

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká  
Katedra analytické chemie**

**Simultánní stanovení antipsychotických léčiv  
metodou HPLC - ED**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Kateřina Krčová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

Mgr. Daniel Riman, Ph.D.

**OLOMOUC 2019**

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Bc. Kateřina Krčová
Název práce:	Simultánní stanovení antipsychotických léčiv metodou HPLC – ED
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Daniel Riman, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2019
Anotace:	Cílem práce bylo využití tuhy jako pracovní elektrody v průtokových systémech a následné vyvinutí jednoduché, rychlé a účinné metody HPLC – ED pro stanovení vybraných antipsychotických léčiv.
Klíčová slova:	antipsychotika, elektrochemická detekce, HPLC, elektroda z tuhy
Počet stran:	56
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Bc. Kateřina Krčová

Title: Simultaneous determination of antipsychotic drugs using HPLC – ED

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Mgr. Daniel Riman, Ph.D.

The year of submission: 2019

Annotation: The aim of this work was the use of the pencil graphite electrode as a working electrode in flow systems and to develop a simple, rapid and sensitive HPLC – ED method for the determination of selected antipsychotic drugs.

Keywords: antipsychotic drugs, electrochemical detection, HPLC, pencil graphite electrode

Number of pages: 56

Number of appendices: 0

Language: Czech

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 15. 4. 2019

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Danielu Rimanovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady a ochotu pomoci při sepisování a vyhodnocování mé práce. Zvláštní poděkování patří doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. za poskytnutí a vyrobení elektrochemické cely použité v této práci.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1	Elektrochemická detekce v průtokových metodách.....	2
2.2	Antipsychotika .....	6
2.2.1	Antipsychotika I. generace .....	7
2.2.2	Antipsychotika II. generace .....	12
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
3.1	Chemikálie .....	22
3.2	Příprava mobilní fáze .....	22
3.3	Cyklická voltametrie .....	22
3.4	Injekční průtoková analýza .....	23
3.5	Chromatografie .....	23
3.6	EC detekce v průtokových systémech.....	24
3.7	Zpracování výsledků .....	25
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
4.1	Charakterizace látek CV .....	26
4.2	Experimenty FIA.....	29
4.3	Experimenty HPLC .....	39
4.3.1	Vliv pH .....	40
4.3.2	Vliv koncentrace pufru .....	44
4.3.3	Podmínky separace .....	45
5	ZÁVĚR .....	50
6	SUMMARY .....	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
8	POUŽITÁ LITERATURA .....	53

# 1 ÚVOD

V dnešní vypjaté a uspěchané době se potýká řada lidí s psychickými problémy, které mohou vést až k rozvinutí schizofrenie nebo bipolární poruchy. Tyto duševní onemocnění jsou léčeny pomocí skupiny látek nazývané antipsychotika neboli neuroleptika. U části pacientů, kteří jsou léčeni na klinikách a specializovaných zařízeních, je potřeba sledovat koncentrační hladinu léčiva v krvi případně v moči. V těchto případech bývá koncentrace relativně nízká a je potřeba mít citlivou metodu stanovení. Na druhou stranu u pacientů, kteří nejsou hospitalizováni ve specializovaných zařízeních, může dojít k předávkování těmito léky jednak chybou v dávkování léku anebo úmyslně s cílem se zasebevraždit. V těchto případech lze očekávat mnohem vyšší koncentraci léčiva (než je terapeutická hladina) a tudíž analytická metoda stanovení nemusí být až tak citlivá, ale mezi požadavky bude rychlost a jednoduchost stanovení.

Při toxikologických analýzách a ve zdravotnických zařízeních se nejčastěji využívá HPLC s hmotnostní detekcí. Vedle řady výhod této techniky, lze nalézt také nevýhodu ve vysokých pořizovacích a provozních nákladech. Jako možnou alternativu lze použít HPLC s elektrochemickou detekcí, která nabízí vedle vysoké citlivosti a selektivity mnohem nižší pořizovací a provozní náklady.

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro stanovení vybraných antipsychotických léčiv pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Jako materiál pro pracovní elektrodu byla zvolena tuha, která našla uplatnění v elektrochemické detekci celé řady látek. Její využití v průtokových systémech není tak časté jako použití například elektrody ze skelného uhlíku nebo jiných komerčně dostupných elektrodových materiálů, a tak se bude jednat o nové technické řešení aplikace tuhové elektrody v průtokových systémech.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Elektrochemická detekce v průtokových metodách

Kapalinová chromatografie (LC – Liquid Chromatography) je všestranná analytická metoda. Principem je separace látek na základě jejich distribuce mezi mobilní (pohyblivou) fází a stacionární (pevnou) fází. K separaci analytů dochází na chromatografické koloně. Analyty eluující z kolony je potřeba detekovat. Jelikož separace v LC probíhá dynamicky, vyžadují se detekční systémy, které pracují on-line a vytvářejí okamžitý záznam událostí na koloně.[1] Detektor zaznamenává rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt.[2] Existuje celá řada technik, mezi nejčastěji používané patří spektrofotometrická detekce nebo hmotnostní detekce.

Alternativou může být elektrochemická detekce (ECD) vyznačující se svojí vysokou citlivostí a selektivitou a zároveň relativně nízkými provozními i pořizovacími náklady. Další výhodou může být snadná miniaturizace detektoru. EC detektor měří určitou elektrochemickou veličinu (proud, potenciál, kapacitu, odpor), která je generována elektroaktivními analyty v eluátu mezi elektrodami v průtokové cele.[3] Elektrochemický detektor může měřit fyzikální vlastnost roztoku protékajícího detektorem, to platí pro konduktometrické, případně dielektrické detektory. Ostatní EC detektory jsou založeny na elektrodovém ději v podobě oxidačně redukční reakce v obecném tvaru  $ox + n e^- \leftrightarrow red$ , která probíhá na elektrodách. V případě, že celkový proud procházející článkem je nulový (je v rovnovážném stavu) jedná se o potenciometrický detektor. Naopak prochází-li článkem elektrický proud, podle stupně konverze analytu rozlišujeme voltametrický (amperometrický) nebo coulometrický detektor.

#### *Konduktometrie, dk-metrie*

Pokud měříme elektrickou vodivost roztoku (schopnost roztoku vést elektrický proud) mezi dvěma elektrodami, jimiž prochází konstantní proud, jedná se konduktometrii. V případě, že měřenou vlastností je permitivita roztoku, mluvíme o dielektrimetrii (dk - metrii).[4] Společným znakem těchto dvou metod je, že stanovení analytu není založeno na elektrodové reakci. Podle velikosti frekvence použitého střídavého proudu rozlišujeme nízkofrekvenční a vysokofrekvenční konduktometry. Konduktometrická detekce je v kapalinové chromatografii úzce spojena s vývojem iontoměničové



chromatografie, dnes je ale také používána i pro iontově vylučovací nebo ion párovou chromatografií.[5]

### *Potenciometrie*

Při potenciometrické detekci získáváme informaci o složení vzorku ze změřeného rovnovážného potenciálu mezi dvěma elektrodami, pracovní a referenční. Podmínkou měření je, aby článkem neprocházel elektrický proud a tudíž nedocházelo ke změně chemického složení roztoku.[4] V průtokových metodách se především uplatňují jako pracovní elektrody iontově selektivní elektrody (ISE). Je známo mnoho typů membrán používaných pro ISE, např. krystalická membrána, PVC membrána a další. Typem membrány lze ovlivnit selektivitu měření. Potenciometrická detekce je nejčastěji využívána pro průtokovou injekční analýzu (FIA).[6] Kvůli pomalému ustavování rovnováhy se potenciometrie ve spojení s HPLC moc nevyužívá, avšak existuje několik prací, kde byl potenciometrický detektor pro HPLC použit.[5, 7]

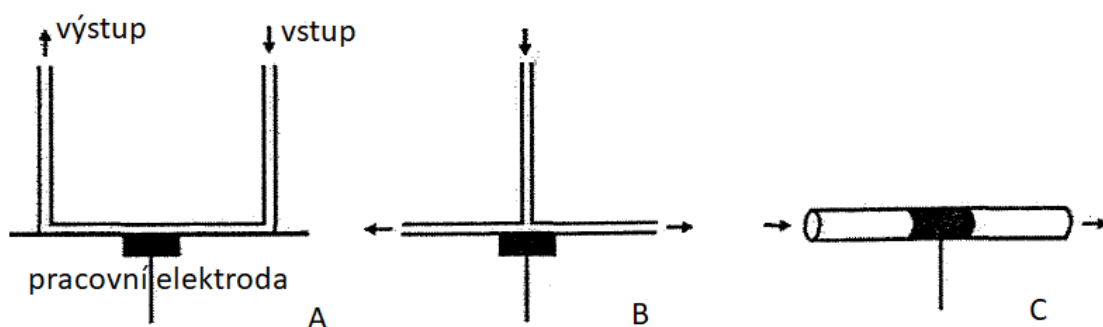
### *Amperometrie a coulometrie*

Z elektrochemických metod se jako nejběžnější způsob detekce v průtokových metodách využívá amperometrie, příp. coulometrie. Pro amperometrii platí podmínka konverze analytu do 10 % a u coulometrie dochází k úplné konverzi. Detektor zaznamenává lineární proud při vkládaném konstantním elektrodovém potenciálu na pracovní elektrodu. Citlivost a selektivita se nastavují změnou potenciálu udržovaného mezi pracovní a referenční elektrodou.[8] Podmínkou EC detekce je přítomnost elektrochemicky aktivních analytů a MF musí být alespoň minimálně elektricky vodivá.[9] Při separaci je vodivost zajištěna přidávkem pufru (např. fosfátový, acetátový apod.) o vhodné koncentraci.

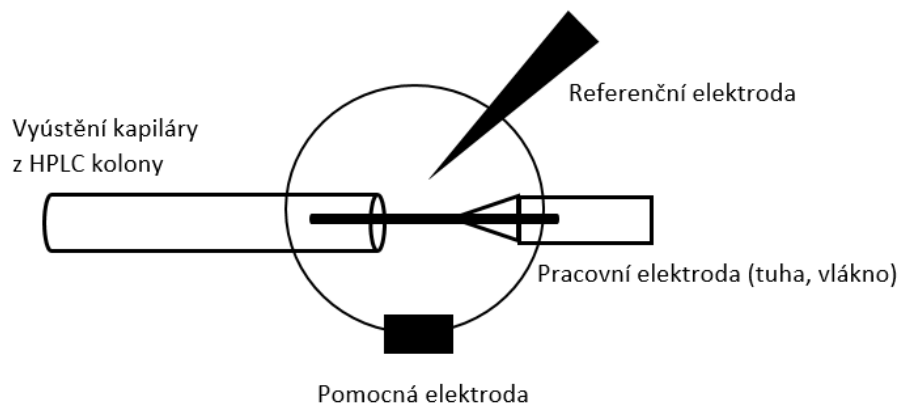
Nejčastěji se využívá tříelektrodového zapojení detektoru: 1. pracovní elektroda, kde dochází k oxidaci nebo redukci analytů, 2. pomocná elektroda podílející se na elektrochemické přeměně analytů, 3. referenční elektroda, která udržuje konstantní detekční potenciál na pracovní elektrodě.[3] Důležitý je vhodný výběr pracovní elektrody. Ty mohou být konstruovány z mnoha různých materiálů, ale hlavními požadavky jsou robustnost, stabilita, vodivost a rozsah potenciálového okna pro měřený analyt. Mezi stále nejvíce používané patří tuhé kovové elektrody (platina, měď, nikl, zlato), ale jako vhodná alternativa se nabízí uhlík. Uhlíkové elektrody jsou konstruovány v nejrůznějších formách,

například uhlíková pastová elektroda (CPE), elektroda ze skleného uhlíku (GCE), uhlíková vláknová elektroda (CFE) nebo tuha (PGE).

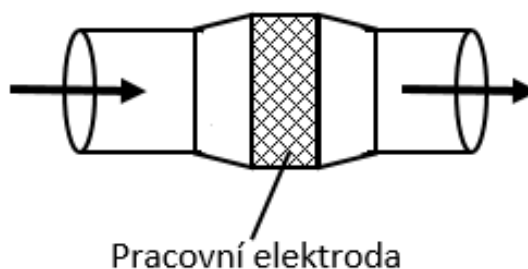
Konstrukce detektorové cely v průtokových metodách musí splňovat určité požadavky. Měla by mít vysoký poměr signálu ku šumu, nízký mrtvý objem, vhodnou hydrodynamiku, malý ohmický odpor, jednoduchou konstrukci a snadnou údržbu.[10] Referenční elektrodu je třeba umístit co nejbližší k pracovní elektrodě, abychom získali co nejmenší potenciálový spád a platí, že pomocná a referenční elektroda by měly být v průtokové cele umístěny tak, aby roztok proudil směrem od pracovní elektrody k těmto dvou.[11] Pro amperometrické detektory rozlišujeme několik typů průtokových cel: tenkovrstvá („thin-layer“), „wall-jet“ (tryskající proti zdi) a tubulární cela (viz obr. 1). Princip tenkovrstvé cely se opírá tenkou vrstvou roztoku, který proudí rovnoběžně s rovinným povrchem elektrody, která je vložena do pravoúhlého kanálu. U „wall-jet“ cely proudí eluát kolmo na povrch ploché elektrody a potom se radiálně šíří po povrchu.[10] Další možností je uspořádání s cylindrickou pracovní elektrodou (obr. 2).[4] Pro coulometrický detektor je využívána „flow-through“ cela (obr. 3).



Obr. 1: Konstrukce amperometrických detektorů, A: „thin-layer“, B: „wall-jet“, C: tubulární, převzato z cit.[4]



Obr. 2: Cella s cylindrickou elektrodou



Obr. 3: „Flow-through“ cela pro coulometrickou detekci

ECD je využívána pro katecholaminy, neurotransmitery, redukující cukry, glykoproteiny a sloučeniny s fenolickými, hydroxylovými, amino, diazo nebo nitro funkčními skupinami.[12] Některá antipsychotická léčiva lze zařadit mezi elektroaktivní sloučeniny, které lze stanovit pomocí ECD.

Tabulka I: Příklady sloučenin detekovaných EC detektorem, převzato z cit.[9]

Oxidovatelné sloučeniny	Redukovatelné sloučeniny
Fenoly	Ketony
Oximy	Aldehydy
Merkaptany	Oximy
Peroxidy	Konjugované kyseliny
Hydroperoxidy	Konjugované estery
Aromatické aminy, diaminy	Konjugované nitrily
Puriny	Nitrosloučeniny
Heterocykly	Heterocykly
	Aromatické halogeny

## 2.2 Antipsychotika

Schizofrenie, bipolární porucha a jiné psychózy jsou duševní onemocnění projevující se poruchami myšlení a vnímání. U pacientů s psychózou dochází k narušení zpracování informací, ocitají se mimo realitu. K těmto stavům dochází pravděpodobně vlivem zvýšené hladiny dopaminu v mozku.[13]

K léčbě těchto závažných onemocnění se využívají léčiva známá pod společným názvem antipsychotika (AP) neboli neuroleptika, která tlumí psychotické příznaky.[14] Společným rysem všech antipsychotik je blokování dopaminových D<sub>2</sub> receptorů v mozku.[13] Tyto léky jsou široce používány po celém světě a byly poskytnuty více jak 300 miliónům lidí při léčbě psychóz díky svým prospěšným účinkům na náladu a myšlení.[15] Na druhou stranu jsou relativně často zneužívána při pokusech o sebevraždu. Proto je důležité mít možnost tyto látky rychle a spolehlivě stanovit v biologických vzorcích.

Antipsychotika dělíme na dvě skupiny – antipsychotika I. generace (konvenční, klasická, typická) a antipsychotika II. generace (atypická).[16]

Tabulka II: Rozdělení antipsychotik

	<b>Zástupci</b>
<b>Antipsychotika I. generace</b>	Chlorpromazin, chlorprothixen, haloperidol, levomepromazin
<b>Antipsychotika II. generace</b>	Clozapin, olanzapin, quetiapin, risperidon

### 2.2.1 Antipsychotika I. generace

Antipsychotika první generace jsou vysoce afinitní antagonisté dopaminových D<sub>2</sub> receptorů, které jsou neúčinnější proti psychotickým symptomům, ale mají vysokou míru neurologických vedlejších účinků, jako jsou extrapyramidové příznaky\* a tardivní dyskineze\*\*.[17] Mezi typická neuroleptika patří látky ze skupin fenothiazinů, butyrofenonů a thioxanthenů.

\*Extrapyramidové symptomy (EPS) jsou akutní nežádoucí účinky antipsychotik. Projevují se jako parkinsonismus, akutní akatize (nezvladatelný klid, přešlapování, pohupování, poposedávání) a akutní dystonie (křeče svalstva obvykle v oblasti šíje a obličeje).[14]

\*\*Tardivní dyskineze se typicky projevují jako mimovolné pohyby obličeje, úst, jazyka nebo choreiformní pohyby končetin či trupu. Jde o pozdní nežádoucí účinek antipsychotické léčby.[18]

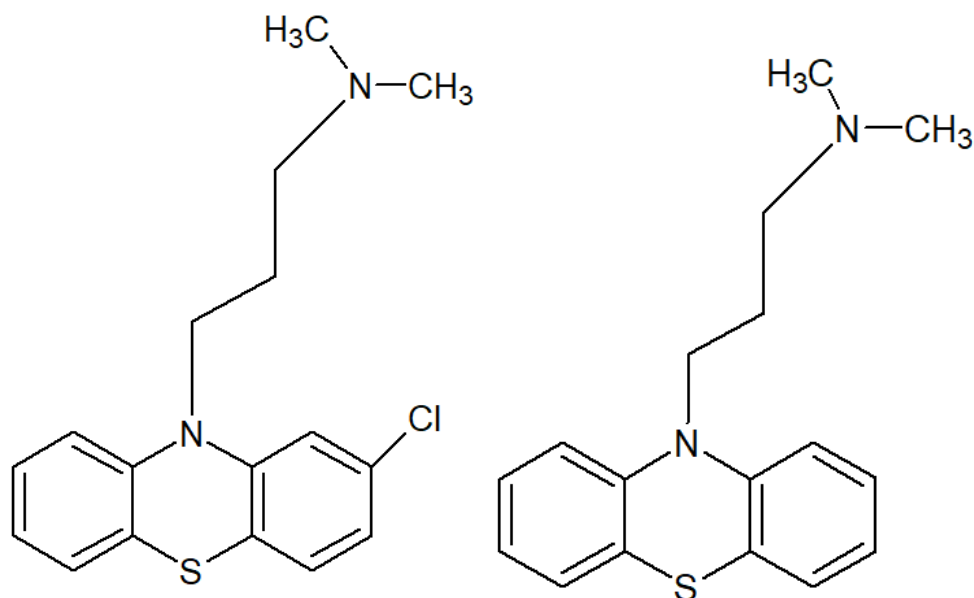
#### 2.2.1.1 Chlorpromazin

Chlorpromazin patří mezi fenothiazinová antipsychotická léčiva a se stal prvním syntetickým neuroleptikem, jehož antipsychotický účinek byl objeven v roce 1952.[14] Zavedení chlorpromazinu na počátku padesátých let vedlo k vývoji četných fenothiazinových analogů a k vývoji strukturně příbuzných tricyklických antidepresiv. Chlorpromazin je relativně silný blokátor dopaminového receptoru a má mírné antihistaminické a antiadrenergní účinky.[15]

Aktivním metabolitem chlorpromazinu je promazin.[19] Patří také mezi fenothiazinové deriváty a má menší antipsychotickou aktivitu než chlorpromazin. Jako lék se primárně používá jen při krátkodobé léčbě psychóz, avšak ve Spojených státech je zakázán.[20]

Tabulka III: Farmakokinetické informace chlorpromazinu, údaje převzaty z cit.[19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	300
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	7 – 119
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,02 – 3,0
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	1 – 44



Obr. 4: vlevo: chlorpromazin, vpravo: promazin

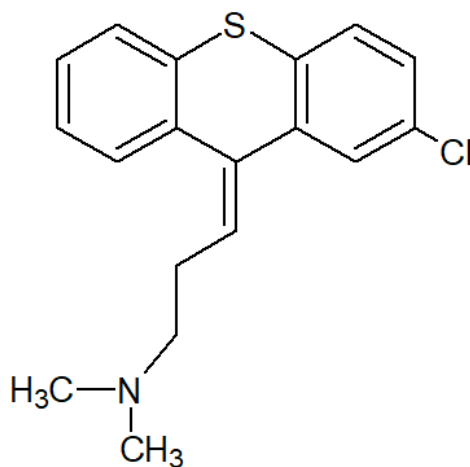
#### *HPLC metody stanovení chlorpromazinu*

Je popsána celá řada metod stanovení chlorpromazinu a dalších antipsychotických léčiv v biologických materiálech (krevní plasma, sérum, příp. mateřské mléko) pomocí HPLC s UV nebo elektrochemickou detekcí. Smith a kol. [21] popsali rychlou a spolehlivou metodu stanovení chlorpromazinu a jeho několika metabolitů v systému reverzních fází metodou HPLC s UV detekcí při 254 nm. Separace probíhala na koloně C8 při isokratických podmínkách se složením mobilní fáze methanol / voda (55 : 45, v/v) obsahující 275 mM metylamin hydrochloridu a 25 mM hydrogenfosforečnan sodný

(pH 6,75). Stanovení chlorpromazinu v séru a mateřském mléce metodou HPLC s UV detekcí ukázali Ohkubo a kol. [22]. Chlorpromazin byl separován na analytické koloně C8 s mobilní fází obsahující dihydrogenfosforečnan draselný (pH 4,5) a acetonitril v poměru 65 : 35 (v/v), detekce probíhala při 254 nm. Stanovení metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na GCE při + 950 mV vs. Ag/AgCl popsali Murakami a kol. [23]. Jejich metoda byla úspěšně aplikována na současné stanovení chlorpromazinu a levomepromazinu v lidské plasmě a moči. Midha a kol. [24] popsali metodu HPLC - UV s použitím kyano (CN) kolony. Mobilní fáze obsahovala 4% 0,06 M octanu sodného a 4% 0,06 M octanu amonného v acetonitrilu (92%) obsahující 0,05% diethylaminu, detektor byl nastaven na 248 nm.

### 2.2.1.2 Chlorprothixen

Chlorprothixen patří mezi thioxanthenová antipsychotická léčiva s nízkou antipsychotickou účinností.[25] Strukturně se podobá fenothiazinům a má podobné vlastnosti jako chlorpromazin.



Obr. 5: Chlorprothixen

#### *HPLC metody stanovení chlorprothixenu*

V práci Brookse a kol. [26] popsali stanovení chlorprothixenu a jeho sulfoxidových metabolitů v krevní plasmě metodou HPLC s detekcí UV při 229 nm. Separace probíhala na CN koloně se složením mobilní fáze acetonitril a 20 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH 4,5) v objemovém poměru 60 : 40. Další práci s použitím CN kolony popsali

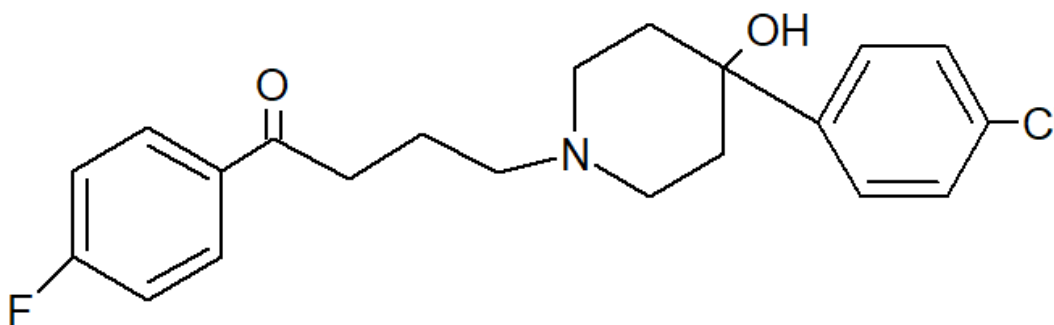
Wallace a kol. [27] Detekce probíhala elektrochemicky na GCE při + 900 mV vs. Ag/AgCl a složení MF bylo acetonitril a 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (45 : 55, v/v).

### 2.2.1.3 Haloperidol

Haloperidol patří mezi butyrofenonová antipsychotická léčiva. Je uznávaným standardem mezi antipsychotiky. Díky svým výhodným vlastnostem, jako je jeho dobrá snášenlivost, patří mezi nejčastěji používaná.[14]

Tabulka IV: Farmakokinetické informace haloperidolu, údaje převzaty z cit.[19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	8
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	14 – 41
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,005 – 0,05
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	> 1



Obr. 6: Haloperidol

#### *HPLC metody stanovení haloperidolu*

Stanovení haloperidolu v plasmě metodou HPLC popsali Dhar a Kutt.[28] Separace probíhala v systému reverzních fází na koloně C8, mobilní fáze se skládala z 300 ml 16,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7), 450 ml acetonitrilu a 250 ml methanolu. Jako detektor byl použit UV detektor při vlnové délce 254 nm. Další práci stanovení haloperidolu a jeho tří hlavních metabolitů v lidské plasmě metodou HPLC – UV ukazují Aboul-Enein a kol.[29] V této studii byla použita kolona C18, MF byla připravena z acetonitrilu a 100 mM fosfátového pufru (pH 3,5) v poměru 20 : 80 (v/v) a detekce probíhala při vlnové délce



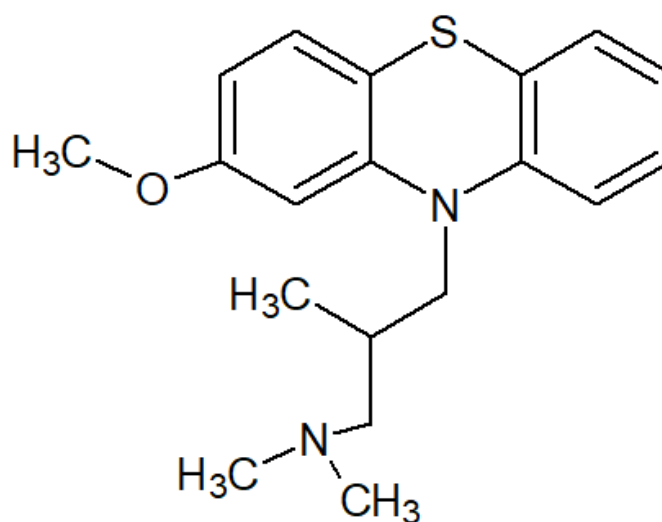
230 nm. Použití CN kolony s EC detekcí pro stanovení haloperidolu v séru a plasmě popisují ve své práci Korpi a kol. [30] EC detekce probíhala na elektrodě ze skleného uhlíku při + 900 mV vs. Ag/AgCl, mobilní fáze obsahovala 40 mM fosfátový pufr (pH 6,8) s přídatkem 5 M KOH a acetonitril (55 : 45, v/v).

#### 2.2.1.4 Levomepromazin

Levomepromazin jiným názvem Methotrimeprazin stejně jako chlorpromazin patří do skupiny fenothiazinů. Kromě antipsychotického vlivu se vyznačuje také sedativním až hypnotickým účinkem. Může být tedy vhodný pro agresivní a vysoce neklidné pacienty.[14, 31]

Tabulka V: Farmakokinetické informace levomepromazinu, údaje převzaty z cit. [19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	300
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	17 – 78
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,05 – 0,14
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,8 – 4,1



Obr. 7: Levomepromazin

## *HPLC metody stanovení Levomepromazinu*

Současné stanovení levomepromazinu a chlorpromazinu s EC detekcí je uvedeno již ve zmíněné článku Murakami a kol.[23] Další metodu stanovení levomepromazinu, chlorprothixenu a promethazinu v séru metodou HPLC – ED popisují ve své práci Bagli a kol.[32] Separace probíhala na již několikrát zmiňované CN koloně, tentokrát ve složení mobilní fáze acetonitril, pyridin a octan sodný (698 : 2 : 300, v/v/v). Levomepromazin byl měřen při potenciálu + 650 mV. Simultánní determinaci levomepromazinu a clozapinu a jejich metabolitů s UV detekcí v krevní plasmě zmiňují ve své studii Mercolini a kol.[33] Rozdělení probíhalo na reverzní fázi C8 s mobilní fází acetonitril, fosfátový pufr (34 mM, pH 2,0) v poměru 29 : 71 (v/v). Detektor byl nastaven na vlnovou délku 254 nm.

### **2.2.2 Antipsychotika II. generace**

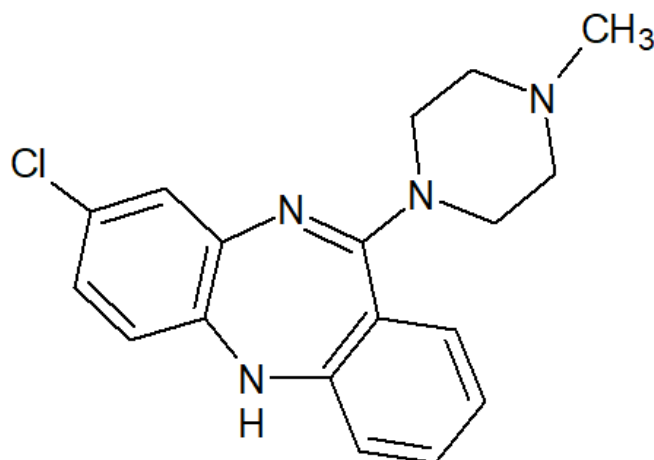
Úsilí najít účinnější léčbu s menším rizikem vedlejších účinků vedlo k vývoji antipsychotik II. generace. Prvním AP této generace se stal clozapin, následoval risperidon, olanzapin, quetiapin a v nedávné době byl vyvinut nejnovější aripirazol [34], který bývá označován jako AP třetí generace.[35] Atypická antipsychotika jsou charakterizována nižším výskytem extrapyramidových symptomů.[14] Toho lze terapeuticky využít jak vůči pozitivním psychotickým příznakům (halucinace, bludy, agresivita, dezorganizace myšlení), tak i negativním (autismus, hypobulie, emoční a afektivní oploštělost).[36]

#### **2.2.2.1 Clozapin**

Clozapin jako první prototyp atypických antipsychotik je derivát dibenzodiazepinu patřící mezi multireceptorové antagonisty (MARTA – multi acting receptor targeted agents).[14] To znamená, že clozapin má komplexní mechanismus účinku, který působí na více receptorech neurotransmiterů, včetně dopaminových, serotoninových,  $\alpha$ -adrenergických a muskarinových receptorů.[15]

Tabulka VI: Farmakokinetické informace clozapinu, údaje převzaty z cit.[19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	300
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	6 – 7
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,2 – 0,7
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	1,2 – 13,0



Obr. 8: Clozapin

#### *HPLC metody stanovení clozapinu*

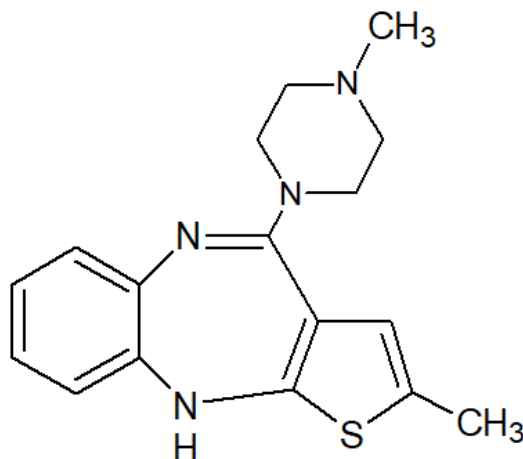
Monitorování hladiny clozapinu a jeho aktivních metabolitů v plasmě schizofrenických pacientů metodou HPLC – ED popisují Raggi a kol.[37] V této studii byla použita kolona RP – C18 a složení mobilní fáze bylo acetonitril, methanol a fosfátový pufr (10,4 mM, pH 1,9) v objemovém poměru 17,5 : 20 : 62,5. Amperometrická detekce probíhala na grafitové elektrodě při vloženém potenciálu + 800 mV. Současné stanovení clozapinu a risperidonu technikou HPLC – UV v krevní plasmě je uvedeno v práci Shena a kol.[38] Analyty byly separovány na koloně C18 a mobilní fáze obsahovala methanol, vodu a dimethylamin (60 : 40 : 0,04, v/v/v). Detekční vlnová délka byla 280 nm. Chromatografická separace clozapinu a jeho dvou hlavních metabolitů v lidské plasmě na analytické koloně C6 s UV detekcí je zmíněna v článku Avenosi a kol.[39] Mobilní fáze obsahovala acetonitril a 0,06 M fosfátový pufr (pH 2,7) smíchané v poměru 48 : 52 (v/v), detektor byl nastaven na vlnovou délku 254 nm.

#### **2.2.2.2 Olanzapin**

Olanzapin je svojí molekulovou strukturou podobný clozapinu [40] a taktéž se řadí do skupiny multireceptorových antagonistů (MARTA).[14] Je to derivát thienobenzodiazepinu a pod obchodním názvem je znám jako Zyprexa.[41]

Tabulka VII: Farmakokinetické informace olanzapinu, údaje převzaty z cit. [19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	10
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	21 – 54
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,009 – 0,026
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	1,2



Obr. 9: Olanzapin

#### *HPLC metody stanovení olanzapinu*

Pro stanovení olanzapinu v biologických materiálech metodou HPLC najdeme hned několik odborných článků. Například Kasper a kol. [41] popisují kvantifikaci olanzapinu v mateřském mléce pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému reverzních fází s elektrochemickou detekcí. Separace byla provedena na koloně YMC basic s mobilní fází obsahující 75 mM fosfátový pufr (pH 7), methanol a acetonitril (48 : 26 : 26, v/v/v) a detekce probíhala na coulometrickém detektoru. Amperometrickou detekci uvedli ve své práci Raggi a kol. [42], ve které analyzovali olanzapin a jeho metabolit v lidské plasmě. K rozdělení látek došlo na koloně RP – C8 s použitím acetonitrilu a fosfátového pufru (pH 3,8) jako MF smíchané v poměru 20 : 80 (v/v). Detekce proběhla na elektrodě ze skelného uhlíku při + 800 mV vs. Ag/AgCl. Práci zabývající se metodou HPLC – UV uvedli Boulton a kol. [43], jako kolona byla použita Supelcosil LC-CN, mobilní fáze se skládala z 10 % methanolu, 25 % acetonitrilu a 65 % 50 mM fosfátového pufru (pH 6).

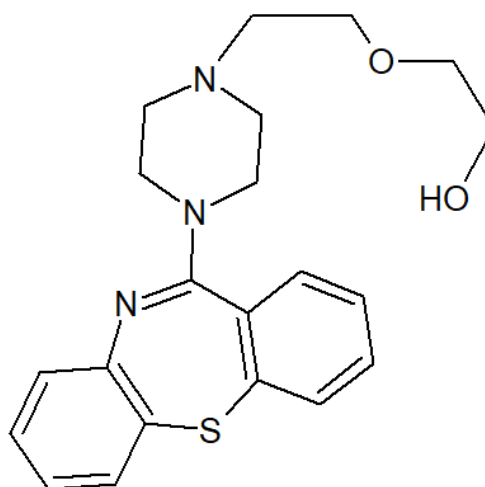
Detekce olanzapinu na UV detektoru probíhala při 214 nm. Rychlou metodu determinace olanzapinu v plasmě s použitím UV detekce popsali Dusci a kol. [44]. Separace bylo dosaženo na koloně RP - C18 s použitím MF 14 % acetonitrilu ve vodě (obsahující 0,25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,05 % triethylaminu). Vlnová délka UV detektoru byla nastavena na hodnotu 270 nm.

### 2.2.2.3 Quetiapin

Quetiapin je derivát dibenzothiazepinu a je třetím zástupcem ze skupiny MARTA.[14]

Tabulka VIII: Farkokinetické informace quetiapinu, údaje převzaty z cit. [19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	400
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	5 – 8
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,19 – 0,63
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,24 – 4,0



Obr. 10: Quetiapine

#### *HPLC metody stanovení quetiapinu*

Stanovení quetiapinu v plasmě metodou kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí popsali ve své studii Mandrioli a kol.[45] Analýzy byly provedeny na chromatografické koloně C18 s použitím mobilní fáze sestávající

z 15,4 mM fosfátového pufru (pH 1,9), acetonitrilu a methanolu (72 : 12 : 16, v/v/v). Detektor byl nastaven na vlnovou délku 254 nm. Davis a kol. [46] ve své práci popisují detekci quetiapinu s využitím UV detektoru a detekci jeho metabolitů pomocí elektrochemické detekce. HPLC systém zahrnoval tedy jak UV detektor, tak i EC detektor, separace bylo dosaženo na koloně ZORBAX (SB – Ph), mobilní fáze obsahovala 20 mM fosfátový pufr (pH 7,4), methanol a acetonitril (40 : 50 : 10, v/v/v). Detekce quetiapinu probíhala na UV detektoru při 225 nm, zatímco detekce metabolitů při potenciálu + 550 mV.

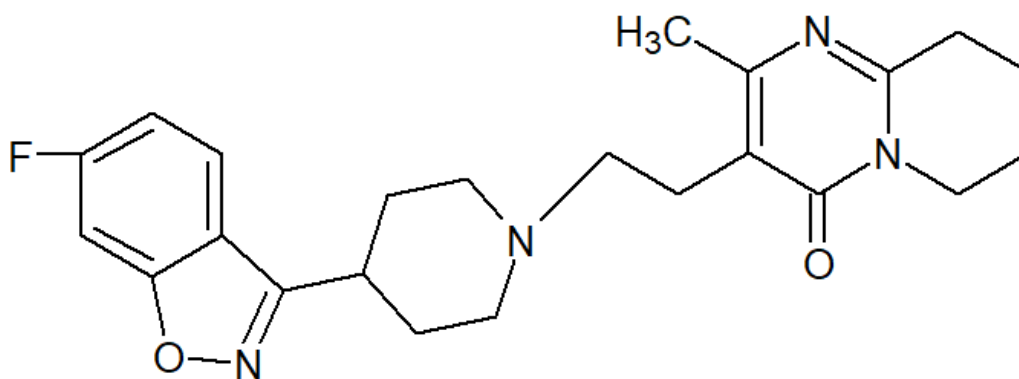
#### 2.2.2.4 Aripiprazol a Risperidon

Aripiprazol je piperazinový a chinolinový derivát. Jeho mechanismus účinku se liší od všech doposud popsáných antipsychotik. Všechna současná neuroleptika, jak typická, tak i atypická vytvářejí svůj antipsychotický účinek blokováním dopaminových receptorů, to znamená, že jsou antagonisty D<sub>2</sub> receptorů. Aripiprazol však projevuje svůj účinek částečným agonismem dopaminových receptorů [35, 47], v závislosti na koncentraci specifického neurotransmiteru může být agonistou (stimuluje dopaminové receptory) nebo antagonistou (inhibuje D<sub>2</sub> receptory).[48] Proto je aripiprazol označován jako první antipsychotikum třetí generace.

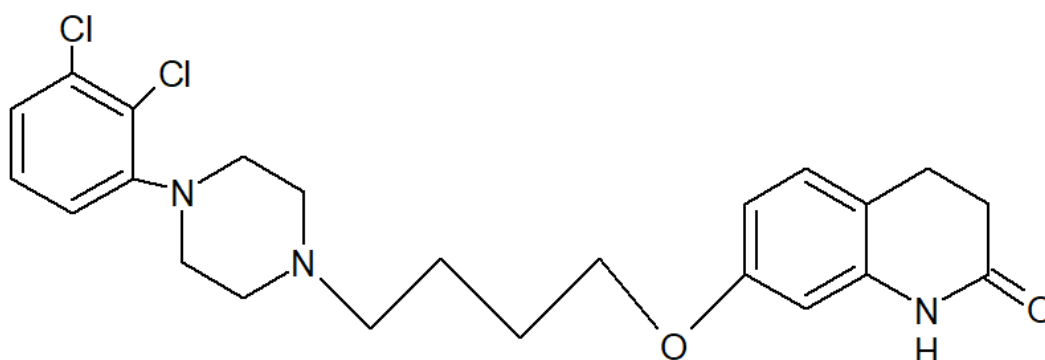
Risperidon jako další zástupce atypických antipsychotik při léčbě schizofrenie je derivátem benzisoxazolu. Patří mezi antagonisty serotoninových a dopaminových receptorů (SDA – serotonin dopamine antagonists) a je jedním z nejčastěji používaných atypických antipsychotik.[14]

Tabulka IX: Farmakokinetické informace risperidonu, údaje převzaty z cit. [19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	5
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	3 – 20
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,004 – 0,008
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	1,8



Obr. 11: Risperidon



Obr. 12: Aripiprazol

#### *HPLC metody stanovení aripiprazolu a risperidonu*

Jednoduchý způsob stanovení aripiprazolu v séru pro terapeutické monitorování léčiv popisují ve své práci Synowiec a kol.[49] Byla použita kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. K rozdělení analytů došlo na koloně C8 a mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a trimethyl amonného pufru (62 : 38, v/v). Hodnota vlnové délky při detekci byla nastavena na 214 nm.

Elektrochemické stanovení risperidonu v plasmě a jeho aktivního metabolitu pomocí HPLC – ED uvádějí se své práci Le Moing a kol.[50] Chromatografický experiment byl realizován na analytické koloně obsahující kyano skupiny (CN kolona), isokratická eluce byla provedena pomocí acetonitrilu a 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5). Aplikovaný potenciál na coulochemickém detektoru byl + 800 mV. Metoda HPLC – UV pro stanovení risperidonu

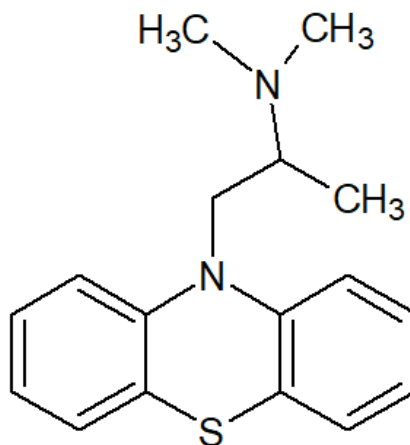
v plasmě je popsána v článku Angeli Avenosi a kol.[51] Separace probíhala na koloně C18 s mobilní fází dihydrogenfosforečnan draselný 0,05 M (pH 3,7) a acetonitril v objemovém poměru 70 : 30. Analyty byly detekovány pomocí UV detektoru nastaveného na vlnovou délku 278 nm. Separaci na analytické koloně C8 za podmínek mobilní fáze NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a acetonitril (55 : 45, v/v) a UV detekci při 280 nm charakterizovali Foroutan a kol.[52]

### 2.2.2.5 Promethazin

Promethazin byl dříve používán jako antipsychotikum, pro tento účel už se však nepodává. I když je to derivát fenothiazinu, je strukturně odlišný od antipsychotických fenothiazinů. Promethazin je antagonist histaminového H<sub>1</sub> receptoru, je tedy především antihistaminikem (proti alergiím).[53]

Tabulka X: Farmakokinetické informace promethazinu, údaje převzaty z cit. [19]

<b>Definovaná denní dávka (mg/d)</b>	–
<b>Poločas eliminace (h, rozsah)</b>	9 – 16
<b>Typická terapeutická koncentrace v krvi (mg/l)</b>	0,006 – 0,1
<b>Smrtelná koncentrace v krvi (mg/l)</b>	> 2,4



Obr. 13: Promethazin



### *HPLC metody stanovení promethazinu*

Kvantifikaci promethazinu v lidském séru metodou HPLC – ED popsali Fox a McLoughlin.[54] Analýza byla uskutečněna na CN koloně s použitím mobilní fáze obsahující acetonitril – methanol – isoporanol – vodu – 1,0 M octan amonný, pH 7,2 (83 : 5 : 5 : 6,65 : 0,35, v/v/v/v/v). Potenciál na coulochemickém detektoru byl + 700 mV. Simultánní stanovení promethazinu a jeho metabolitů v plasmě s použitím elektrochemického i UV detektoru nastínili ve své práci Vanapalli a kol.[55] Pro analytickou separaci byla použita CN kolona, mobilní fáze byla směsí methanolu, 0,15 M octanu amonného (pH 5,0) a vody (38 : 50 : 12, v/v/v). Vlnová délka pro UV detektor byla nastavena na 236 nm, potenciál pro elektrochemický detektor + 800 mV.

Stanovení antipsychotik je možné i jinými metodami, než uvedené metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV nebo elektrochemickou detekcí. Existují například články na plynovou chromatografii (GLC) [56] nebo HPLC s hmotností detekcí (HPLC – MS).[57, 58] Tato stanovení však nejsou předmět diplomové práce, proto jsem se jimi nezabývala.

Tabulka XI: Celkový přehled metod

Látka	Citace	Metoda	E / $\lambda$	Kolona	MF
<b>Chlorpromazin</b>	21	HPLC - UV	254 nm	C8	MeOH, pufr (pH 6,75) 55:45
	22	HPLC - UV	254 nm	C8	pufr (pH 4,5), ACN 65:35
	23	HPLC - ED	950 mV vs. Ag/AgCl	C18	pyridin, THF, ACN, pufr (pH 3,5) 0,1:1:68,9:30
	24	HPLC - UV	248 nm	CN	ACN, octan sodný a amonný 92:4:4
<b>Chlorprothixen</b>	26	HPLC - UV	229 nm	CN	ACN, pufr (pH 4,5) 60:40
	27	HPLC - ED	900 mV vs. Ag/AgCl	CN	ACN, pufr 45:55
<b>Haloperidol</b>	28	HPLC - UV	254 nm	C8	pufr (pH 7), ACN, MeOH 30:45:25
	29	HPLC - UV	230 nm	C18	pufr (pH 3,5), ACN 80:20
	30	HPLC - ED	900 mV vs. Ag/AgCl	CN	pufr (pH 6,8), ACN 55:45
<b>Levomepromazin</b>	23	HPLC - ED	950 mV vs. Ag/AgCl	C18	pyridin, THF, ACN, pufr (pH 3,5) 0,1:1:68,9:30
	32	HPLC - ED	650 mV vs. Ag/AgCl	CN	ACN, pyridin, octan sodný 69,8:0,2:30
	33	HPLC - UV	254 nm	C8	ACN, pufr (pH 2) 29:71
<b>Clozapin</b>	37	HPLC - ED	800 mV vs. Ag/AgCl	C18	pufr (pH 1,9), ACN, MeOH 62,5:17,5:20

<b>Clozapin</b>	38	HPLC - UV	280 nm	C18	MeOH, H <sub>2</sub> O, diethylamin 60:40:0,04
	39	HPLC - UV	254 nm	C6	ACN, pufr (pH 2,7) 48:52
<b>Olanzapin</b>	41	HPLC - ED	-	YMC	MeOH, ACN, pufr (pH 7) 26:26:48
	42	HPLC - ED	800 mV vs. Ag/AgCl	C8	ACN, pufr (pH3,8) 20:80
	43	HPLC - UV	214 nm	CN	pufr (pH 6), ACN, MeOH 65:25:10
	44	HPLC - UV	270 nm	C18	14% ACN ve vodě
<b>Quetiapin</b>	45	HPLC - UV	254 nm	C18	pufr (pH 1,9), ACN, MeOH 72:12:16
	46	HPLC – UV/ED	225 nm, 550 mV vs. Ag/AgCl	ZORBAX	ACN, MeOH, pufr (7,4) 10:50:40
<b>Aripiprazol</b>	49	HPLC - UV	214 nm	C8	ACN, pufr 62:38
<b>Risperidon</b>	50	HPLC - ED	800 mV vs. Ag/AgCl	CN	pufr (pH 6,5), ACN 40:60
	51	HPLC - UV	278 nm	C18	pufr (pH 3,7), ACN 70:30
	52	HPLC - UV	280 nm	C8	pufr (pH 6), ACN 55:45
<b>Promethazin</b>	54	HPLC - ED	700 mV vs. Ag/AgCl	CN	ACN, MeOH, isopropanol, H <sub>2</sub> O, octan amonný 83:5:5:6,65:0,35
	55	HPLC – UV/ED	236 nm, 800mV vs. Ag/AgCl	CN	octan amonný (pH 5), MeOH, H <sub>2</sub> O 50:38:12

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

K práci byl použit dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo), hydroxid sodný (Fluka, Německo), 85% kyselina orthofosforečná (Sigma-Aldrich, Německo), všechny tyto chemikálie byly analytické čistoty (p.a.). Dále byl použit methanol pro HPLC (VWR Chemicals, Francie), acetonitril pro HPLC (VWR Chemicals, Francie). K rozpuštění jednotlivých roztoků byla použita ultračistá deionizovaná voda (systém Millipore Smart Direct Q-3 UV, Merci, Česká republika).

Zásobní roztoky antipsychotických léčiv byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství v Olomouci. Roztoky AP o různých koncentracích byly připraveny ředěním ultračistou deionizovanou vodou.

### 3.2 Příprava mobilní fáze

Fosfátový pufr o různých koncentracích (10, 25, 50 a 100 mmol·l<sup>-1</sup>) byl připraven rozpuštěním příslušné navážky NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v deionizované vodě. Pomocí přídavků kyseliny fosforečné nebo hydroxidu sodného bylo upravováno pH na dané hodnoty (2,5 – 8,5). Takto připravený pufr byl přefiltrován přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,2 μm. MF byla připravena smícháním fosfátového pufru a 100 % acetonitrilu (ACN) v různých objemových poměrech. Před zavedením do chromatografického systému byla MF probublána heliem.

### 3.3 Cyklická voltametrie

Měření cyklické voltametrie (CV) probíhalo v tříelektrodovém zapojení s využitím Nanoampere electrochemical workstation (L-Chem, Česká republika). Pracovní elektrodou byla tuha s označením 0,2 B (Ain STEIN, Japonsko), jako referenční elektroda byla použita argentochloridová elektroda a šroub z nerezové oceli na dně cely posloužil jako pomocná elektroda. Pro měření cyklických voltamogramů byly nastaveny tyto parametry: skenovací rychlost 50 mV/s, počet cyklů 2, skenovací přírůstek 1 mV, prodlení před

měřením 5 s a potenciálové okno 150 – 1500 mV (popř. 150 – 1900 mV) vs. Ag/AgCl. Měření probíhalo v miniaturizované cele, jejíž objem činil 350  $\mu$ l (viz obr. 14).



Obr. 14: Cella pro CV

### 3.4 Injekční průtoková analýza

Injekční průtoková analýza (FIA) probíhala na přístroji Shimadzu bez připojené chromatografické kolony. Na pracovní elektrodu byl vkládán potenciál v rozmezí 700 - 1400 mV vs. Ag/AgCl. MF obsahovala 25  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátový pufr a acetonitril smíchané v poměru 70 : 30 (v/v), pH pufru bylo v rozmezí 2,5 – 8,5. Průtok MF činil 0,5 ml/min. Nástřikový ventil byl vybaven 20  $\mu$ l smyčkou, do které bylo nastřikováno 5  $\mu$ l roztoků jednotlivých látek o koncentraci 10  $\mu$ M. Detekce probíhala v tříelektrodovém zapojení v průtokové cele (viz podkapitola 3.6).

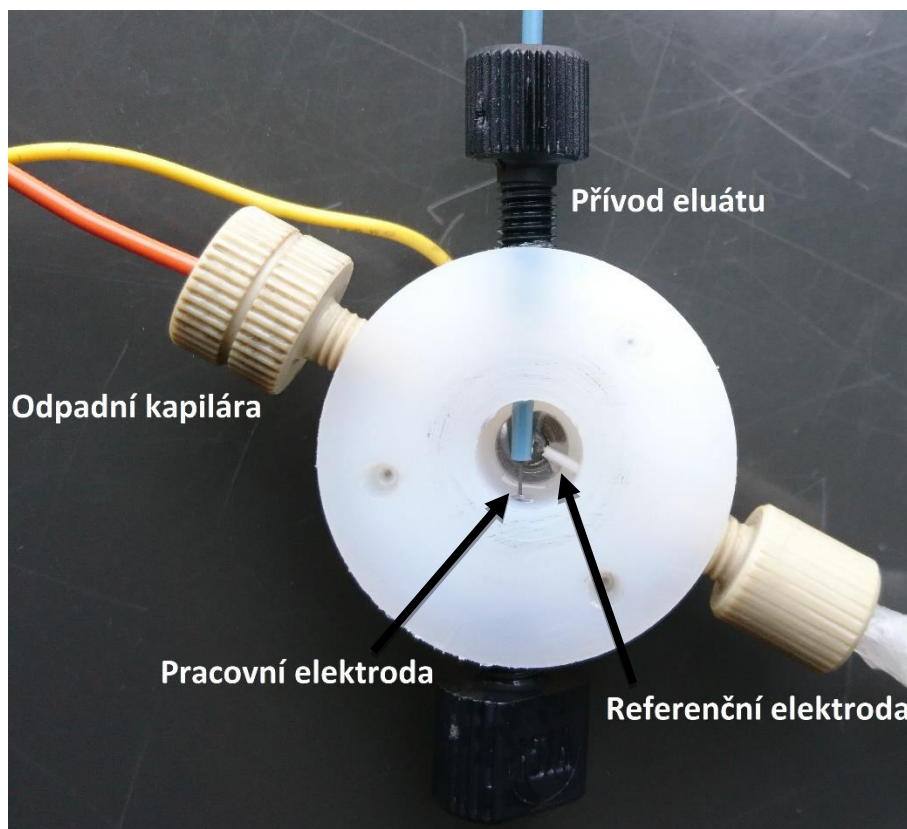
### 3.5 Chromatografie

HPLC měření byla provedena na přístroji sestávajícího z isokratické pumpy LC - 10AD, termostatu kolony CTO – 10AC (vše SHIMADZU, Japonsko), chromatografické kolony EC 250/2 NUCLEODUR ® C8 Gravity, 5  $\mu$ m, 250 x 2,1 mm I. D. (Machery-Nagel, Německo) a potenciostatu Coulochem III (ESA, USA). Vzorby byly nastřikovány do

manuálního nástřikového ventilu se smyčkou 20  $\mu\text{l}$  (Rheodyne, USA). Nástřik byl prováděn technikou přeplňování smyčky. MF obsahovala fosfátový pufr (o různých koncentracích a pH) a acetonitril smíchané v různých poměrech. Finální MF byla složena z 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru o pH 7,5 a acetonitrilu míchaných v objemovém poměru 49 : 51. Průtok MF činil 0,3 ml/min. Teplota kolony byla 45 °C a pracovní potenciál na elektrodě byl 1000 mV vs. Ag/AgCl.

### 3.6 EC detekce v průtokových systémech

Elektrochemická měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda (WE) byla použita tuha 0,2B (Ain STEIN, Japonsko) a jako pomocná elektroda posloužil nerezový šroub zabudovaný na dně cely. Jako referenční elektroda byla použita argentochloridová elektroda vyrobená v naší laboratoři. Byla tvořena stříbrným drátkem pokrytá vrstvičkou AgCl, který byl vložen do pipetové špičky (Brand, 0,5 – 20  $\mu\text{l}$ , 46 mm). Úzký konec špičky byl utěsněn kousky nylonového filtru (LUBITECH, 47 mm, 0,2  $\mu\text{m}$ ). Široký konec byl utěsněn parafilmem (Parafilm M), ze kterého vyčníval kovový kontakt připájený ke stříbrnému drátku. Vnitřní prostor špičky byl naplněn 3  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl. Prvotní experimenty (podkapitoly 4.1 až 4.3.2) byly měřeny s referenční elektrodou, jejíž potenciál byl oproti standardní Ag/AgCl elektrodě posunut o + 350 mV. Před měřením v kapitole 4.3.3 byla špičková referenční elektroda regenerována a její potenciál odpovídal standardní Ag/AgCl elektrodě (3  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl). Cella byla navržena a vyrobena doc. RNDr. Janem Hrbáčem, PhD. (viz obr. 15). PEEKová kapilára (I. D. 250  $\mu\text{m}$ ) byla pomocí jehly insulinové mikrostříkačky rozšířena na cca 320  $\mu\text{m}$ . Do rozšířené části kapiláry byla vsunuta tuha o rozměru 270  $\mu\text{m}$ . Takto připravený senzor byl vložen a utěsněn do detektorové cely. Poté byla cela uzavřena horní částí a připojena do chromatografického systému.



Obr. 15: Detekční cela pro průtoková měření

### 3.7 Zpracování výsledků

Naměřená data a vytvořené grafy pro CV byly zpracovány pomocí programů eL - Chem Viewer (L-Chem, Česká republika) a OriginPro 8 (OriginLab, USA). Výsledky měření FIA a HPLC byly zpracovány pomocí Clarity Lite (Data Apex, Česká republika) a OriginPro 8 (OriginLab, USA).

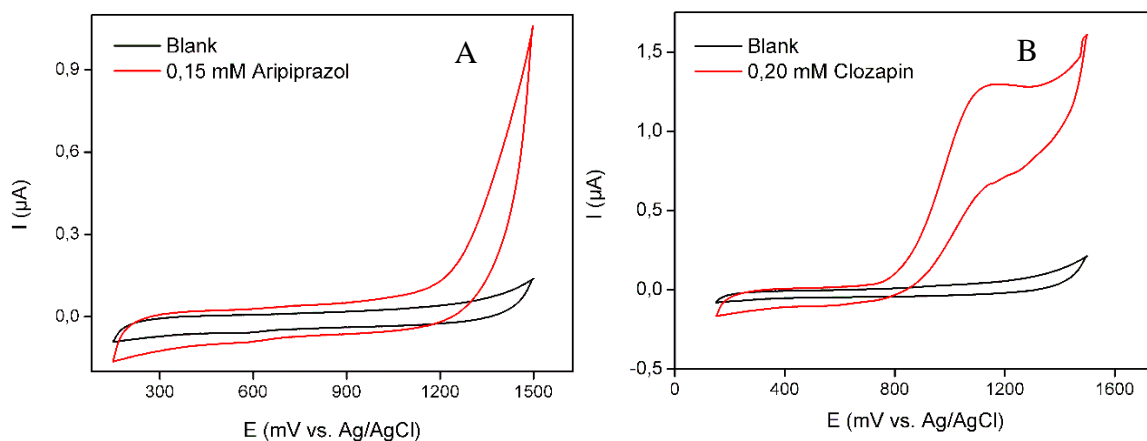
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem práce bylo nalezení optimálních podmínek separace antipsychotických léčiv a jejich následné elektrochemické detekce.

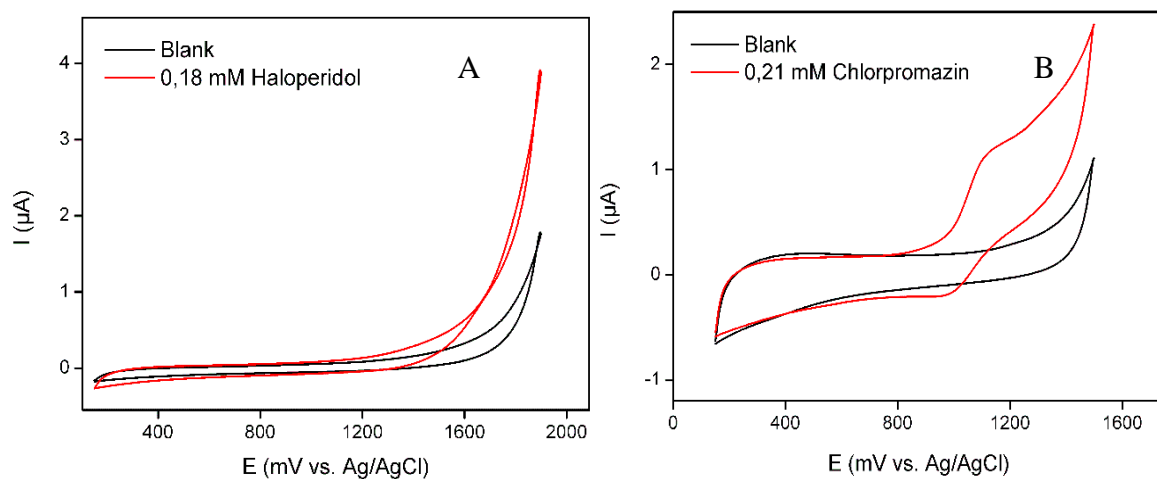
### 4.1 Charakterizace látek CV

Jako první byly proměřeny cyklické voltamogramy pro zjištění průběhu elektrochemické reakce všech uvedených AP. Měření probíhalo v prostředí  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (blank) při vloženém potenciálu  $150 - 1500 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , pouze v případě chlorprothixenu (obr. 18 A) a haloperidolu (obr. 17 A) bylo potenciálové okno upraveno na rozsah  $150 - 1900 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ . Z CV aripiprazolu (obr. 16 A) můžeme vidět, že k nárůstu signálu dochází od  $900 \text{ mV}$ , typický pík však nepozorujeme. Naopak u clozapinu (obr. 16 B) pozorujeme ireverzibilní děj, kdy k nárůstu signálu dochází od  $800 \text{ mV}$  s oxidačním píkem, jehož maximum je okolo  $1100 \text{ mV}$ . Levomepromazin (obr. 18 B), má charakter relativně reverzibilního děje, maximum píku se nachází při  $1000 \text{ mV}$ . Podobný průběh je patrný i u chlorpromazinu (obr. 17 B). U promethazinu (obr. 19 B) dochází k vícekrokové oxidaci, největší pík má své maximum při  $1200 \text{ mV}$ . Signál olanzapinu (obr. 19 B) je patrný od  $800 \text{ mV}$ , z CV můžeme soudit, že v rozmezí  $800 - 1200 \text{ mV}$  vidíme náznak píku. Nejnižšího proudu při  $1500 \text{ mV}$  dosahují chlorprothixen, risperidon a haloperidol. Nejvyššího proudu při této hodnotě dosahují levomepromazin, promethazin a chlorpromazin.

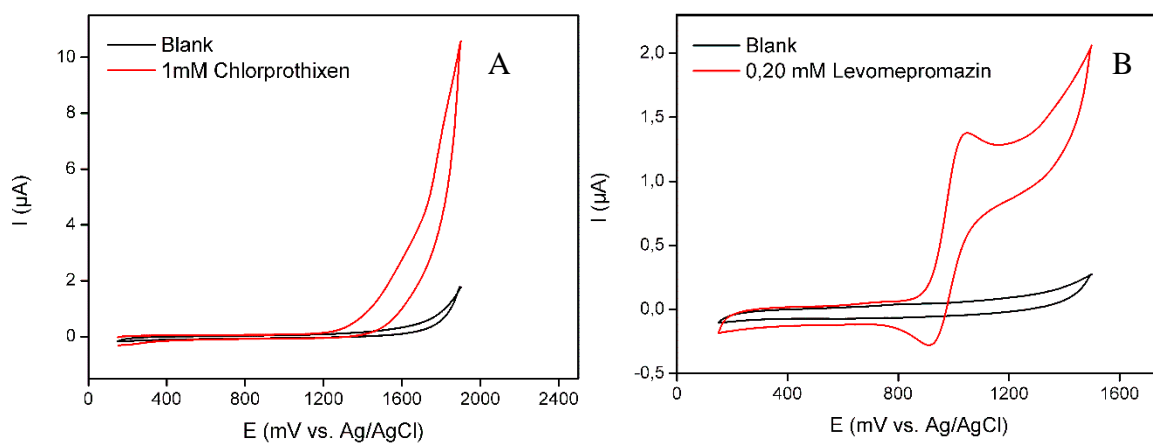




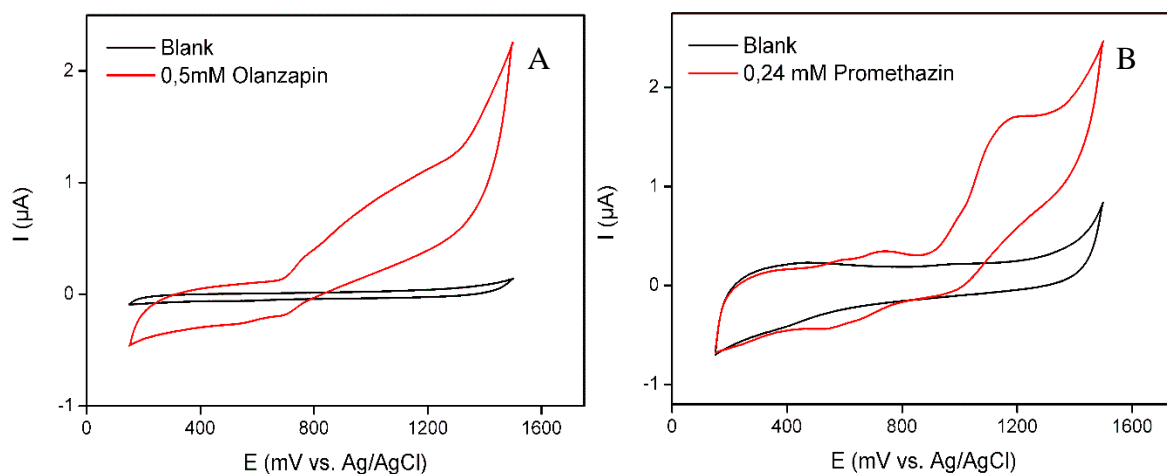
Obr. 16: Záznam cyklického voltamogramu, a)  $0,15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  aripiprazolu, b)  $0,20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  clozapinu, ZE  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , skenovací rychlost  $50 \text{ mV/s}$ .



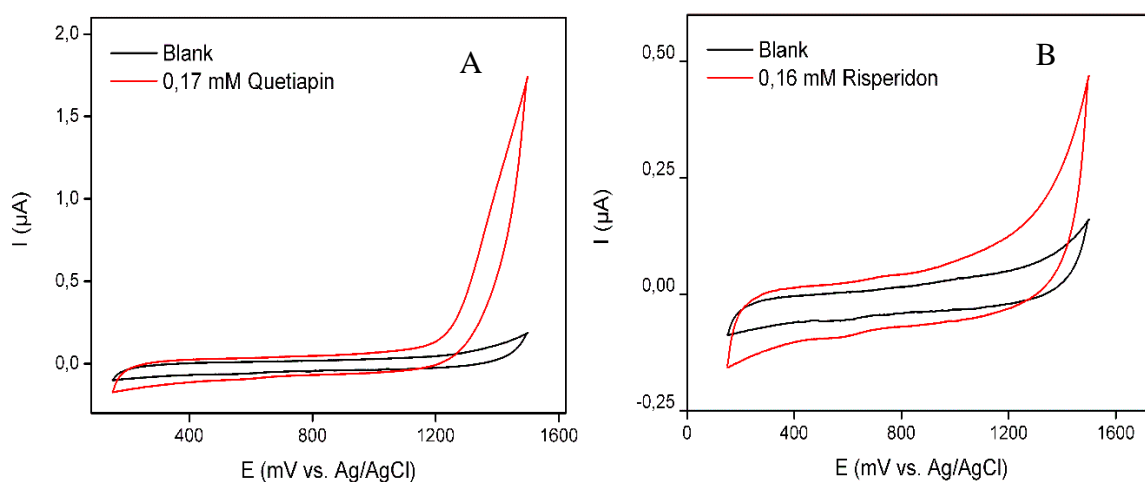
Obr. 17: Záznam cyklického voltamogramu, a)  $0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  haloperidolu, b)  $0,21 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , ZE  $100 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , skenovací rychlost  $50 \text{ mV/s}$ .



Obr. 18: Záznam cyklického voltamogramu, a)  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorprothixenu, b)  $0,20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  levomepromazinu, ZE  $100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ , skenovací rychlost  $50 \text{ mV/s}$ .



Obr. 19: Záznam cyklického voltamogramu, a)  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  olanzapinu, b)  $0,24 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  promethazinu, ZE  $100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ , skenovací rychlost  $50 \text{ mV/s}$ .



Obr. 20: Záznam cyklického voltamogramu, a)  $0,17 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  quetiapinu, b)  $0,16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  risperidonu, ZE  $100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ , skenovací rychlost  $50 \text{ mV/s}$ .

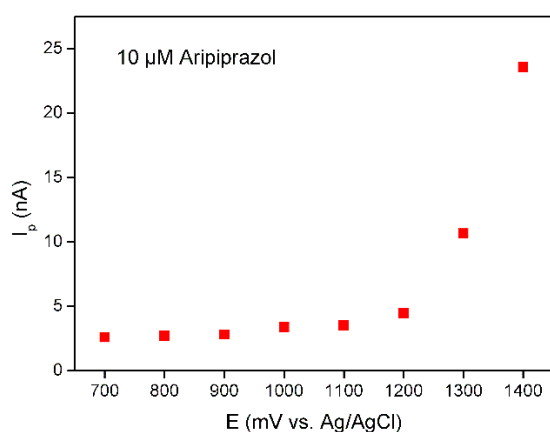
## 4.2 Experimenty FIA

Průtoková injekční analýza umožňuje okamžitou odezvu stanovovaných analytů, jelikož nedochází k separaci na chromatografické koloně. Těto výhody bylo využito k vytvoření hydrodynamických voltamogramů. Měření byly použity jednak k posouzení vlivu vkládaného pracovního potenciálu, a jednak k objasnění vlivu měnícího se pH fosfátového pufru na proudovou odezvu jednotlivých antipsychotických léčiv.

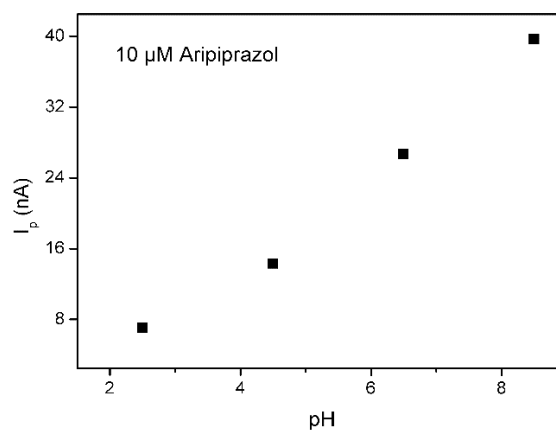
Jako první byla proměřena závislost vkládaného pracovního potenciálu na proudové odezvy jednotlivých analytů. Byla posuzována výška odezvy. Rozmezí vkládaného potenciálu na pracovní elektrodu bylo  $700 - 1400 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ . Při testování vlivu vkládaného pracovního potenciálu byla MF  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátový pufr (pH 4,5) a acetonitril (70 : 30, v/v). Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím se potenciálem dochází ke zvýšení odezvy. Také vidíme, že body v grafech relativně odpovídají tvaru záznamu dříve změřených cyklických voltamogramů jednotlivých AP.

Poté byla zjišťována závislost měnícího se pH fosfátového pufru použitého v MF na proudové odezvě analytů. Opět byla posuzována výška odezvy. Měření probíhala při nastaveném pracovním potenciálu na hodnotu  $1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$  a hodnoty pH pufru byly měněny o 2 jednotky v rozmezí 2,5 – 8,5. Z grafů je patrné, že i zde se zvyšujícím se pH dochází ke zvýšení odezvy.

Závislost proudové odezvy na vkládaném pracovním potenciálu u aripiprazolu téměř kopíruje tvar záznamu CV (srovnej obr. 16 A a obr. 21). Dochází k postupnému nárůstu výšky signálu, není patrný žádný schod. Odezva aripiprazolu narůstá se zvyšujícím se pH relativně lineárně. Při pH 8,5 je odezva pětinasobná oproti pH 2,5 (obr. 22).

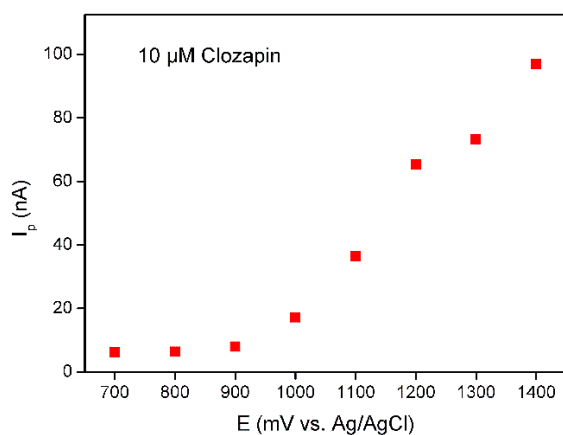


Obr. 21: Hydrodynamický voltamogram 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  aripiprazolu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

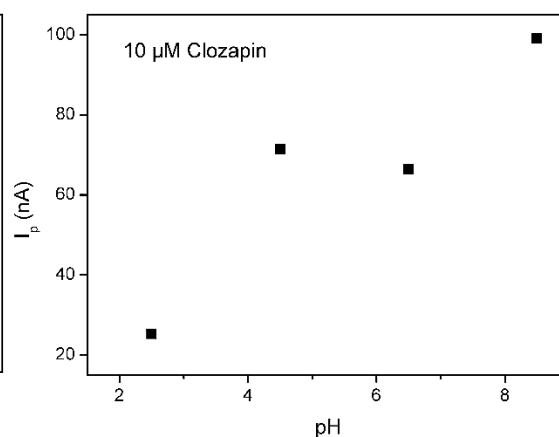


Obr. 22: Závislost proudové odezvy 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  aripiprazolu na pH, podmínky měření: E = 1300 mV vs. Ag/AgCl, MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Z hydrodynamického voltamogramu clozapinu (obr. 23) vidíme mírné zakřivení v záznamu při 1200 mV. To je souladu s CV, kde při podobném potenciálu vidíme oxidační pík. Závislost odezvy na pH (obr. 24) nemá lineární průběh jako u aripiprazolu. Nejprve odezva s pH 2,5 a 4,5 narůstá, při pH 6,5 však dochází k mírnému poklesu odezvy a poté se odezva opět s pH 8,5 zvyšuje. V literatuře [59] můžeme najít podobné chování závislosti odezvy na pH jako jsou naše výsledky.

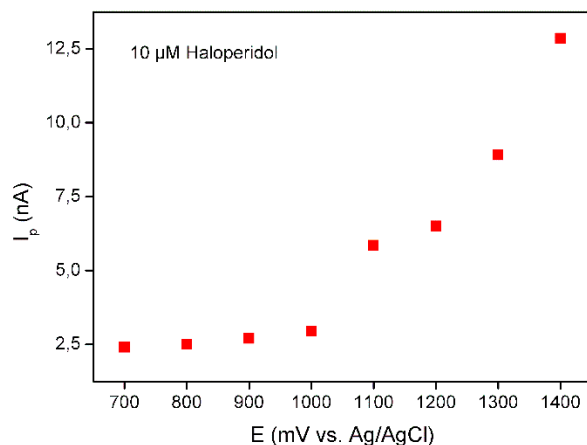


Obr. 23: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  clozapinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

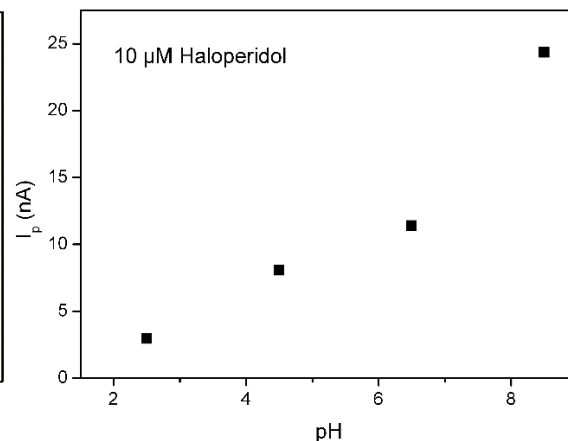


Obr. 24: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  clozapinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

V případě haloperidolu pozorujeme zvýšení odezvy (schod v záznamu) při 1100 mV (obr. 25). U CV však není žádný oxidační pík patrný a křivka záznamu má hladký průběh. Závislost odezvy na pH (obr. 26) je stejně jako u aripiprazolu téměř lineární a dochází k postupnému zvyšování výšky odezvy. Největší rozdíl v odezvě je mezi pH 6,5 a 8,5.

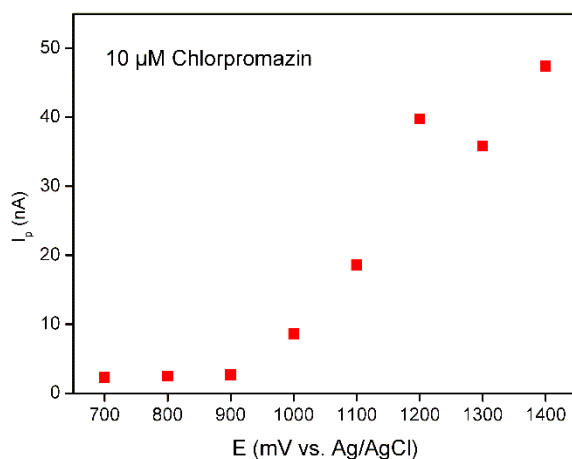


Obr. 25: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  haloperidolu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

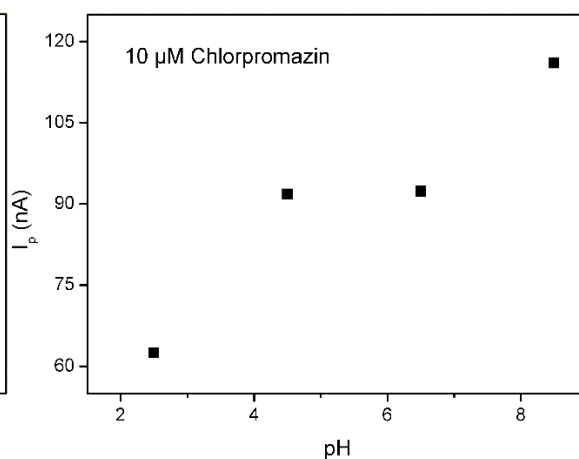


Obr. 26: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  haloperidolu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

U chlorpromazinu dochází k postupnému zvyšování výšky odezvy až do 1200 mV, při 1300 mV se odezva sníží a poté zase při 1400 mV narůstá (obr. 27). Vzniká tedy při 1200 mV schod v záznamu. Podobný průběh je patrný i z CV. U pH (obr. 28) je nejnižší odezva při hodnotě 2,5. Závislost výšky odezvy na pH 4,5 a 6,5 je téměř srovnatelná, u pH 8,5 však pozorujeme zvýšení.

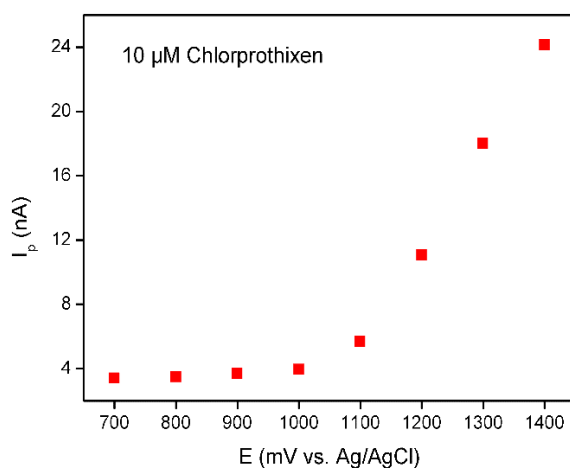


Obr. 27: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorpromazinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

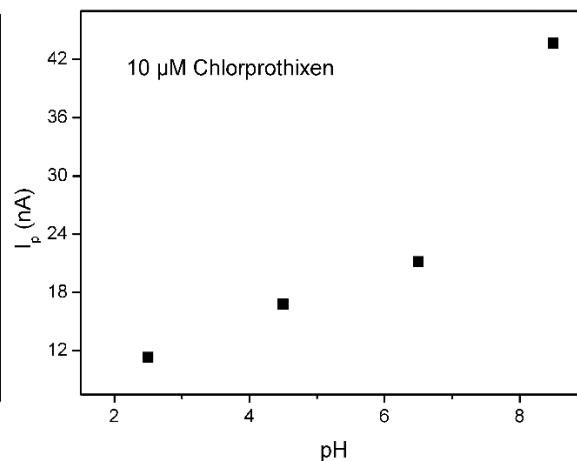


Obr. 28: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorpromazinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

U chlorprothixenu pozorujeme poměrně stejný průběh závislosti odezvy na vkládaném potenciálu (obr. 29) jako je záznam CV. Není zde patrný žádný schod a výška odezvy narůstá postupně. U pH (obr. 30) vidíme, že pro první tři hodnoty je nárůst výšky odezvy téměř lineární, u pH 8,5 však dochází k výraznému zvýšení výšky odezvy.



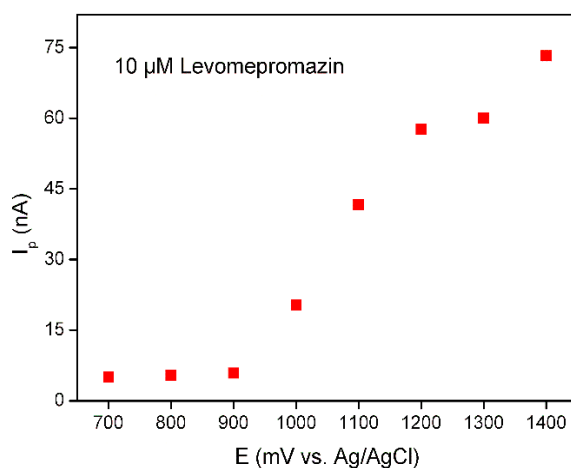
Obr. 29: Hydrodynamický voltamogram 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorprothixenu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.



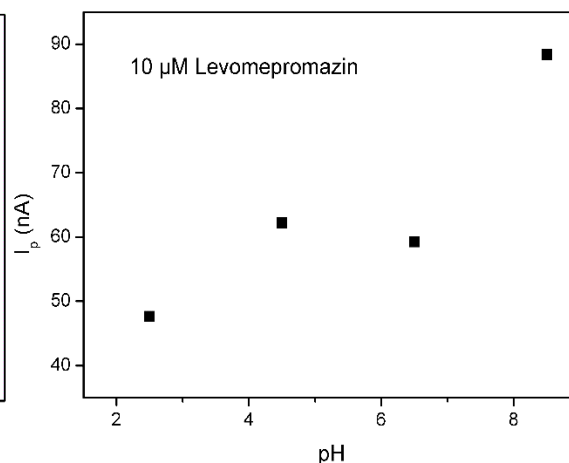
Obr. 30: Závislost proudové odezvy 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorprothixenu na pH, podmínky měření: E = 1300 mV vs. Ag/AgCl, MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Odezva levomepromazinu do hodnoty 1200 mV narůstá postupně. Při 1200 a 1300 mV je patrný schod v záznamu (obr. 31). Podobně jako u clozapinu je odezva levomepromazinu pro pH (obr. 32) 6,5 menší než při pH 4,5.



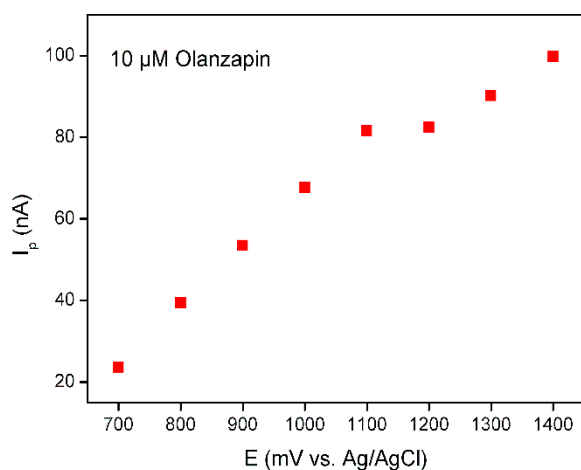


Obr. 31: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  levomepromazinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

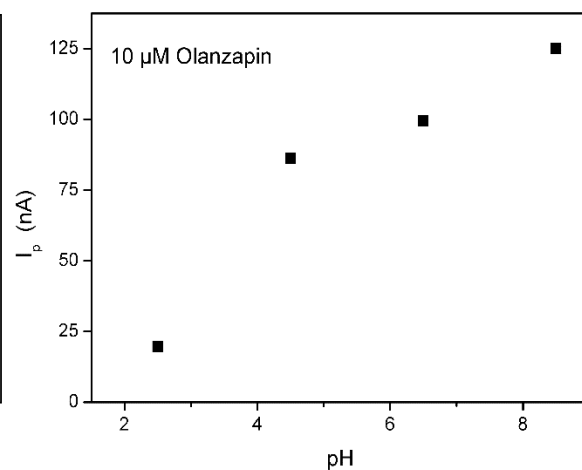


Obr. 32: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  levomepromazinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Závislost odezvy na vkládaném pracovním potenciálu u olanzapinu (obr. 33) v rozmezí 700 -100 mV lineárně narůstá. Při 1100 a 1200 mV je patrný schod. Při dalších hodnotách potenciálu dochází opět ke zvýšení. Odezva olanzapinu narůstá se zvyšujícím se pH téměř lineárně (obr. 34), jako je tomu i u aripiprazolu nebo haloperidolu. Výška odezvy olanzapinu je však mnohonásobně vyšší. V literatuře [60] můžeme najít opačné výsledky, než jsou výsledky naší práce, a to že se odezva se stoupajícím pH snižuje.

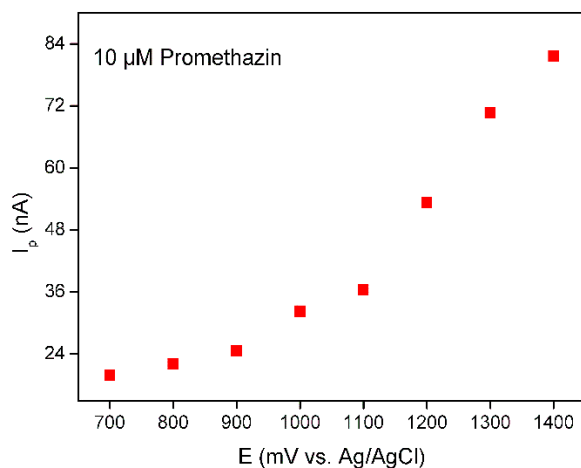


Obr. 33: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  olanzapinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

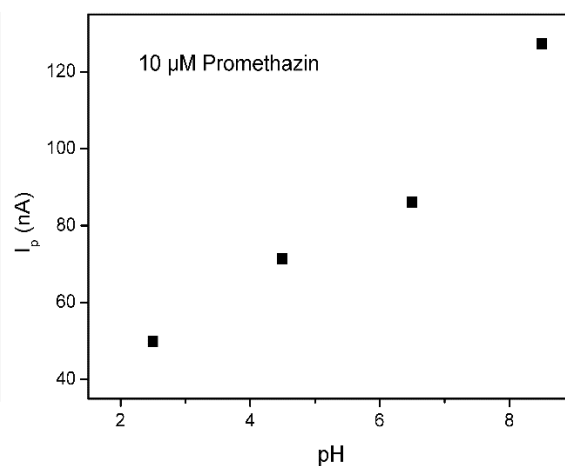


Obr. 34: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  olanzapinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Hydrodynamický voltamogram promethazinu (obr. 35) nevykazuje žádný výrazný schod. Od hodnoty 1100 mV můžeme pozorovat mírné zakřivení křivky postupně narůstající odezvy. U pH (obr. 36) vidíme poměrně lineární nárůst odezvy.

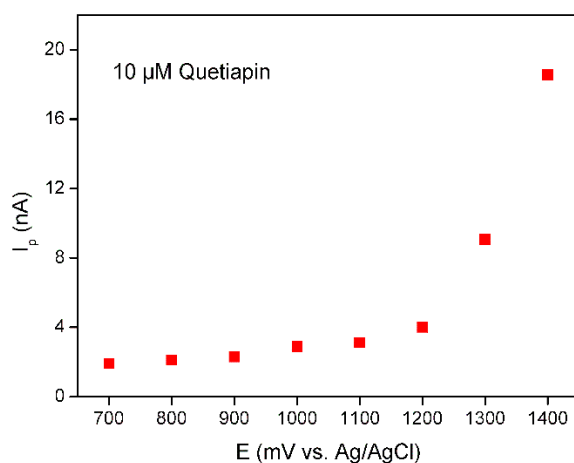


Obr. 35: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  promethazinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

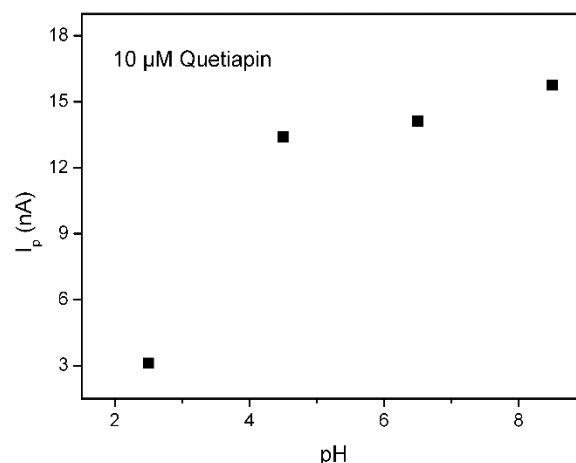


Obr. 36: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  promethazinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Záznam hydrodynamického voltamogramu quetiapinu (obr. 37) téměř kopíruje tvar CV. Odezva se zvyšujícím se potenciálem postupně narůstá a nepozorujeme žádný schod v záznamu. Pro pH 2,5 je odezva quetiapinu zanedbatelná oproti ostatním třem hodnotám, kde je odezva pětinasobně vyšší (obr. 38).

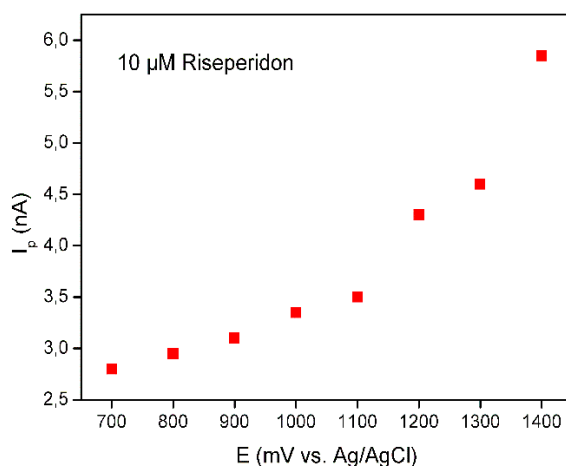


Obr. 37: Hydrodynamický voltamogram  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  quetiapinu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.

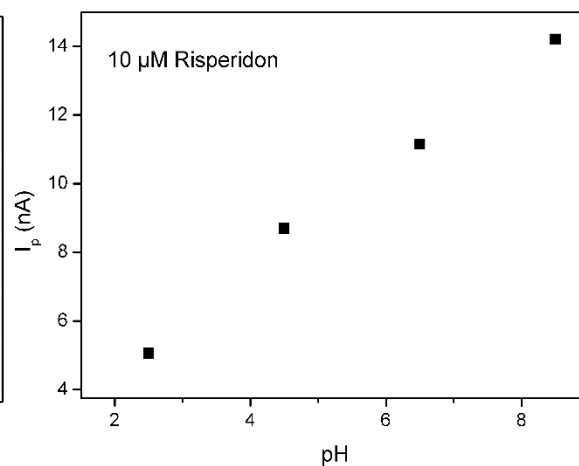


Obr. 38: Závislost proudové odezvy  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  quetiapinu na pH, podmínky měření:  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril, průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Se zvyšujícím se pracovním potenciálem odezva risperidonu roste (obr. 39). K mírnému zakřivení dochází při 1200 mV. Risperidon vykazuje nejnižší výšku odezvy ze všech měřených AP. Závislost proudové odezvy na pH je lineární (obr. 40).



Obr. 39: Hydrodynamický voltamogram 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  risperidonu, podmínky měření: MF fosfátový pufr (pH 4,5) : acetonitril (70:30, v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min.



Obr. 40: Závislost proudové odezvy 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  risperidonu na pH, podmínky měření: E = 1300 mV vs. Ag/AgCl, MF fosfátový pufr (pH 2,5 – 8,5) : acetonitril (70:30, v/v/), průtoková rychlost 0,5 ml/min

Z výsledků vyplývá obecný závěr, že se zvyšujícím se potenciálem roste odezva. Signály AP se objevují nad 1000 mV, z čehož plyne, že tyto látky nejsou snadno oxidovatelné. Pro naše měření také platí, že se zvyšujícím se pH vzrůstá proudová odezva.

### 4.3 Experimenty HPLC

Retence látek na HPLC koloně je ovlivňována celou řadou parametrů. Abychom dosáhli co nejlepší separace, je potřeba tyto parametry optimalizovat. Vzhledem k omezenému výběru vhodných kolon a danému charakteru látek bylo optimalizováno pouze složení MF. Hlavními testovanými parametry byly pH a koncentrace pufru, respektive poměr pufru a organické fáze.

Získaná data budou aplikována při optimalizaci složení mobilní fáze pro finální separaci. Zde bych uvedla, že po prvotních HPLC experimentech byly se souboru AP vyloučeny aripirazol, risperidon a chlorprothixen. Důvodem k vyloučení byla příliš nízká odezva v porovnání s ostatními AP. Soubor byl dále doplněn o promazin, který je sice

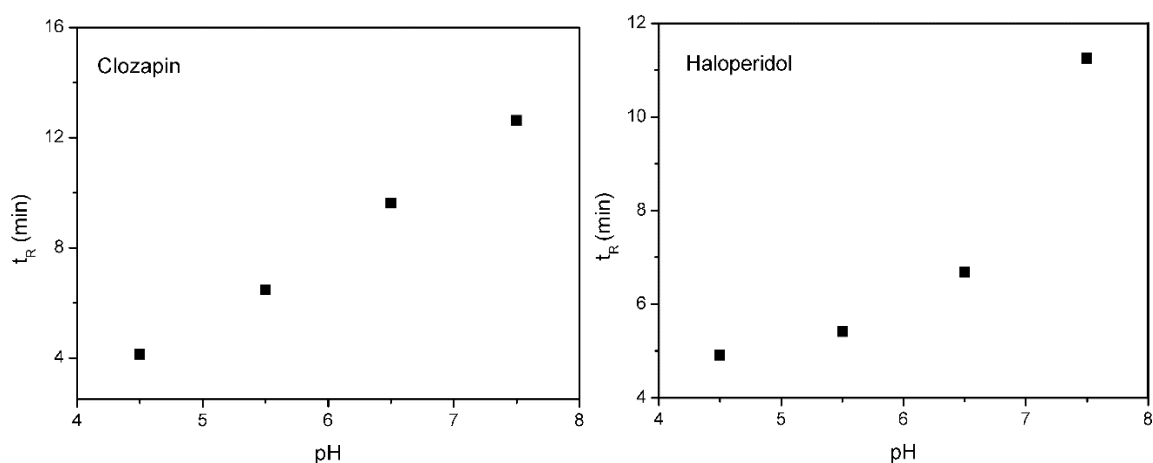
méně používán při léčbě psychóz, avšak je aktivním metabolitem chlorpromazinu a jeho přítomnost lze předpokládat v reálných vzorcích.

### 4.3.1 Vliv pH

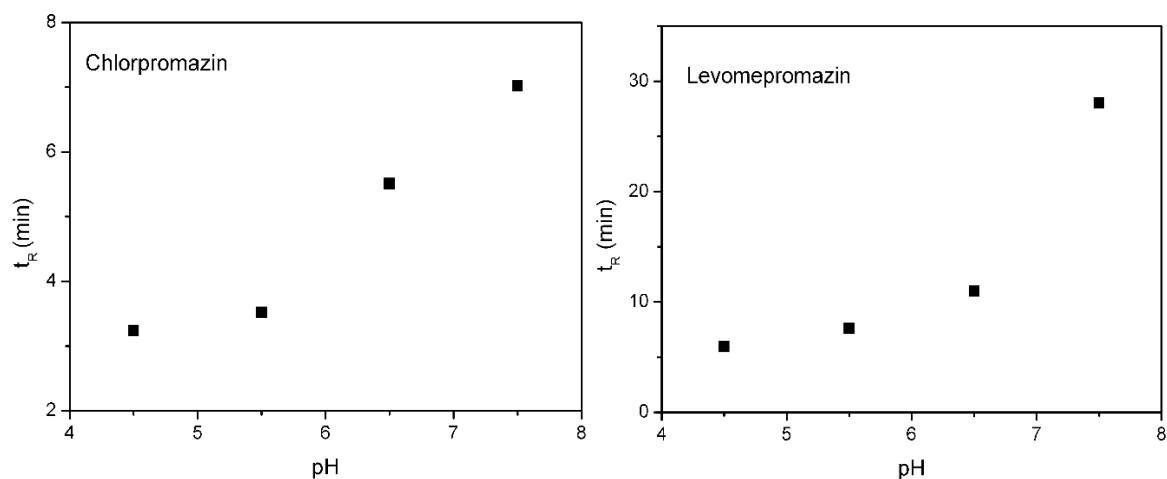
Ze struktury molekul AP můžeme usuzovat, že pH roztoku bude značně ovlivňovat jejich retenční charakteristiky. AP mají ve svém cyklu heteroatom s volným elektronovým párem, který mohou poskytnout k vytvoření vazby s elektrofilem. Chovají se jako Lewisovy báze a jsou schopny přijmout  $H^+$ . Protonizací se AP stávají polárnější.

Byl studován vliv pH na retenční časy a asymetrii píku. Podmínky při měření: MF obsahovala  $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátový pufr o pH 4,5; 5,5; 6,5 a 7,5 a acetonitril smíchané v poměru 58 : 42 (v/v), průtok MF činil 0,3 ml/min, teplota kolony byla  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , pracovní potenciál byl 1300 mV vs. Ag/AgCl.

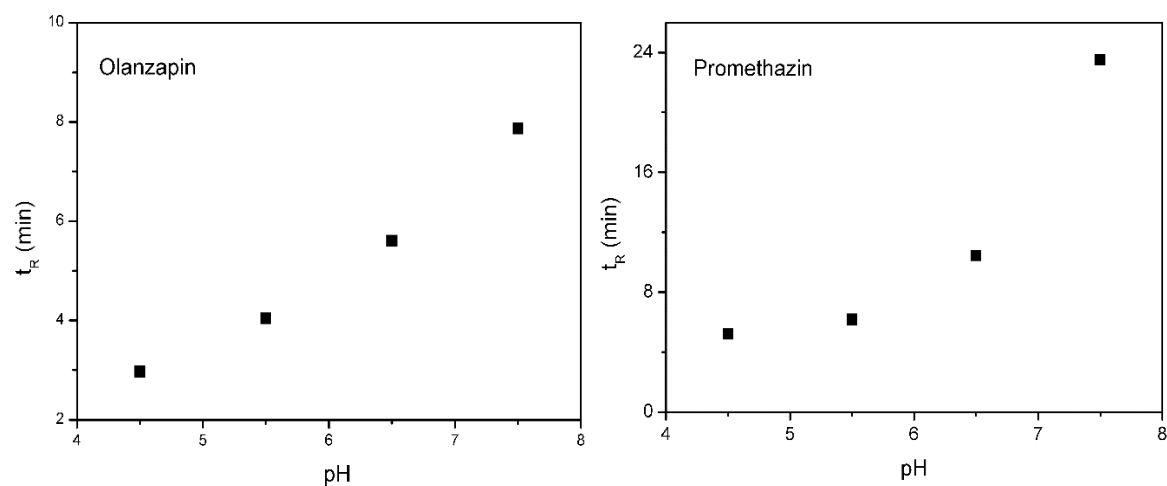
Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím se pH dochází k prodloužení retenčních časů jednotlivých AP. Zvýšení retence při vyšším pH je pravděpodobně způsobeno posunem rovnováhy směrem k deprotonizovaným (tedy méně polárním) molekulám AP, což vedlo k větší interakci s nepolární stacionární fází (kolona C8). Nejmenší změnu retence vykazoval chlorpromazin a olanzapin. Naopak největší změna retence byla u levomepromazinu.



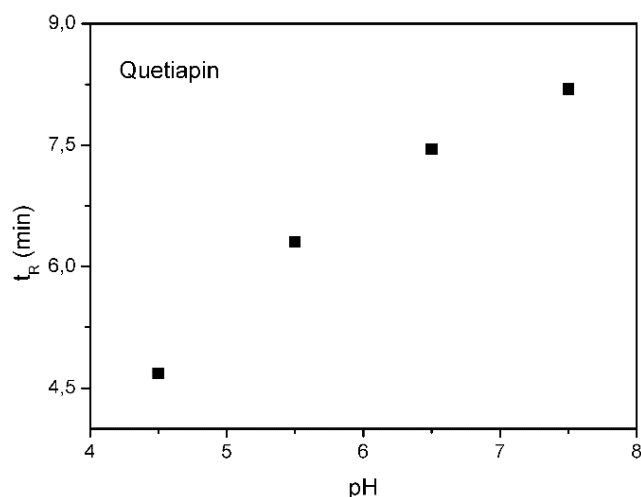
Obr. 41: Vliv pH na retenční čas, vlevo: clozapinu, vpravo: haloperidolu,  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .



Obr. 42: Vliv pH na retenční čas, vlevo: chlorpromazinu, vpravo: levomepromazinu,  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .



Obr. 43: Vliv pH na retenční čas, vlevo: olanzapinu, vpravo: promethazinu,  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .



Obr. 44: Vliv pH na retenční čas quetiapinu, E = 1300 mV vs. Ag/AgCl.

Z měření modelové směsi 1 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  olanzapin, clozapin, levomepromazin) si můžeme také potvrdit informace získané z experimentů FIA. Oproti výsledkům FIA měření však došlo ke snížení výšky píku clozapinu a levomepromazinu. Při pH 7,5 dochází k výraznému nárůstu retenčního času, což vede vyšší podélné difúzi a rozmytí píků. Při HPLC experimentech je oproti FIA porovnávána plocha píků, u kterých pozorujeme nárůst s rostoucím pH.

Tabulka XII: Separační charakteristiky clozapinu

pH	t <sub>R</sub> [min]	plocha [mV·s]	výška [mV]	asymetrie
4,5	4,13	385,454	28,150	2,900
5,5	6,46	459,413	26,391	2,381
6,5	9,62	569,524	28,076	2,057
7,5	12,62	621,749	24,762	1,868

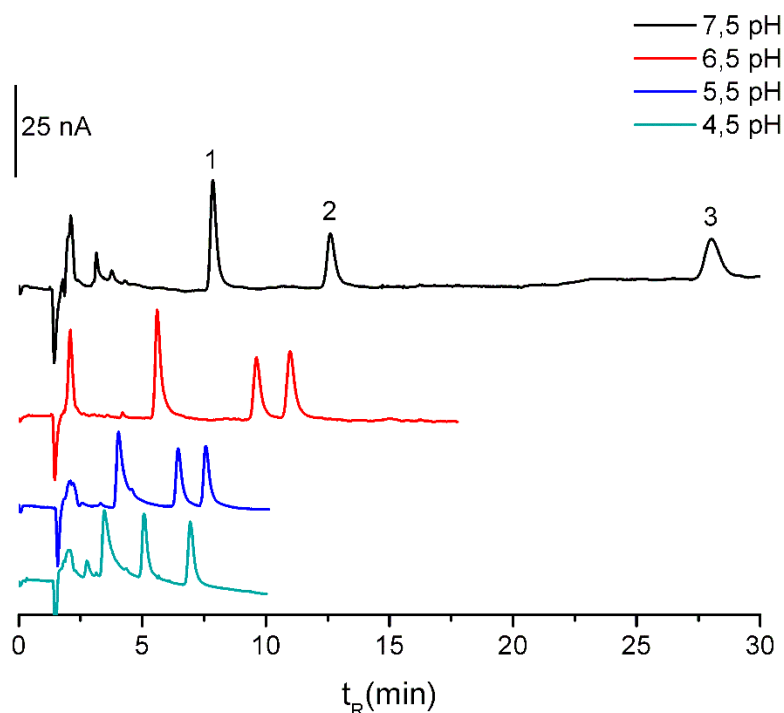
Tabulka XIII: Separační charakteristiky levomepromazinu

pH	t <sub>R</sub> [min]	plocha [mV·s]	výška [mV]	asymetrie
4,5	5,97	360,607	24,569	2,135
5,5	7,58	508,498	27,394	2,386
6,5	10,99	695,546	30,430	2,050
7,5	28,04	806,207	18,076	1,546



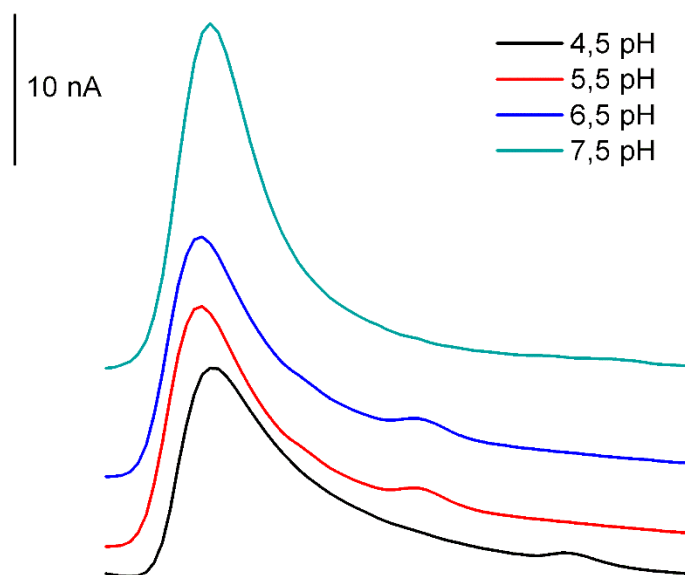
Tabulka XIV: Separační charakteristiky olanzapinu

pH	$t_R$ [min]	plocha [ $mV \cdot s$ ]	výška [mV]	asymetrie
4,5	2,97	555,020	25,987	5,419
5,5	4,04	841,729	34,449	5,528
6,5	5,61	896,629	49,538	2,949
7,5	7,86	934,268	50,243	2,128



Obr. 45: Srovnání vlivu pH pufru na separaci modelové směsi 1, 1: olanzapin, 2: clozapin, 3: levomepromazin,  $E = 1300$  mV vs. Ag/AgCl.

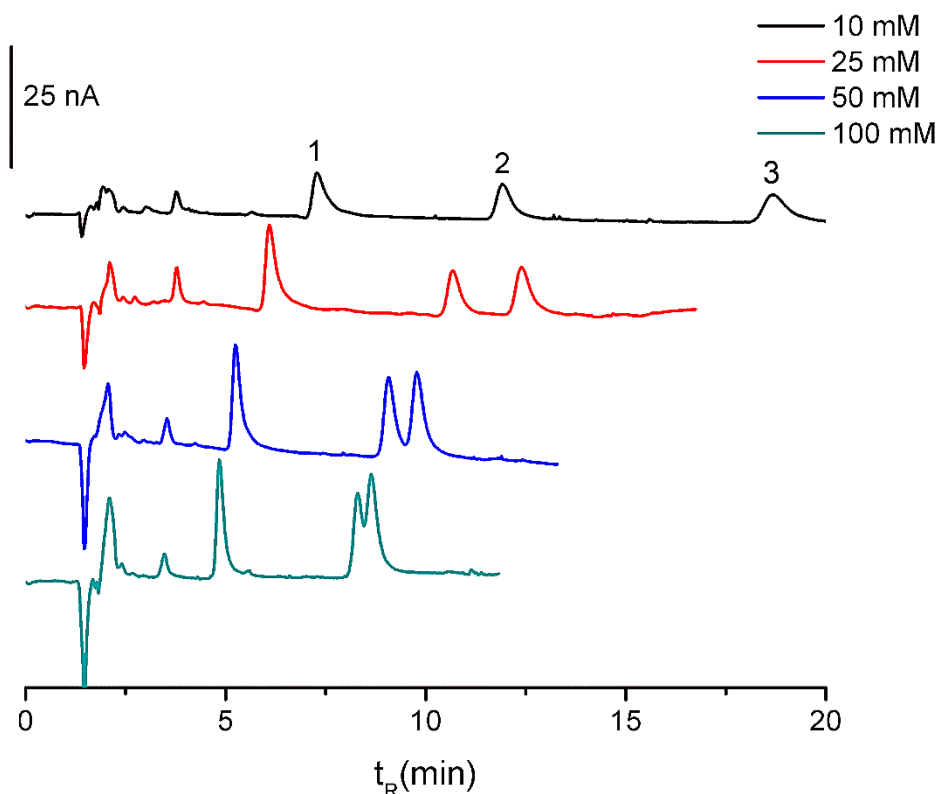
Dále byla posuzována asymetrie píků (viz tab. XII-XIV), u nichž došlo se zvyšujícím se pH k poklesu. Asymetrie se projevila jako chvostování píků. Příčinou chvostování píků je přítomnost volných silanolových skupin na chromatografické koloně, které vytvářejí s protonizovanými molekulami AP relativně pevnou vazbu. Takto navázané molekuly AP na volné silanolové skupiny (-Si-OH) vykazují vyšší retenci než nenabitě molekuly AP na oktylové stacionární fázi (-Si-O-C8). Jejich zpožděná eluce vede k chvostování píků.



Obr. 46: Vliv pH na asymetrii píku  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  olanzapinu.

#### 4.3.2 Vliv koncentrace pufru

Na modelové směsi 1 byl sledován vliv koncentrace pufru na separaci. MF byla složena z 10, 25, 50 a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru o pH 6,5 a acetonitrilu (52 : 48, v/v), průtok činil  $0,3 \text{ ml/min}$ . Kolona byla vyhřáta na  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  a potenciál na pracovní elektrodě byl  $1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ . Z výsledku je patrné, že se snižující se koncentrací pufru dochází k prodlužování retenčních časů jednotlivých AP a také k menší výšce odezvy píku způsobené delší zadrží látky na koloně. Při vyšší koncentraci pufru (50 a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) jsou retenční časy AP kratší a výška odezvy poněkud vyšší, ale dochází ke koeluci píků clozapinu a levomepromazinu.

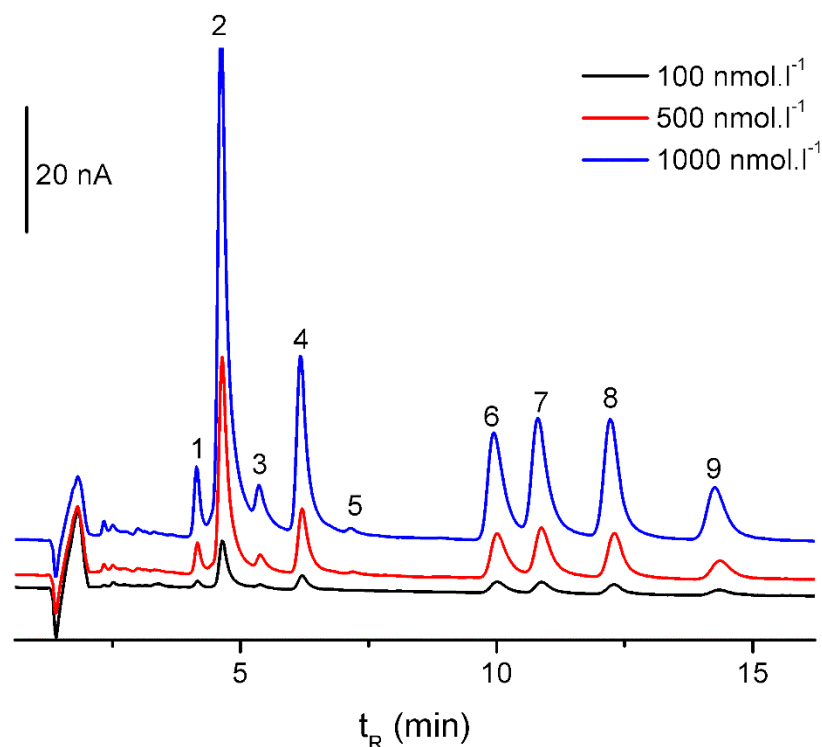


Obr. 47: Srovnání vlivu koncentrace pufru na separaci modelové směsi 1, 1: olanzapin, 2: clozapin, 3: levomepromazin,  $E = 1300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .

### 4.3.3 Podmínky separace

V předchozích experimentech byl sledován vliv pH a koncentrace pufru. Především kvůli snižující se asymetrii píku se zvyšujícím se pH, byla jako optimální hodnota pH pufru zvolena 7,5. Na základě výšky odezvy a též asymetrie píku byla jako optimální zvolena koncentrace pufru  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koeluze píků byla upravována zvoleným poměrem vodné a organické fáze v MF.

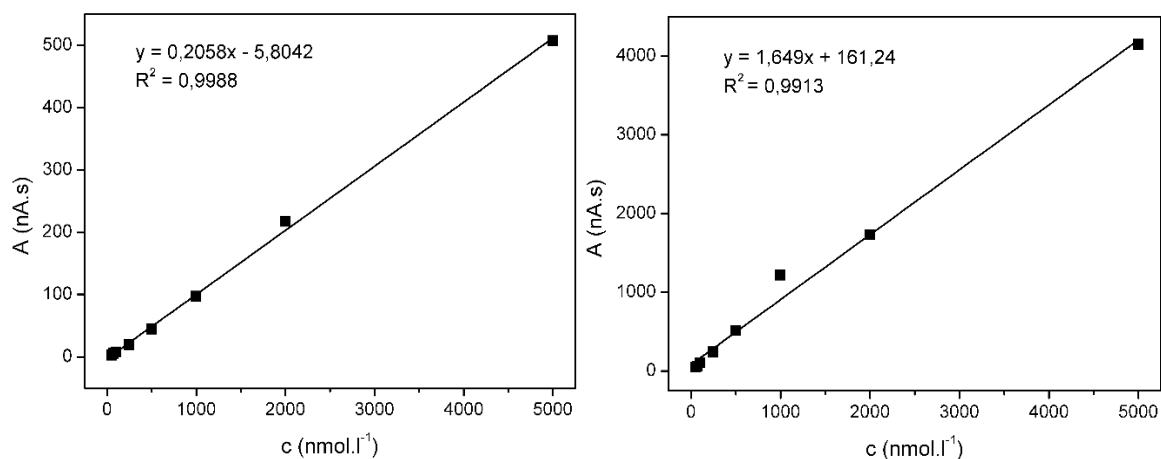
Pro tato měření byla smíchána modelová směs 2, obsahující  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  clozapin, haloperidol, chlorpromazin, levomepromazin, olanzapin, promazin, promethazin a quetiapin. MF obsahující  $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátový pufr (pH 7,5) a acetonitril byla míchána v objemovém poměru 49 – 57 : 51 – 43. Jako optimální MF se ukázalo složení pufr a acetonitril v poměru 49 : 51 (v/v). Za těchto podmínek docházelo k dostatečné separaci jednotlivých AP, přičemž kritická trojice byla chlorpromazin, olanzapin a quetiapin (viz obr. 48). Celková doba analýzy nepřekračovala 15,5 minuty.



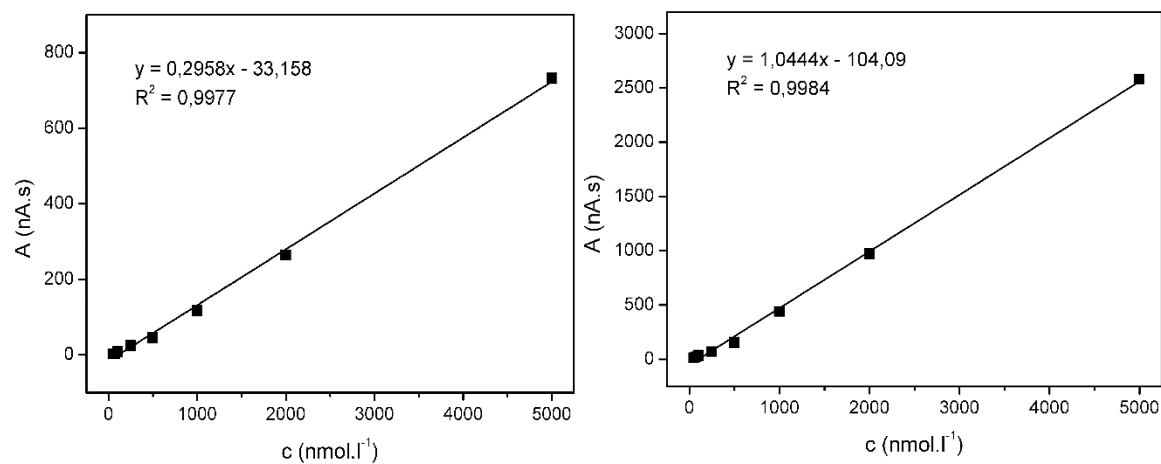
Obr. 48: Chromatografický záznam měření modelové směsi 2 za optimálních podmínek, 1: chlorpromazin pík 1, 2: olanzapin, 3: quetiapin, 4: clozapin, 5: haloperidol, 6: promazin, 7: promethazin, 8: levomepromazin, 9: chlorpromazin pík 2,  $E = 1000 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .

Ze záznamu je patrné, že použitý pracovní potenciál je pro citlivou detekci haloperidolu nedostačující (což koresponduje s výsledky CV a FIA experimentů). Zvýšení potenciálu na WE nad  $1000 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$  nejspíše vedlo k nevratnému narušení povrchu tuhy, což vedlo k nestabilitě základní linie odezvy detektoru a enormnímu zvýšení nízkofrekvenčního šumu. Obdobná situace je patrná i pro quetiapin, jeho odezva je však vyšší.

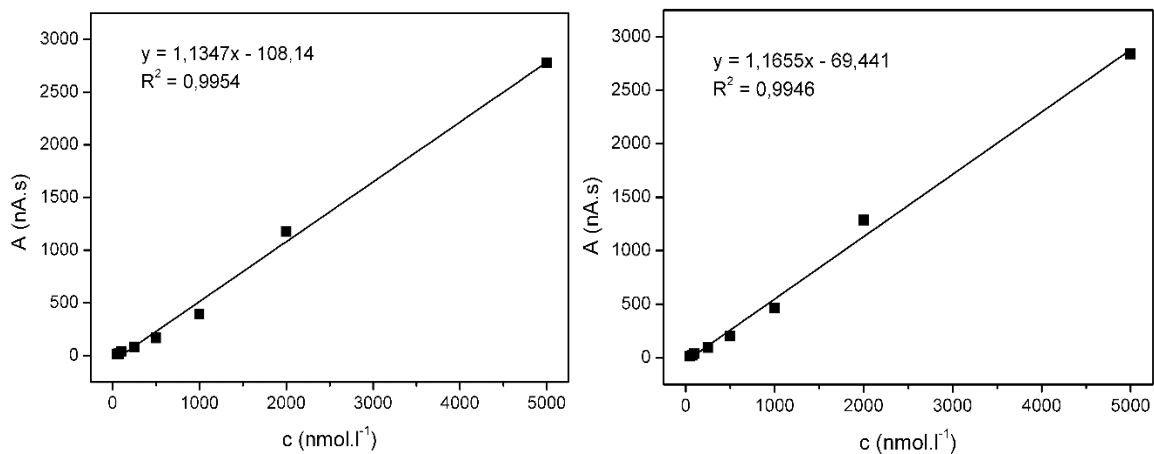
Následně byly sestaveny kalibrační závislosti měřených AP. Limity detekce (LOD, pro  $S/N = 3$ ) se pohybovaly v řádu jednotek (olanzapin) až desítek  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (s výjimkou haloperidolu). Limity kvantifikace (LOQ,  $S/N = 10$ ) se pohybovaly v řádu desítek až stovek  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v tabulce XV. Jak je patrné z obrázků 49 - 52, tak prakticky všechna AP poskytovala lineární odezvu v širokém rozsahu koncentrací od LOD až do  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .



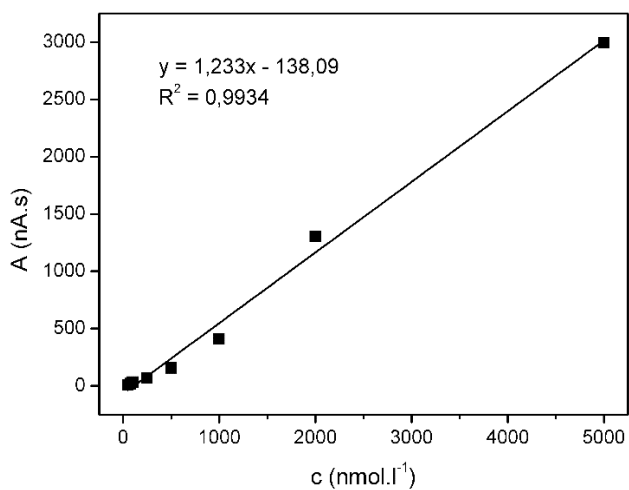
Obr. 49: Kalibrační závislost plochy píku vlevo: chlorpromazinu, vpravo: olanzapinu na koncentraci s příslušnou regresní rovnicí a korelačním koeficientem.



Obr. 50: Kalibrační závislost plochy píku vlevo: quetiapinu, vpravo: clozapinu na koncentraci s příslušnou regresní rovnicí a korelačním koeficientem.



Obr. 51: Kalibrační závislost plochy píku vlevo: promazinu, vpravo: promethazinu na koncentraci s příslušnou regresní rovnicí a korelačním koeficientem.



Obr. 52: Kalibrační závislost plochy píku levomepromazinu na koncentraci s příslušnou regresní rovnicí a korelačním koeficientem.

Tabulka XV: Srovnání terapeutické a letální koncentrace v krvi s naměřenými LOD a LOQ

AP	$c_{\text{typ}}$ v krvi* (nmol·l <sup>-1</sup> )	$c_{\text{let}}$ v krvi** ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	LOD (nmol·l <sup>-1</sup> )	LOQ (nmol·l <sup>-1</sup> )
<b>chlorpromazin</b>	62,8	3,14	45,9	153,1
<b>olanzapin</b>	28,8	3,84	3,8	12,5
<b>quetiapin</b>	500,0	0,63	84,5	281,7
<b>clozapin</b>	612,0	3,67	16,4	54,7
<b>haloperidol</b>	13,3	2,66	>500	>1500
<b>promazin</b>	-	-	22,6	75,4
<b>promethazin</b>	21,1	8,44	23,4	78,1
<b>levomepromazin</b>	304,4	2,44	40,5	135,0

\* nejvyšší typická terapeutická koncentrace v krvi

\*\* nejnižší letální koncentrace v krvi, údaje převzaty z cit. [19]

Jak je patrné z tabulky XV, tak LOD vyvinuté metody u většiny AP je nižší než nejmenší typická terapeutická koncentrace v krvi. Výjimkou je pouze haloperidol, jehož LOD nedosahuje podobně nízkých hodnot.

Z uvedeného vyplývá, že tato metoda je použitelná pro měření koncentrace vybraných AP v reálných vzorcích (s výjimkou haloperidolu). V budoucnu je plánováno nalezení optimální metody extrakce AP z reálných vzorků (krevní plasma, moč, žaludeční obsah) a následné měření pomocí navržené metody s využitím tuhy jako pracovní elektrody v elektrochemickém detektoru.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyvinout jednoduché a rychlé stanovení vybraných antipsychotických léčiv pomocí HPLC – ED metody. V „in house“ vyrobeném detekčním systému byla aplikována tuha jako pracovní elektroda.

Během úvodních experimentů byly studovány elektrochemické vlastnosti jednotlivých AP na tuze jako pracovní elektrodě pomocí cyklické voltametrie. Z cyklických voltamogramů byly zjištěny potenciály, při kterých dochází k oxidaci látek, a také byla ověřena reverzibilita nebo ireverzibilita elektrochemické přeměny analytů.

Pomocí průtokové injekční analýzy byl studován vliv průtoku mobilní fáze na elektrochemickou reakci na povrchu pracovní elektrody. Dále byla pomocí FIA experimentů porovnávána velikost proudové odezvy v závislosti na měnícím se pH mobilní fáze a vkládaném pracovním potenciálu.

Poté byl testován vliv pH a koncentrace fosfátového pufru na eluční sílu mobilní fáze resp. odezvu detektoru. Po zoptimalizování složení pufru byly testovány různé poměry vodné a organické fáze v MF pro dosažení dostatečné separace analytů. Optimální MF obsahovala fosfátový pufr ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH 7,5) a acetonitril smíchané v poměru 49 : 51 (v/v). Za těchto podmínek byla celková doba analýzy 15,5 min a bylo dosaženo LOD v řádu jednotek až desítek  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro jednotlivá AP. Vyvinutá metoda je tedy vhodná k rychlému stanovení vybraných antipsychotických léčiv na koncentračních hladinách vyskytujících se v krvi při normálním terapeutickém dávkování. Široký lineární rozsah metody dovoluje touto metodou stanovit podstatně vyšší koncentraci antipsychotik, kterou lze očekávat při sebevražedných pokusech.



## 6 SUMMARY

The aim of this work was to develop a fast and simple method for determination of antipsychotic drugs by HPLC with electrochemical detection. The pencil graphite electrode was used as a material for working electrode for an „in house“ build detection cell.

Cyclic voltammetry was used to survey the basic electrochemical behaviors as redox potential and reversibility of the electrochemical reaction of selected antipsychotic drugs on pencil graphite electrode.

Simple setup of flow injection analysis (FIA) with amperometric detection was used to explore the possibility of electrochemical detection of the antipsychotic drugs in flow system and to optimize the working potential applied on the pencil graphite electrode.

Next step was to investigate the influence of pH and concentration of phosphate buffer on retention characteristics and response heights of antipsychotic drugs and to find out the optimal ratio of buffer and acetonitrile. The developed method provides us a sufficient separation of 7 antipsychotic drugs in 15.5 minutes with detection limits (LOD's) in nanomolar range. Very low detection limits allow to measure the antipsychotic drugs on normal therapeutical blood concentrations. On the other hand, wide linear range is very useful in case of suicide attempts, where the higher concentrations of analytes are expected.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AP	antipsychotika
CN	kyano
CV	cyklická voltametrie
ECD	elektrochemická detekce
FIA	průtoková injekční analýza
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ISE	iontově selektivní elektroda
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
WE	pracovní elektroda

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] C.F. Poole, *The essence of chromatography*, Elsevier 2003.
- [2] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Lucie Nováková 2013.
- [3] R.P. Scott, *Chromatographic Detectors: Design: Function, and Operation*, CRC Press 1996.
- [4] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Karolinum 2005.
- [5] M. Trojanowicz, Recent developments in electrochemical flow detections—A review: Part II. Liquid chromatography, *Analytica chimica acta* 688(1) (2011) 8-35.
- [6] M. Trojanowicz, Recent developments in electrochemical flow detections—a review: Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis, *Analytica chimica acta* 653(1) (2009) 36-58.
- [7] D. Zielinska, I. Poels, M. Pietraszkiewicz, J. Radecki, H. Geise, L. Nagels, Potentiometric detection of organic acids in liquid chromatography using polymeric liquid membrane electrodes incorporating macrocyclic hexamines, *Journal of Chromatography A* 915(1-2) (2001) 25-33.
- [8] R.J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, *Electrochemical detection in HPLC: Analysis of drugs and poisons*, Royal Society of Chemistry 2005.
- [9] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons 2011.
- [10] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley 2004.
- [11] E. Beinrohr, *Prietokové elektroanalytické metody v praxi*, 2 Theta 2013.
- [12] M.W. Dong, *Modern HPLC for practicing scientists*, John Wiley & Sons 2006.
- [13] M. Kopeček, Aktualizované klinické a teoretické aspekty podávání antipsychotik, *Klinická farmakologie a farmacie* 26(1) (2012) 18-28.
- [14] D. Lincová, H. Farghali, *Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd.*, Praha: Galén (2007).
- [15] E. Hodgson, R.B. Mailman, J.E. Chambers, R.E. Dow, *Dictionary of toxicology*, Macmillan 1998.
- [16] S. Racková, L. Janů Ph D, Psychofarmaka v léčbě schizofrenie, *Praktické lékařství* 4(4) (2008) 172-176.
- [17] M.J. Peluso, S.n.W. Lewis, T.R. Barnes, P.B. Jones, Extrapyramidal motor side-effects of first-and second-generation antipsychotic drugs, *The British Journal of Psychiatry* 200(5) (2012) 387-392.
- [18] M. Kopeček, Klinické a teoretické aspekty podávání antipsychotik (neuroleptik), *Remedia* 12 (2002) 447-465.
- [19] N. Buckley, *Antipsychotic drugs (neuroleptics)*, Medical Toxicology (3rd ed), Lippincott Williams & Wilkins 2003.
- [20] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00420> [online].
- [21] C. Smith, S. Morgan, S. Greene, R. Abramson, Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic method for chlorpromazine and thirteen metabolites, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 423 (1987) 207-216.
- [22] T. Ohkubo, R. Shimoyama, K. Sugawara, Determination of chlorpromazine in human breast milk and serum by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 614(2) (1993) 328-332.
- [23] K. Murakami, K. Murakami, T. Ueno, J. Hijikata, K. Shirasawa, T. Muto, Simultaneous determination of chlorpromazine and levomepromazine in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection,

Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 227(1) (1982) 103-112.

[24] K. Midha, J. Hubbard, J. Cooper, T. Gurnsey, E. Hawes, G. McKay, B. Chakraborty, P. Yeung, Therapeutic monitoring of chlorpromazine. IV: Comparison of a new high-performance liquid chromatographic method with radioimmunoassays for parent drug and some of its major metabolites, Therapeutic drug monitoring 9(3) (1987) 358-365.

[25] G. FARBER, J. BURKS, Chlorprothixene therapy for herpes zoster neuralgia, Southern medical journal 67(7) (1974) 808-812.

[26] M.A. Brooks, G. DiDonato, H.P. Blumenthal, Determination of chlorprothixene and its sulfoxide metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and amperometric detection, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 337 (1985) 351-362.

[27] J.E. Wallace, E.L. Shimek, S. Stavchansky, S.C. Harris, Determination of promethazine and other phenothiazine compounds by liquid chromatography with electrochemical detection, Anal Chem 53(7) (1981) 960-962.

[28] A. Dhar, K. H. Kutt, Improved liquid-chromatographic determination of haloperidol in plasma, Clinical chemistry 30(7) (1984) 1228-1230.

[29] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, H. Hoenen, Rapid determination of haloperidol and its metabolites in human plasma by HPLC using monolithic silica column and solid-phase extraction, Biomedical Chromatography 20(8) (2006) 760-764.

[30] E.R. Korpi, B.H. Phelps, H. Granger, W.-H. Chang, M. Linnoila, J.L. Meek, R. Wyatt, Simultaneous determination of haloperidol and its reduced metabolite in serum and plasma by isocratic liquid chromatography with electrochemical detection, Clinical chemistry 29(4) (1983) 624-628.

[31]

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levomepromazine#section=Pharmacology> [online].

[32] M. Bagli, M.L. Rao, G. Höflich, Quantification of chlorprothixene, levomepromazine and promethazine in human serum using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 657(1) (1994) 141-148.

[33] L. Mercolini, F. Bugamelli, E. Kenndler, G. Boncompagni, L. Franchini, M.A. Raggi, Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction, Journal of Chromatography B 846(1-2) (2007) 273-280.

[34] E. Češková, T. Novotný, A. Floriánová, V. Pálenský, Snášlivost a bezpečnost antipsychotik druhé a třetí generace, Čes. a slov. psychiat 101 (2005) 2.

[35] N.L. Keltner, V. Johnson, Aripiprazole: A third generation of antipsychotics begins?, Perspectives in psychiatric care 38(4) (2002) 157.

[36] L. Kameníková, J. Pomykacz, H. Farghali, Nežádoucí účinky antipsychotické léčby, Psychiatr.praxi 16(2) (2015) 56-59.

[37] M. Raggi, F. Bugamelli, C. Sabbioni, D. De Ronchi, S. Pinzauti, V. Volterra, An improved HPLC-ED method for monitoring plasma levels of clozapine and its active metabolites in schizophrenic patients, Chromatographia 51(3-4) (2000) 147-153.

[38] Y. Shen, H. Wu, W. Ko, S. Wu, Simultaneous determination of clozapine, clozapine N-oxide, N-desmethylclozapine, risperidone, and 9-hydroxyrisperidone in plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Analytica Chimica Acta 460(2) (2002) 201-208.

[39] A. Avenoso, G. Facciola, G.M. Campo, A. Fazio, E. Spina, Determination of clozapine, desmethylclozapine and clozapine N-oxide in human plasma by reversed-phase

- high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 714(2) (1998) 299-308.
- [40] V.I. Reus, Olanzapine: a novel atypical neuroleptic agent, *The Lancet* 349(9061) (1997) 1264-1265.
- [41] S.C. Kasper, E.L. Mattiuz, S.P. Swanson, J.A. Chiu, J.T. Johnson, C.O. Garner, Determination of olanzapine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 726(1-2) (1999) 203-209.
- [42] M.A. Raggi, G. Casamenti, R. Mandrioli, V. Volterra, A sensitive high-performance liquid chromatographic method using electrochemical detection for the analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in plasma of schizophrenic patients using a new solid-phase extraction procedure, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 750(1) (2001) 137-146.
- [43] D.W. Boulton, J.S. Markowitz, C.L. DeVane, A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 759(2) (2001) 319-323.
- [44] L.J. Dusci, L.P. Hackett, L.M. Fellows, K.F. Ilett, Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography B* 773(2) (2002) 191-197.
- [45] R. Mandrioli, S. Fanali, A. Ferranti, M. Raggi, HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 30(4) (2002) 969-977.
- [46] P.C. Davis, J. Wong, O. Gefvert, Analysis and pharmacokinetics of quetiapine and two metabolites in human plasma using reversed-phase HPLC with ultraviolet and electrochemical detection, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 20(1-2) (1999) 271-282.
- [47] S.M. Stahl, Dopamine system stabilizers, aripiprazole, and the next generation of antipsychotics, part 1: "Goldilocks" actions at dopamine receptors, *The Journal of clinical psychiatry* 62(11) (2001) 841-842.
- [48] C. Tamminga, Partial dopamine agonists in the treatment of psychosis, *Journal of neural transmission* 109(3) (2002) 411-420.
- [49] A. Synowiec, E. Gomółka, T. Zyss, A. Zieba, E. Florek, W. Piekoszewski, Application of HPLC-UV method for aripiprazole determination in serum, *Przegląd lekarski* 69(10) (2012) 1004-1006.
- [50] J. Le Moing, S. Edouard, J. Levron, Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 614(2) (1993) 333-339.
- [51] A. Avenoso, G. Facciola, M. Salemi, E. Spina, Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 746(2) (2000) 173-181.
- [52] S.M. Foroutan, A. Zarghi, A. Shafaati, Rapid high performance liquid chromatographic determination of risperidone in human plasma, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2010) 37-70.
- [53] L.C. Strenkoski-Nix, J. Ermer, S. DeCleene, W. Cevallos, P.R. Mayer, Pharmacokinetics of promethazine hydrochloride after administration of rectal suppositories and oral syrup to healthy subjects, *American journal of health-system pharmacy* 57(16) (2000) 1499-1505.

- [54] A.R. Fox, D.A. McLoughlin, Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the quantification of promethazine in human serum with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A* 631(1-2) (1993) 255-259.
- [55] S.R. Vanapalli, S.P. Kambhampati, L. Putcha, D.W. Bourne, A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of promethazine and three of its metabolites in plasma using electrochemical and UV detectors, *Journal of chromatographic science* 39(2) (2001) 70-72.
- [56] C.-G. Hammar, B. Holmstedt, The identification of chlorpromazine metabolites in human blood by gas liquid chromatography, *Experientia* 24(1) (1968) 98-100.
- [57] B. Barrett, M. Holčápek, J. Huclova, V. Bořek-Dohalský, P. Fejt, B. Němec, I. Jelinek, Validated HPLC–MS/MS method for determination of quetiapine in human plasma, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 44(2) (2007) 498-505.
- [58] M. Josefsson, M. Roman, E. Skogh, M.-L. Dahl, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 53(3) (2010) 576-582.
- [59] M.H. Mashhadizadeh, E. Afshar, Electrochemical investigation of clozapine at TiO<sub>2</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode and simultaneous adsorptive voltammetric determination of two antipsychotic drugs, *Electrochimica Acta* 87 (2013) 816-823.
- [60] M.A. El-Shal, Electrochemical studies for the determination of quetiapine fumarate and olanzapine antipsychotic drugs, *Advanced pharmaceutical bulletin* 3(2) (2013) 339.