

Κλινική Φαρμακευτική Ανάλυση

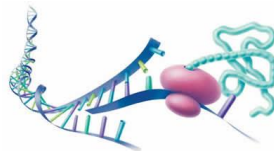
Βιολογικά δείγματα

Ειρήνη Παντερή

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης
Σημειώσεις, Αθήνα 2020

Χαρακτηριστικά βιολογικών δειγμάτων

- Το φάρμακο και οι μεταβολίτες τους βρίσκονται συνήθως σε **πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις**.
- Η συγκέντρωση του φαρμάκου σχετίζεται με τη **χρονική στιγμή** που λαμβάνεται το δείγμα.
- Το φάρμακο είναι πολλές φορές **ασταθές**, με αποτέλεσμα η μέτρηση του να πρέπει να γίνεται εντός μικρού χρονικού διαστήματος.
- Το βιολογικό δείγμα περιέχει ένα σημαντικό αριθμό **ενδογενών ενώσεων** που βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από το φάρμακο.



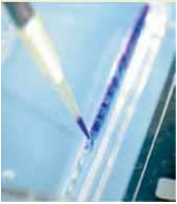
Χαρακτηριστικά βιολογικών δειγμάτων

- Τα συστατικά του δείγματος είναι δυνατόν να επιδρούν δραστικά στις διαδικασίες απομόνωσης του φαρμάκου, είτε δεσμεύοντας το στην υδατική φάση είτε αυξάνοντας την κατανομή του στην λιπόφιλη φάση (οργανικός διαλύτης)

Η χημική σύσταση του βιολογικού υλικού δεν είναι απόλυτα καθορισμένη και μεταβάλλεται εντός κάποιων ορίων. Το βιολογικό υλικό είναι ένα πολυσύνθετο υλικό:

- ✓ Έτσι η αλβουμίνη και τα λιπαρά οξέα στο αίμα υγιών ατόμων δείχνουν ενδοατομικές διαφορές της τάξεως του 30-40%.
- ✓ Ένα βιολογικό δείγμα μπορεί να περιέχει : ανόργανα άλατα (NaCl 0.1 M σε ούρα και αίμα), σύνθετα μεγαλομόρια μεγάλου μοριακού βάρους (όπως αλβουμίνη (M.B. 60000), πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, οργανικά οξέα κ.λπ.)
- ✓ Οι βιογενείς ουσίες του βιολογικού υλικού συμμετέχουν σε διαδικασίες ισορροπίας με τα φάρμακα που βρίσκονται κατανεμημένα στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς.
 - ✓ Π.χ. η πρωτεϊνική σύνδεση και η κατανομή του φαρμάκου μεταξύ πλάσματος και κυττάρων του αίματος κυρίως των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
 - ✓ Η πρωτεϊνική σύνδεση μελετάται πάντοτε σε ένα φάρμακο ώστε να είναι γνωστό αν θα μετρηθεί το ελεύθερο φάρμακο ή το ολικό φάρμακο (συνδεδεμένο+ελεύθερο)

Βιολογικά υλικά



ΥΓΡΑ :

εγκεφαλονωτιαίο υγρό, δάκρυα, ιδρώτας, σίελος, ούρα, χολή

ΗΜΙΣΤΕΡΕΑ:

πλάσμα, ορός, αίμα, κόπρανα, ανθρώπινο γάλα

ΣΤΕΡΕΑ:

εγκέφαλος, καρδιά, ήπαρ, νεφρά, πνεύμονες, μυϊκός ιστός, οστά.

ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

1. Ολικό αίμα: υγρό καθορισμένου pH που περιέχει διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες, λιπαρά, άλατα και εναιωρούμενα κύτταρα (ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια)

Για την ανάλυση του ολικού αίματος πρέπει να αιμολυθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και να αναμιχτούν πλήρως με το υγρό πλάσμα του αίματος.



ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

2. Ορός του αίματος είναι το διαυγές υγρό που προκύπτει με απλή φυγοκέντριση (χωρίς να χρησιμοποιηθεί αντιπηκτικό) οπότε και καθιζάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

3. Αίμα ελεύθερο πρωτεϊνών : είναι το μέρος του αίματος που παραμένει μετά την απομάκρυνση των έμμορφων συστατικών και των πρωτεϊνών του πλάσματος. Περιέχει ουσίες που δεν συνδέονται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (ηλεκτρολύτες, γλυκόζη κ.λπ.) και χρησιμοποιείται σε μελέτες της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων.

ΕΙΔΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

4. Το πλάσμα είναι το παχύρευστο κιτρινωπό υγρό που προκύπτει με προσθήκη αντιπηκτικού στο αίμα και φυγοκέντριση (4000 rpm, 10 λεπτά) οπότε και διαχωρίζονται τα έμμορφα συστατικά από το πλάσμα.

Η αιμοληψία και η κατεργασία του αίματος πρέπει να γίνεται προσεκτικά ώστε να αποφεύγεται η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση)

Η πρωτεϊνική σύνδεση είναι η σημαντικότερη διαδικασία που γίνεται μεταξύ φαρμάκου και πρωτεϊνών του βιολογικού υλικού και μελετάται πάντοτε σε ένα φάρμακο για να είναι γνωστό αν θα μετρηθεί το ελεύθερο ή το ολικό φάρμακο

Σύσταση του πλάσματος

pH = 7,3 – 7,5

Σταθερές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και αλάτων

Λιπαρά οξέα σε συγκεντρώσεις που ποικίλουν ανάλογα με το άτομο και πρέπει να απομακρυνθούν γιατί πολλές φορές δυσκολεύουν την ανάλυση.

Δείγματα ούρων

Η σύσταση των ούρων ποικίλει πολύ περισσότερο από τη σύσταση του αίματος ή των ιστών.

- Στα ούρα εισάγονται σε μεγαλύτερη έκταση τα συστατικά των τροφίμων και των υγρών από ότι στα άλλα βιολογικά υλικά.
- Τα ούρα **δεν περιέχουν πρωτεΐνες ή λιπαρά** και μπορούν να εκχυλιστούν απευθείας με οργανικό διαλύτη .
- Το χρώμα και η σύσταση τους μεταβάλλονται από άτομο σε άτομο και εξαρτάται από τη διατροφή.
- Περιέχουν μεγάλο αριθμό ανόργανων και οργανικών ενδογενών ενώσεων.
- Το φάρμακο που βρίσκεται στα ούρα είναι διαλυτό στο νερό ενώ τα περισσότερα φάρμακα είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες.
- Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών και μάλιστα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα υπόλοιπα βιολογικά υλικά με αποτέλεσμα να απαιτούνται αναλυτικές τεχνικές μεγαλύτερης εκλεκτικότητας από τα υπόλοιπα βιολογικά υλικά.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Βιολογικό δείγμα

Προκαταρκτικός έλεγχος

Γενική Τοξικολογική
Ανάλυση (GC-MS)

Έλεγχος οινόπνεύματος και
άλλων πτητικών ουσιών

Στοχευμένη ανάλυση (LC-MS/MS, GC-MS)



«Παραδοσιακά» βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση

Δείγμα

Πλεονεκτήματα

Μειονεκτήματα

Ολικό αίμα



- 1) Ανίχνευση μητρικών ουσιών
- 2) Ποσοτικοποίηση

- 1) Μικρός όγκος δείγματος
- 2) Συχνά μη ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες

Ούρα






- 1) Μεγάλος όγκος δείγματος
- 2) Εύκολη ανίχνευση μεταβολιτών και σε ορισμένες περιπτώσεις και μητρικών ουσιών
- 3) Μεγαλύτερο χρονικό παράθυρο ανίχνευσης

- 1) Συχνά μη διαθέσιμα
- 2) Δεν χρησιμεύει η ποσοτικοποίηση




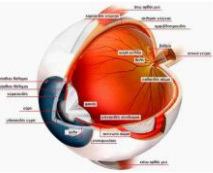
«Εναλλακτικά» βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση



Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ήπαρ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Κυριότερο όργανο μεταβολισμού 2. Επιτρέπει την εύκολη ποιοτική ανίχνευση 3. Όταν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός, αποτελεί το καταλληλότερο εναλλακτικό βιολογικό υλικό 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Δεν υπάρχουν ποσοτικά δεδομένα συσχέτισης με το ολικό αίμα για πολλούς αναλύτες 2. Περιέχει υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών και λιπιδίων τα οποία μπορεί να προκαλέσουν παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση
Εγκέφαλος 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μεγάλη σταθερότητα σε συνθήκες αποσύνθεσης του σώματος. 2. Οι αναλύτες διασπώνται με μεγάλη καθυστέρηση 3. Ο μεταβολισμός είναι βραδύς 4. Η συγκέντρωση των αναλυτών δεν επηρεάζεται από μεταθανάτια ανακατανομή από το στομάχι 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το σημείο δειγματοληψίας 2. Κατάλληλο για ποιοτική ανάλυση.
Χολή 	<p>Ιδιαίτερα χρήσιμη όταν τα ούρα δεν είναι διαθέσιμα.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Κατάλληλη μόνο για ποιοτικό προσδιορισμό. 2. Το δείγμα περιέχει μεταξύ άλλων χολικά άλατα τα οποία μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση. 3. Οι συγκεντρώσεις μπορεί να αλλοιωθούν από μεταθανάτια διάχυση από το ήπαρ και το στομάχι.



Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση



Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Γαστρικό περιεχόμενο 	Χρήσιμο σε περιστατικά υπερδοσολογίας μετά από του στόματος χορήγηση.	Ακατάλληλο στις περιπτώσεις παρεντερικής χορήγησης
Ενδοφθάλμιο υγρό 	<ol style="list-style-type: none">1. Εύκολη δειγματοληψία2. Παραμένει διαυγές μέχρι 3 ημέρες ή και περισσότερο μετά το θάνατο.3. Καλή συσχέτιση της συγκέντρωσης αναλυτών ως προς το αίμα.4. Χρήσιμο για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης στο αίμα όταν το αίμα δεν είναι διαθέσιμο.5. Δεν επηρεάζεται από επιμόλυνση, αποσύνθεση ή μεταθανάτια ανακατανομή των αναλυτών.6. Απουσία εστερασών.	<ol style="list-style-type: none">1. Περιορισμένος όγκος δείγματος

Εναλλακτικά βιολογικά δείγματα για την τοξικολογική ανάλυση



Δείγμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Σπλήνας 	Χρήσιμος όταν το αίμα δεν είναι διαθέσιμο	Κατάλληλος μόνο για ταυτοποίηση.
Σκελετικός μυς 	<ol style="list-style-type: none">1. Χρήσιμο σε περιστατικά εκτεταμένης αποσύνθεσης, λόγω του ότι είναι πολύ ανθεκτικός ιστός2. Μεγάλη ποσότητα δείγματος.	<ol style="list-style-type: none">1. Δειγματοληψία από διαφορετικά σημεία μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα.2. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη.

Φύλαξη των βιολογικών δειγμάτων

Η φύλαξη των βιολογικών δειγμάτων γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία -20°C ή -70°C ανάλογα με τη σταθερότητα των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

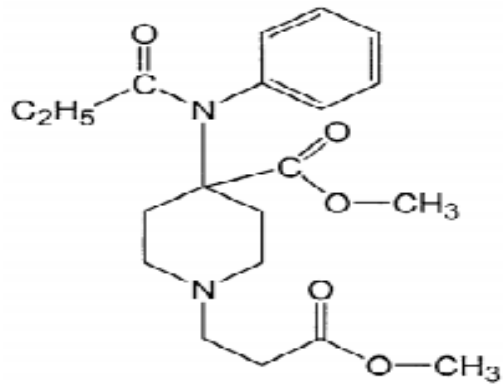
Πρέπει πάντοτε να ελέγχεται η σταθερότητα των αναλυτών σε αυτή τη θερμοκρασία για όλο το χρονικό διάστημα που φυλάσσονται.

Η αποσύνθεση του φαρμάκου στα βιολογικά δείγματα μπορεί να οφείλεται σε αντιδράσεις χημικού ή ενζυμικού τύπου:

- Η ενζυμική αποσύνθεση μπορεί να αποφευχθεί με αλλαγή του pH ή με προσθήκη αναστολέων των ενζύμων ή με μετουσίωση των πρωτεϊνών που περιέχουν το ένζυμο.
- Παραδείγματα: υδρόλυση των εστέρων από τις εστεράσες
- Η οξείδωση των φαρμάκων που μπορεί να αποφευχθεί με προσθήκη αντιοξειδωτικών.

**Υδρολύεται από τις εστεράσες των ερυθρών αιμοσφαιρίων,
προσδιορίζονται τα επίπεδα σε πλάσμα και όχι σε ολικό αίμα**

Remifentanil



Κατεργασία βιολογικών δειγμάτων

Απομόνωση των αναλυτών από τις ενδογενείς ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάλυση.

Ο σχεδιασμός της διαδικασίας κατεργασίας του βιολογικού δείγματος εξαρτάται από :

- ✓ τις ιδιότητες των αναλυτών,
- ✓ το βιολογικό υλικό
- ✓ και τη μέθοδο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί



Κατεργασία δείγματος αίματος για ανάλυση

A. Μέθοδοι αιμοληψίας

Συλλέγεται το περιφερειακό φλεβικό αίμα συνήθως από το εμπρόσθιο τμήμα του αγκώνα του χεριού. Συλλογή αίματος από αρτηρίες και τριχοειδή είναι πολύ δύσκολη και εγκυμονεί κινδύνους

Βασικές μέθοδοι συλλογής

- 1. Με βελόνα εφαρμοσμένη σε σύριγγα*
- 2. Με βελόνα προσαρμοσμένη σε ειδικό σωληνάριο κενού αέρος*
- 3. Με φλεβικό καθετήρα που είναι μόνιμα προσαρμοσμένος στον ασθενή*

Μόλις παραληφθεί το αίμα μεταφέρεται στον κατάλληλο περιέκτη και ακολουθεί κατεργασία ανάλογη με το είδος του αίματος που θα αναλυθεί (πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, αίμα ελεύθερο πρωτεϊνών)

Η διάσπαση της πρωτεϊνικής σύνδεσης επιτυγχάνεται με τους ακόλουθους τρόπους:

- μεταβολή του pH
- μετουσίωση ή καθίζηση πρωτεϊνών:
 - ✓ CH_3OH σε αναλογία 5:1 ή αιθανόλη σε αναλογία 2:1
 - ✓ $HCOOH$
 - ✓ Ακετονιτρίλιο σε αναλογία με το πλάσμα 1,5:1
 - ✓ Τριχλωροξικό οξύ
 - ✓ Υπερχλωρικό οξύ (pH <3)

