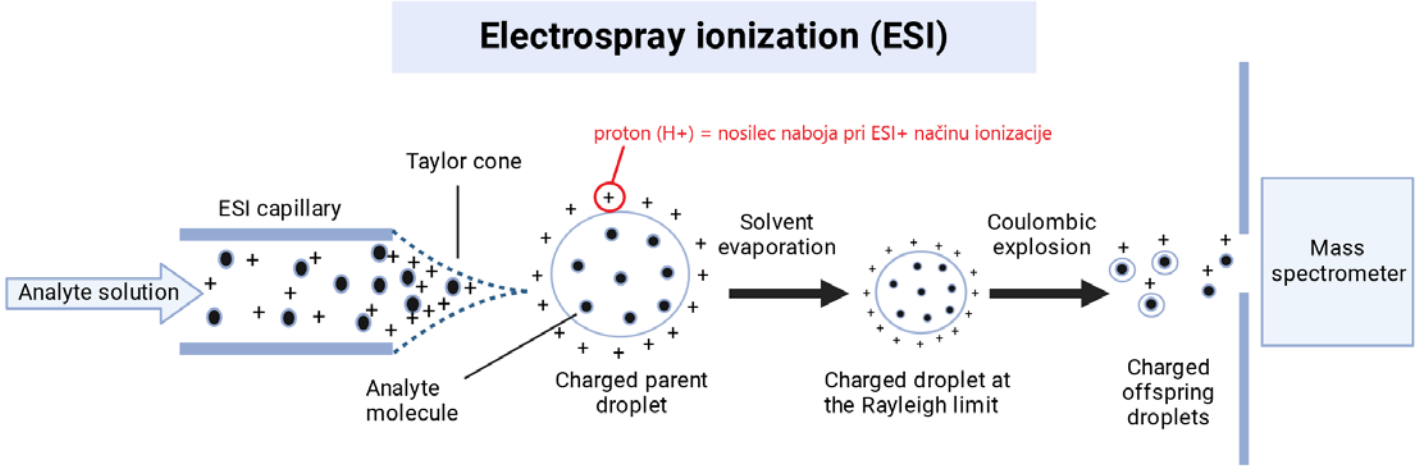


Določitev koncentracije analitov – umeritvena krivulja

- Dodati enak volumen zmesi ISTD v vse kalibratorje, kontrole in vzorce že med predpripravo.
  - Zmes ISTD: vsak analit v kit-u ima svoj ISTD (idealno)
  - Pomembna ni koncentracija ISTD ampak to, da je količina povsod enaka (enak imenovalec)!
  - Pomembno je natančno pipetiranje!
- Uporabnost ISTD:
  - ↑ točnost (kompenzacija izgub analita pri predpripravi vzorca),
  - ↑ natančnost (izniči nihanja pri injiciranju vz. in ionizaciji),
  - služi kot kontrola retenzijskega časa analita,
  - razširi območje linearnosti metode:

    Večja kot je koncentracija analita, večja je kompeticija za protone pri ionizaciji in bolj je procentualno okrnjena ionizacija analita, vendar je v enakem odstotku okrnjena tudi ionizacija ISTD → količnik analit / ISTD se ne spremeni! Efekt je podoben, kot pri vplivu matriksa, kjer za protone tekmujejo analit in komponente matriksa.





Določitev koncentracije analitov – umeritvena krivulja

Slabost ISTD: visoka cena!

- Draga kemijska sinteza (izotopi)
- Nova kalibracija v vsaki novi seriji meritev
  - Ne smemo uporabiti prejšnje umeritvene krivulje,
  - ne smemo ponovno pomeriti že pripravljenih kalibratorjev iz prejšnje serije.

Prednosti LC–MS/MS pri TDM

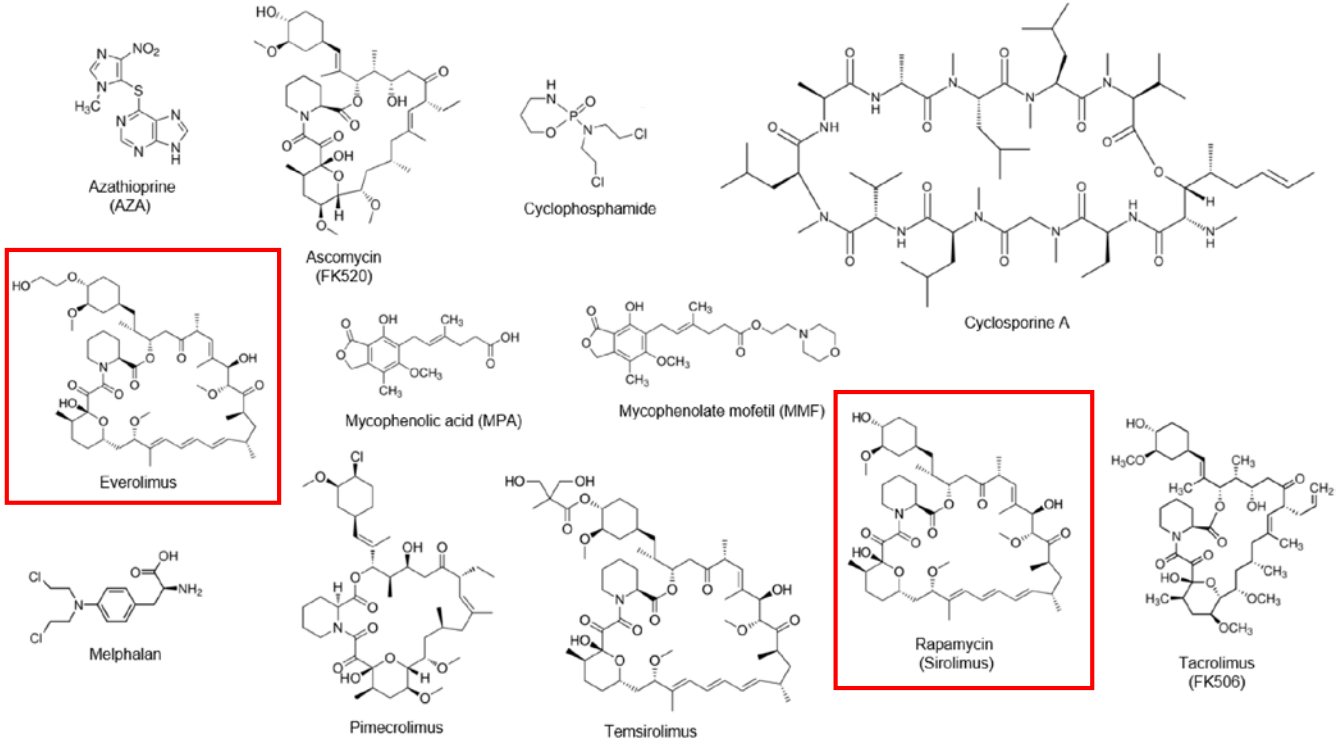
- Multiterapije (primer: epileptični pacienti):
  - Pogoste terapije z več AE hkrati
  - LC-MS/MS izmeri vse AE v eni kromatografski ločbi → prihranek na količini vzorca (otroci!) v primerjavi z imunskimi metodami

- Nadomeščanje zdravila z drugim, strukturno podobnim:
  - zamenjava sirolimus → everolimus (= derivat sirolimusa).
  - Dolg razpolovni čas sirolimusa (~ 60 h) → hkrati oba v krvi → navzkrižna reaktivnost analitskih Pt pri imuno metodah → lažno zvišana izmerjena koncentracija drugega zdravila.
  - LC-MS/MS loči oba med seboj.

- Razločevanje izhodne spojine od njenih metabolitov
  - Strukturna podobnost med izhodno spojino in metaboliti
  - Navzkrižna reaktivnost analitskih Pt → lažno zvišana izmerjena konc. izhodne spojine ali metabolitov.
  - LC-MS/MS loči izhodno učinkovino od metabolitov.

- Komercialni kalibratorji in QC:
  - izhodne učinkovine
  - metaboliti

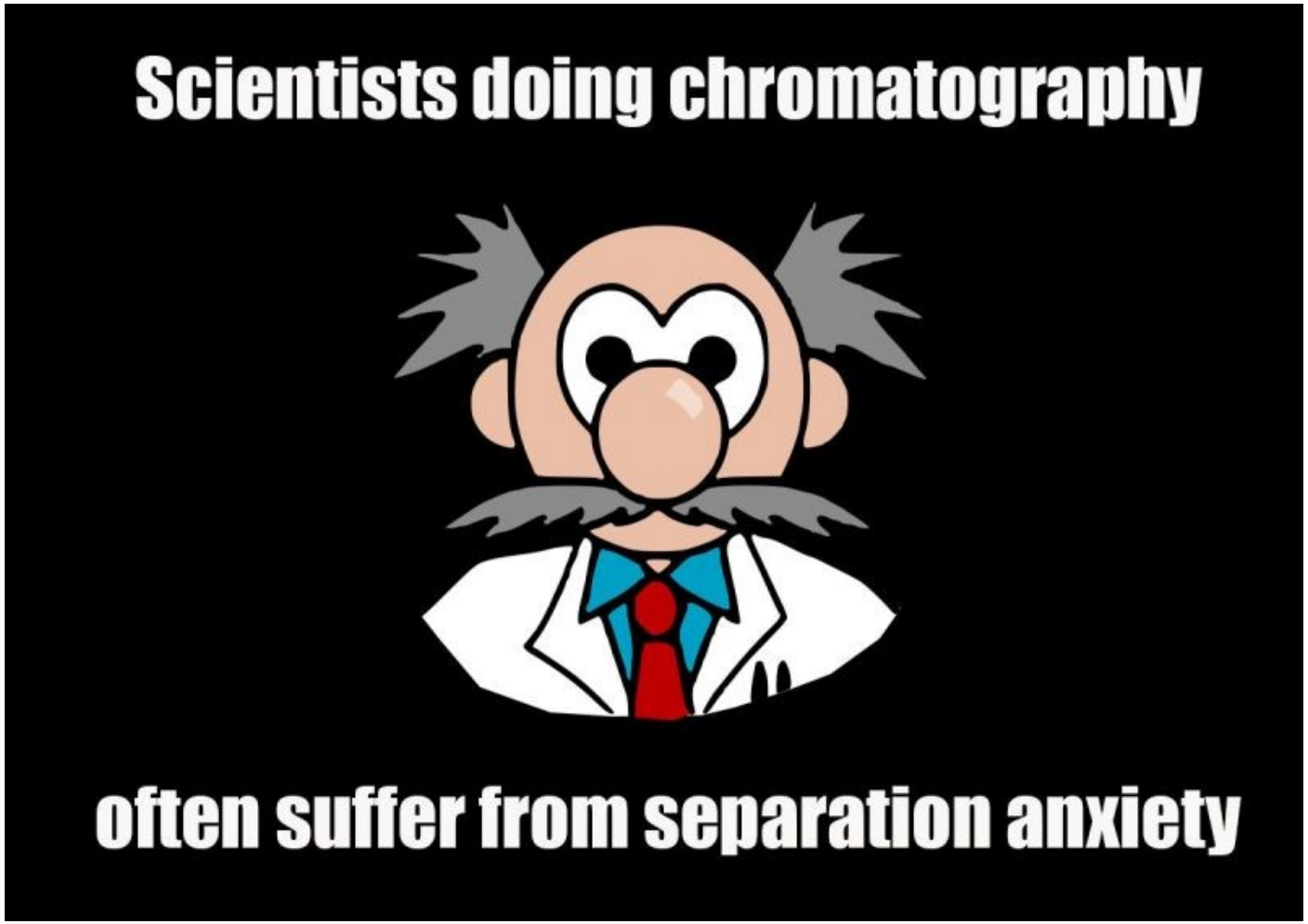
  → farmakokinetske študije!



Zaključek

- Visoka selektivnost LC-MS/MS (predvsem pomembna pri TDM):
  - retenzijski čas analita
  - osnovna masa intaktne molekule
  - masi dveh najintenzivnejših specifičnih fragmentov molekule
  - razmerje intenzitet signalov obeh fragmentov

- Uporaba izotopsko označenih internih standardov v splošnem zagotavlja visoko točnost in natančnost LC-MS/MS.

- Analitska občutljivost in meja detekcije je pri LC-MS/MS odvisna od tega, v kakšni meri se lahko analit ionizira v ionskem izvoru → težko primerjati z imunskimi metodami.

Hvala za pozornost!