

Ústav farmakologie Lékařské fakulty UP Olomouc  
Oddělení klinické farmakologie, ÚLD FN Ostrava

Mgr. Romana Uřinová

**TDM PSYCHOFARMAK**  
**VÝVOJ METODY NA STANOVENÍ VYBRANÉ SKUPINY**  
**PSYCHOFARMAK**

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu, studijní obor Lékařská farmakologie.

Ostrava 2013

## Poděkování

Ráda bych poděkovala lidem, kteří mi byli nápomocni v průběhu přípravy této práce:

- mému školiteli doc. MUDr. Milanu Grundmanovi, CSc. za umožnění vypracování disertační práce na Ústavu klinické farmakologie
- RNDr. Haně Brozmanové, CSc. za věcné rady při vývoji metody a zpracování dat
- všem pracovníkům Oddělení klinické farmakologie
- svým rodičům za podporu při studiu

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité prameny.

V Ostravě .....

Mgr. Romana Uřinová

## OBSAH

1. Úvod	4
2. Cíle	24
3. Metoda	26
4. Výsledky	30
5. Diskuze	46
6. Závěry	52
7. Souhrn	55
8. Literatura	61
9. Publikované práce, které jsou součástí disertační práce	72
10. Publikované práce	140

## 1. ÚVOD

Uřinová R., Turjap M., Brozmanová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, Čes. Slov. Farm., 2010;59, 103-111

Klapková E., Uřinová R., Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, Klin. Biochem. Metab., 2011; 1, 5–8.

Kacířová I., Grundmann M., Uřinová R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak, Klin. Farmakol. Farm., 2012; 26(3):131-134

Grundmann M., Kacirova I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic, 2013, 157, Epub ahead of print

Grundmann M., Kacirova I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs (článek v přípravě do tisku)

## 1.1 Antidepresiva a deprese

Afektivní poruchy, z nichž především deprese, představují jednu z největších zdravotních zátěží společnosti měřeno roky ovlivněnými touto závažnou nemocí a předčasným úmrtím. Prevalence deprese je v Evropě u žen 16,5 % a 8,9 % u mužů, obdobná je i ve Spojených státech (16,2 % u žen a 6,6 % u mužů) (1). V České republice bylo dle dat z roku 2000 adekvátně léčeno pouze 13,4 % pacientů trpících depresivními syndromy, přičemž depresivní porucha je ve většině případů chronickým onemocněním. Pacienti trpící depresí častěji čerpají zdravotní služby, častěji jsou v pracovní neschopnosti a 7 – 15 % z nich ukončí život sebevraždou. Poruchy nálady začínají obvykle v časně dospělosti mezi 25 až 32 lety. Antidepresiva mají široké indikační spektrum a mezi lety 2003 až 2008 stoupla jejich preskripce o 100%. Antidepresiva ovlivňují převážně příznaky deprese, k dalším indikacím patří úzkostné poruchy (panická porucha a agorafobie, sociální fobie, obsedantně kompulsivní porucha, posttraumatická stresová porucha, generalizovaná úzkostná porucha), dále je lze některá použít při léčbě chronické bolesti, nespavosti a u poruch příjmu potravy (2).

Antidepresiva lze rozdělit do několika skupin:

- TCA- tricyklická antidepresiva (amitriptilin, nortriptylin, klomipramin atd.)
- inhibitory monoaminoxidázy (moklobemid)
- SSRI- selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (citalopram, escitalopram, fluoxetin, paroxetin, sertralin, fluvoxamin atd.)
- SNRI- selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (venlafaxin, duloxetin)
- SARI- antagonisté serotoninových receptorů a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (trazodon, nefazodon)
- Atypická antidepresiva (mirtazapin, bupropion) (3, 4)

### ***Tricyklická antidepresiva (TCA) a inhibitory monoaminoxidázy (IMAO)***

TCA jsou historicky nejstarší skupinou antidepresiv a příležitostně jsou stále používána převážně v jiných indikacích. Terapeutické monitorování léčiv (TDM) v oblasti psychofarmak začalo v roce 1960 právě tricyklickými antidepresivy (5). TDM těchto látek má význam jak z hlediska zvýšení účinnosti a bezpečnosti tak z důvodu snížení rizika intoxikace. Mezi nežádoucí účinky patří ortostatická hypotenze, sedace a anticholinergní účinky (6). Generace neselektivních IMAO není již u nás na trhu dostupná, jejich nevýhodou byla nutnost dodržovat dietu chudou na tyramin a výskyt hypertenze (7-10). Koncem 80. let byla do praxe uvedena generace selektivních IMAO (3).

### ***Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)***

SSRI jsou nejčastěji předepisovaná antidepresiva. Na rozdíl od TCA mají lepší bezpečnostní profil (6). Mají podobný farmakologický účinek, včetně minimálního anticholinergního, antihistaminového a antiadrenergního účinku a účinné presynaptické inhibice zpětného vychytávání serotoninu. Mezi vedlejší účinky patří sexuální dysfunkce, zvýšené riziko hyponatrémie, krvácení, cévní mozkové příhody i riziko úmrtí u starších pacientů (11).

Jedná se o chemicky různorodou skupinu lipofilní látek, které jsou dobře absorbovány přes střevní sliznici. Fluoxetin, paroxetin a fluvoxamin vykazují nelineární–kinetiku i v rámci terapeutického rozmezí. Vyšší dávky těchto látek vyvolávají neúměrné zvýšení jejich koncentrace v plazmě. V důsledku toho může být obtížné určit dávku potřebnou k dosažení určité plazmatické koncentrace na základě koncentrace získané při jiném dávkování. Naopak citalopram, sertralin a (S) - enantiomer citalopramu escitalopram se vyznačují lineární kinetikou (12).

Na jejich metabolismu se v různé míře podílí enzymy cytochromu P450 především CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 a CYP1A2. Paroxetin je vylučován ve formě farmakologicky neaktivních metabolitů působením CYP2D6 (vysoká afinita) a CYP3A4 (nízká afinita). Citalopram je metabolizován především prostřednictvím N-demetylace v játrech na desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram a citalopram-N-oxid primárně CYP2C19 s přispěním CYP3A4 a CYP2D6 (13). Escitalopram se metabolizuje CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4 na S-desmetylcitalopram (14). Fluoxetin je primárně metabolizován N-demetylací na

aktivní metabolit norfluoxetin především prostřednictvím CYP2D6 s přispěním CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 a CYP2B6 (15, 16). Hlavní metabolické cesty v játrech u fluvoxaminu zahrnují oxidativní demetylaci a oxidační deaminaci (CYP1A2 a CYP2D6 (16). U sertralinu se v největší míře uplatňuje CYP2B6 a v menší míře CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 (17).

### ***Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI)***

Venlafaxin a duloxetin jsou dva nejčastěji používané SNRI, které blokují zpětné vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Tato léčiva jsou obecně dobře snášena a při předávkování jsou bezpečnější než starší léčiva.

Venlafaxin je primárně metabolizován CYP2D6 za vzniku farmakologicky aktivního metabolitu O-desmetylvenlafaxin (ODV) a v menší míře CYP3A4 za vzniku N-desmetylvenlafaxinu (NDV) (18). Poměr ODV/VEN lze použít pro stanovení fenotypu (tzn. aktuální aktivity CYP2D6 (19).

Duloxetin je rychle a rozsáhle metabolizován v játrech prostřednictvím CYP1A2 a CYP2D6, jeho četné metabolity jsou neaktivní a vylučují se převážně močí (20).

### ***Atypická antidepressiva:***

Mirtazapin je antagonist presynaptických alfa2 receptorů, který zvyšuje noradrenergní a serotoninergní neurotransmisi v centrálním nervovém systému. Způsobuje značnou blokádu histaminových H1-receptorů a serotoninových receptorů, což vede k útlumu a přibývání na váze. Jde o tetracyklické noradrenergní a specifické serotoninergní antidepressivum ("NaSSA"). Vykazuje lineární farmakokinetiku, která je závislá na pohlaví a věku. Biotransformace je zprostředkována hlavně CYP2D6 a CYP3A4, v menší míře CYP1A2 a CYP2B6 (15, 16, 21).

Bupropion je inhibitor zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu. Představuje významnou alternativu k SSRI a SNRI a také se využívá pro léčbu rezistentní deprese. Hydroxybupropion je primární aktivní metabolit tvořený CYP2B6. Treohydrobupropion, erythrohydrobupropion i ostatní aktivní metabolity bupropionu jsou tvořeny pomocí dalších enzymů cytochromu P450 v játrech (22). Bupropion i metabolity vykazují lineární farmakokinetiku. Genetický polymorfismus CYP2B6 může farmakokinetiku bupropionu významně ovlivnit (23).

***Antagonisté serotoninových receptorů a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SARI):***

Trazodon se vyznačuje lineární farmakokinetikou a je metabolizován v játrech zejména hydroxylací, dealkylací a N-oxidací. 20 % podané dávky trazodonu je metabolizováno N-dealkylací cestou CYP3A4 na farmakologicky aktivní metabolit m-chlorfenylpiperazin, metabolit je dále metabolizován CYP2D6 (24).

Farmakokinetické parametry, terapeutické referenční rozmezí a stupeň doporučení pro TDM pro uvedená antidepresiva jsou shrnuty v tabulce č. 1-2.



Tabulka č. 1: Farmakokinetické parametry antidepresiv (4)

<b>látka</b>	<b>biologická dostupnost (%)</b>	<b>vazba na plazmatické bílkoviny (%)</b>	<b>T<sub>max</sub> (hod)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (hod)</b>	<b>čas potřebný k dosažení steady-state (dny)</b>
bupropion (hydroxybupropion)	87-100	84	3-5	8-26 (17-47)	8
citalopram	80	80	2-4	33-37	7-14
duloxetin	32-80	96	6-10	8-17	5
escitalopram	80	56	3-6	22-32	7-10
fluoxetin (norfluoxetin)	70	95	6-8	4-6 dny (4-16 dnů)	(3 měsíce)
fluvoxamin	50	80	3-8	15-20	5-10
mirtazapin	50	85	2	20-40	4-6
paroxetin	30-60	95	3-5	12-44	4-14
sertralin	>44	98	4-8	26-36	7
trazodon	>60	89-95	1-4	distribuce 3-6 eliminace 5-9	2-3
venlafaxin (O-desmethylvenlafaxin)	40-45	27	1-6	5 (11)	3

v závorce jsou uvedeny aktivní metabolity

Tabulka č. 2: Stupeň doporučení pro TDM, terapeutické referenční rozmezí, enzymy CYP450, metabolity antidepresiv (4)

<b>látka</b>	<b>stupeň doporučení pro TDM</b>	<b>terapeutické rozmezí (ng/ml )</b>	<b>hlavní cesty metabolismu</b>	<b>aktivní metabolity</b>
bupropion	3	225-1500	<b>CYP2B6</b>	<b>hydroxybupropion</b> , treohydrobupropion, erythrohydrobupropion
citalopram	2	50-110	<b>CYP 2C19, 3A4, 2D6</b>	desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram, citalopram-N-oxid
duloxetin	2	30-120	<b>CYP 1A2, 2D6</b>	žádný
escitalopram	2	15-80	<b>CYP 2C19, 2D6, 3A4</b>	desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram
fluoxetin*	2	120-500	<b>CYP 2D6, 2C9, 2C19, 3A4, 2B6</b>	<b>norfluoxetin</b>
fluvoxamin	2	60-230	<b>CYP 1A2, 2D6</b>	žádný
mirtazapin	2	30-80	<b>CYP 3A4, 2D6, 1A2, 2B6</b>	desmetylmirtazapin
paroxetin	3	30-120	<b>CYP 2D6, 3A4, 1A2, 2C19, 3A5</b>	žádný
sertralin	2	10-150	<b>CYP 2B6, 2C19, 3A4, 2D6, 2C9</b>	desmetylsertralin
trazodon	2	700-1000	<b>CYP 3A4, 2D6</b>	m-chlorofenylpiperazin
venlafaxin*	2	100-400	<b>CYP 2D6, 3A4, 2C19</b>	<b>O-desmetylvenlafaxin</b> , N-desmetylvenlafaxin

tučně jsou znázorněny hlavní enzymy podílející se na metabolismu a účinné metabolity

\*... terapeutické rozmezí pro součet koncentrace mateřské látky a účinného metabolitu

## 1.2 Antipsychotika

Antipsychotika jsou heterogenní skupina antagonistů dopaminových receptorů s rozdílným chemickým, farmakologickým i klinickým profilem. Antipsychotika se primárně používají v léčbě psychóz, což je souborné označení pro stavy, kdy dochází k poruchám vnímání a myšlení. Pozitivní příznaky zahrnují poruchy myšlení a vnímaní-bludy, halucinace, neklid, agrese. Jako negativní příznaky se označuje emoční oploštění, sociální stažení, chudé a stereotypní myšlení. Schizofrenie je závažná chronická duševní porucha ovlivňující výrazně kvalitu života i sociální zařazení nemocného. Jedná se o heterogenní onemocnění charakterizované jak pozitivními tak negativními symptomy, často spojenými s kognitivními poruchami a afektivními, zejména depresivními symptomy. Mimo oblast psychóz se antipsychotika mohou uplatňovat také jako stabilizující léčba bipolární afektivní poruchy, přídatná léčba v případě rezistentních depresivních a úzkostných poruch (3, 25).

Antipsychotika bývají dělena na antipsychotika 1. generace (klasická, typická, A1G) a 2. generace (atypická antipsychotika, A2G). Z klinického i farmakologického hlediska jsou antipsychotika 1. generace dělena na nízcí a vysoce potentní antipsychotika. A2G se dělí dle receptorového profilu na: 1) selektivní antagonisté dopaminových  $D_2/D_3$  receptorů 2) antagonisté serotoninových, dopaminových a alfa-adrenalinových receptorů (SDA), 3) mnohočetné receptorové antagonisty (MARTA), 4) dualisté dopaminových  $D_2/D_3$  receptorů a antagonisté serotoninových  $S_2$  receptorů (3, 25).

V současné době se dává přednost 2. generaci antipsychotik, jelikož antipsychotika 1. generace téměř vůbec neovlivňují negativní a depresivní příznaky a mají závažné vedlejší účinky (extrapyramidový syndrom, neuroleptický maligní syndrom). I přes tyto nežádoucí účinky jsou velmi účinné v léčbě psychóz (26).

Mezi atypická antipsychotika patří klozapin, risperidon, olanzapin, quetiapin, sertindol, ziprasidon, aripiprazol a amisulprid. Působí stejně jako první generace antipsychotik na pozitivní příznaky, ale také ovlivňují negativní, kognitivní i ostatní příznaky schizofrenie. Vyznačují se nízkým rizikem závažných vedlejších účinků, ale může se vyskytnout případné zvýšení sérové hladiny prolaktinu a ovlivnění srdeční činnosti (prodloužení QT intervalu) (26). Mezi další vedlejší účinky patří zvýšení hmotnosti, hyperglykemie, dyslipidemie (27-30). Vedlejší účinky se nejčastěji vyskytují

u klozapinu a olanzapinu, méně často u risperidonu/paliperidonu a quetiapinu, minimálně u ziprasidonu a aripiprazolu (6). V souladu s vysokou variabilitou koncentrace v plazmě při stejné dávce bylo zjištěno, že obsazenost receptorů lépe koreluje s koncentrací v plazmě než s denními dávkami. Optimální odezva byla zjištěna při 70 - 80% obsazenosti receptorů, 80% obsazenost byla definována jako práh pro vznik extrapyramidových nežádoucích účinků (31, 32).

Atypická antipsychotika při obvyklých terapeutických dávkách výrazně neovlivňují metabolismus současně podávaných léků. Přesto se mohou vyskytnout lékové interakce s ostatními psychofarmaky nebo s léky používanými k léčbě dalších onemocnění. K většině farmakokinetických interakcí dochází na metabolické úrovni a obvykle zahrnují změny v činnosti hlavních enzymů podílejících se na jejich biotransformaci, tj. cytochromu P450. Kouření indukuje aktivitu CYP1A2, což může ovlivnit vylučování klozapinu a olanzapinu. Různé studie ukázaly, že koncentrace klozapinu (a jeho metabolitu norklozapinu) a olanzapinu jsou při stejné dávce nižší u kuřáků ve srovnání s nekuřáky. Odvykání kouření, pokud není sníženo dávkování, může být spojeno se zvýšením plazmatických koncentrací těchto antipsychotik, což může vést k toxickým účinkům (33, 34). Také změny v příjmu kofeinu ovlivňují metabolismus klozapinu u pacientů se schizofrenií (35).

Klozapin je metabolizován primárně cestou CYP1A2 ale i CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4. Důležitou cestou v metabolismu je glukuronidace uridin difosfát-glukuronosyltransferázou (36-39). Hlavními metabolity jsou norklozapin, metabolizován cestou CYP1A2, a klozapin-N-oxid, metabolizován přes CYP3A4. Nacházejí se v plazmě v koncentracích, které tvoří obvykle 50 – 90 % a 10 – 35 % z celkové koncentrace mateřské látky (40). Antipsychotický účinek i nežádoucí účinky klozapinu pozitivně korelují s koncentrací v plazmě (41). Klozapin je stále lékem první volby v léčbě farmakorezistentní schizofrenie a optimální plazmatické hladiny pro akutní a udržovací léčbu jsou poměrně dobře známy (42, 43).

Risperidon v játrech podléhá zejména 9-hydroxylaci, při níž vzniká aktivní metabolit 9-hydroxyrisperidon (9-OH-RSP - paliperidon). Na metabolismu se podílí CYP2D6 a v menší míře CYP3A4. 9-OH-RSP má podobné farmakologické vlastnosti jako risperidon, oba tedy přispívají antipsychotickými účinky k léčbě schizofrenie, proto je důležité sledování plazmatických koncentrací mateřské látky i metabolitu (40).

Plazmatické hladiny risperidonu a jeho aktivního metabolitu korelují s výskytem parkinsonových nežádoucích účinků (44).

Olanzapin je primárně metabolizován přímou glukuronidací a CYP1A2, v menší míře CYP2D6, CYP3A4 a flavin monooxygenasou na jeho 10-N-a 4'-N-glukuronidy, 4'-N-desmetyloanzapin, olanzapin-N-oxid a 2-hydroxymetyloanzapin. Polymorfismy těchto enzymů mohou přispět k interindividuální variabilitě metabolismu olanzapinu a odpovědi na léčbu. Studie prokázaly, že průměrná koncentrace v plazmě se velmi liší a je závislá na faktorech jako je denní dávka a doba trvání léčby. Hladiny vykazují významnou interindividuální variabilitu po podání stejných dávek. Na této variabilitě se podílí celá řada faktorů (45).

Quetiapin je metabolizován převážně prostřednictvím CYP3A4 a CYP2D6. U pacientů starších 70 let byl zjištěn výrazný pokles aktivity CYP3A4, proto je u starších pacientů vhodná pomalejší titrace dávky a nižší denní dávka než u mladších pacientů (46, 47). Mnozí pacienti mohou tolerovat vyšší plazmatické koncentrace, jejich tolerance je však omezena spíše vegetativními vedlejšími účinky a sedací než extrapyramidovými příznaky (15).

Amisulprid se minimálně metabolizuje v játrech, má dva metabolity, které jsou neaktivní. Stejně jako u ostatních antipsychotik i u amisulpridu existuje vysoká interindividuální variabilita plazmatických koncentrací po podání stejné dávky (40). Plazmatická koncentrace úzce koreluje s dávkou, obsazením dopaminových receptorů a extrapyramidovými příznaky (48).

Ziprasidon vykazuje lineární farmakokinetiku, je metabolizován CYP3A4 (34, 40). Zlepšení klinického stavu nebo výskyt nežádoucích účinků nekoreluje s dávkou nebo koncentrací v plazmě. Nicméně byly pozorovány velké interindividuální a intraindividuální rozdíly v koncentracích (49, 50).

Aripiprazol se vyznačuje lineární farmakokinetikou, je metabolizován CYP3A4 a CYP2D6. Dávkování je velmi dobře definováno a spolehlivě předpovídá plazmatickou koncentraci, obsazenost dopaminových receptorů a klinickou odezvu (51).

Sertindol je na základě in vivo experimentů metabolizován CYP3A4 a CYP2D6, známá variabilita těchto enzymů přispívá k variabilitě jeho farmakokinetiky. Je metabolizován na dva metabolity dehydrosertindol a norsertindol. Zvýšenou pozornost

je třeba věnovat výpočtu účinné dávky u pacientů s jaterní insuficiencí. Při předávkování je vhodné sledovat jeho plazmatické koncentrace vzhledem k dlouhému poločasu eliminace a schopnosti prodloužit QT interval (40) .

Farmakokinetické parametry, terapeutické referenční rozmezí, stupeň doporučení pro TDM pro uvedená antipsychotika jsou shrnuty v tabulce č.3 - 4.

Tabulka č.3: Farmakokinetické parametry antipsychotik (15, 34, 40)

<b>látka</b>	<b>biologická dostupnost (%)</b>	<b>vazba na plazmatické bílkoviny (%)</b>	<b>T<sub>max</sub> (hod)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (hod)</b>	<b>čas potřebný k dosažení steady-state (dny)</b>
amisulprid	50	17	1-4	12-20	2-3
aripiprazol	87	>99	3-5	47-68	14
klozapin	27-50	95	1-4	9-17	7-10
olanzapin	60	93	6	21-54	5-10
paliperidon	28	74	24	23	4-5
quetiapin	70	83	1-1,5	5-8	2-3
risperidon	70-85	89	1	EM: 3; PM: 22	4-6
sertindol	75	>99	8-12	85-99	15-20
ziprasidon	60	>99	6-8	8-10	2-3

EM ..rychlý metabolizátor, PM ... pomalý metabolizátor

Tabulka č. 4: Stupeň doporučení pro TDM, terapeutické referenční rozmezí, enzymy CYP450, metabolity antipsychotik (15, 34, 40)

<b>látka</b>	<b>stupeň doporučení pro TDM</b>	<b>terapeutické rozmezí (ng/ml )</b>	<b>hlavní cesty metabolismu</b>	<b>aktivní metabolity</b>
amisulprid	1	100-320	vyločen nezměněn ledvinami	
aripiprazol	2	150-500	CYP3A4, CYP2D6	dehydroaripiprazol
klozapin	1	350-600	CYP: 1A2, 2C19, 3A4, 2D6 UGT: 1A1, 1A3, 1A4	norklozapin, klozapine-N-oxid
olanzapin	1	20-80	CYP: 1A2, 2D6, 3A4 UGT: 1A4, 2B10 flavinmonooxygenasa	
quetiapin	2	100-500	CYP2D6, CYP3A4	9-hydroxyrisperidon
risperidon	2	20-60	CYP3A4, CYP2D6	dehydrosertindol
sertindol	2	50-100	CYP3A4, CYP2D6	
ziprasidon	2	50-200	CYP3A4, aldehydoxidasa	



### 1.3 TDM psychofarmak

Psychofarmaka jsou široce používána jak v psychiatrii, tak v mnoha dalších oblastech medicíny. Ovšem významný počet pacientů léčených psychofarmaky z nejrůznějších důvodů neodpovídá na léčbu nebo je jejich odpověď neuspokojivá. Kromě patrného úsilí vyvíjet nová psychofarmaka s novými mechanismy účinku je nezbytné především optimalizovat farmakoterapii dostupnými psychofarmaky. K tomuto účelu se jeví jako potenciálně vhodný nástroj terapeutické monitorování léčiv (8, 52) Tato metoda využívá stanovení koncentrace léčiva v krevní plazmě nebo séru k titraci dávky u jednotlivých pacientů tak, aby bylo dosaženo maximální účinnosti s co nejnižším rizikem toxicity.

Obecně vhodná léčiva k TDM jsou ta, kde (a) je známá dobrá korelace mezi koncentrací léčiva v plazmě a účinkem léčiva, (b) je dobře definované terapeutické rozmezí, (c) léčivo vykazuje saturační kinetiku, (d) je úzké terapeutické rozmezí, (e) je tvořen aktivní metabolit (f) terapeutický efekt nemůže být popsán na základě klinických měření a (g) kde je dostupná validovaná analytická metoda (53). Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že ne všechna psychofarmaka jsou pro TDM vhodná.

TDM je tedy založeno na předpokladu, že existuje vztah mezi plazmatickými koncentracemi a klinickými účinky (terapeutické zlepšení, vedlejší účinky a nežádoucí účinky). Dále se předpokládá, že existuje plazmatická koncentrace léčiva, která se vyznačuje maximální účinností a maximální bezpečností, tzv. „terapeutické okno“ nebo „terapeutické referenční rozmezí“, které lze definovat jako rozmezí koncentrací, které jsou určené dolní mezí, pod kterou je vyvolání terapeutické odpovědi léku nepravděpodobné, a horní mezí, nad kterou se snižuje tolerance nebo se již terapeutické zlepšení nepředpokládá. Toto „terapeutické referenční rozmezí“ je orientační, založené na populaci a nemusí být použitelné pro všechny pacienty. Někteří pacienti mohou vykazovat optimální terapeutickou odpověď při nižší koncentraci léčiva, která se liší od „referenčního terapeutického rozmezí“. Terapie psychofarmaky může být u daného pacienta nejlépe nastavena na základě jeho "individuální terapeutické koncentrace" (54, 55).

TDM je již dlouhodobě dobře zavedenou metodu u antiepileptik, pro další léčiva používaná v neuropsychiatrii je však jeho rutinní aplikace vzácností. V případě tricyklických antidepresiv (TCA), lithia a antiepileptik používaných z psychiatrické

indikace napomáhá TDM již delší dobu k nalezení individuálního dávkovacího optima (7, 8).

U tricyklických antidepresiv TDM nejenže zvyšuje účinnost a bezpečnost, ale také snižuje náklady na léčbu deprese (9, 10). TDM redukuje riziko intoxikace TCA a u mnohých byla také prokázána závislost klinického efektu na plazmatické koncentraci (56).

V případě selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) je TDM v klinické praxi také doporučováno, i když toxicita tohoto typu antidepresiv je nízká ve srovnání s většinou předchozích antidepresiv. Nicméně, u citalopramu bylo prokázáno, že plazmatická koncentrace naměřená 7. den po zahájení léčby je prediktivní pro pozdější špatnou klinickou odpověď. Pacienti vykazující plazmatické koncentrace citalopramu pod 50 ng/ml měli výrazně menší zlepšení podle Hamiltonovy stupnice hodnocení deprese (56). Údaje ze Švédska ukázaly, že TDM SSRI je cenově výhodné u starších pacientů, kde pomůže k použití minimální efektivní dávky (57).

Důkazy o statisticky významném vztahu mezi koncentrací léčiv a terapeutickou odezvou chybí u tetracyklických antidepresiv maprotilinu, mianserinu a mirtazapinu a také u trazodonu a reboxetinu, a u inhibitorů monoaminoxidázy moklobemidu (15).

U typických antipsychotik haloperidolu, trifluoperazinu a flufenazinu byla prokázána signifikantní korelace mezi plazmatickou koncentrací a terapeutickým účinkem (58).

O významu TDM u atypických antipsychotik se stále vedou diskuse, nicméně se objevuje stále více důkazů, že tato metoda může zlepšit účinnost, a to zejména u pacientů, kteří neodpovídají na terapeutické dávky nebo vykazují nežádoucí účinky (40). Monitorování hladin není nezbytně nutné u všech atypických antipsychotik, protože nejsou jednoznačné údaje podporující vztah mezi plazmatickou koncentrací a klinickým účinkem nebo nežádoucími účinky, s výjimkou na koncentraci závislých vedlejších účinků klozapinu, u něhož je TDM doporučeno, aby se zabránilo předávkování. Podobně je TDM doporučeno pro optimální compliance olanzapinu a risperidonu. Výhody TDM klozapinu a olanzapinu zahrnují optimalizaci dávky, zajištění compliance a zamezení nebo minimalizování toxicity oproti vyššímu riziku relapsů a opakovaní hospitalizace (58). Význam TDM zůstává při rozpoznání tzv.

„pseudo-farmakorezistence“, při non-compliance, nadměrném kouření, při užívání drog, při nepředvídatelných nežádoucích účincích a případných lékových interakcích (59).

Hlavním důvodem využití TDM u psychofarmak je značná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů u jednotlivých pacientů. Aby mohlo léčivo uplatnit svůj terapeutický účinek, musí dosáhnout dostatečné koncentrace v místě svého působení, což nezávisí pouze na podané dávce. Naopak, při stejné dávce psychofarmak může dojít k více než 20-násobným interindividuálním rozdílům v dosažené ustálené koncentraci, a to v důsledku odlišné schopnosti pacientů absorbovat, distribuovat, metabolizovat a vylučovat léky kvůli souběžným onemocněním, věku, pohlaví, kouření a další medikaci nebo genetickým rozdílům (60).

Mnoho psychofarmak je používáno pro několik různých indikací (např. antidepressiva jsou používána také k léčbě úzkosti), nicméně informací o optimálních plazmatických koncentracích v těchto indikacích je nedostatek a referenční rozmezí jsou obecně uváděna pouze pro primární indikaci. Uváděny jsou také tzv. "laboratorní varovné hladiny" označující koncentrace léčiva nad doporučené referenční rozmezí, při kterých by pracovníci provádějící TDM měli ihned informovat ošetřujícího lékaře (15).

V biotransformaci psychofarmak hrají velmi důležitou roli enzymy cytochromu P450, jako jsou CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 a 3A4/5. Status pomalého metabolizátora (PM) zvyšuje riziko nežádoucích účinků, zatímco status velmi rychlého metabolizátora (UM) způsobuje vyšší riziko nedostatečného účinku v důsledku subterapeutické plazmatické koncentrace (61). Současné stanovení metabolitů je způsob, jak zjistit fenotyp pacienta, to jest současný metabolický stav (tzv. „state marker“), který zahrnuje účinek stravy, kouření, současných chorob, souběžně užívaných léčiv a genetickou predispozici. Genotyp je nazýván jako „trait marker“, který není ovlivněn zevními faktory a zůstává stejný v průběhu celého života. U řady psychofarmak metabolity aktivně přispívají k celkovému klinickému účinku mateřské látky. Z tohoto důvodu musí TDM obsahovat také kvantifikaci aktivních metabolitů, např. u klomipraminu (norklomipramin), fluoxetinu (norfluoxetin) nebo risperidonu (9-hydroxyrisperidon). Stanovení metabolitů farmakologicky aktivních i neaktivních umožňuje také stanovení fenotypu pacienta (62, 63). Porovnáním získaných a předpokládaných časově závislých plazmatických koncentrací po odběru několika krevních vzorků v průběhu dne můžeme rozlišit, zda nízká plazmatická koncentrace je výsledkem snížené dostupnosti, zvýšené biodegradace nebo špatné compliance. TDM

je doporučováno také v případě potvrzeného abnormálního genotypu cytochromu P450, protože genotypizace odhadne pouze přibližně do jaké míry mohou být plazmatické koncentrace u daného pacienta změněny. U genotypicky pomalého nebo naopak ultrarychlého metabolizátora by neměl být lék automaticky nahrazen jiným, ale často může být dávka upravena pomocí klinického posouzení a TDM (15).

Doporučováno je pravidelné monitorování plazmatických koncentrací nejméně jednou za 3-6 měsíců při udržovací terapii, aby se zabránilo relapsům a opakovaným hospitalizacím. Četnost požadavků na TDM může být zvýšena v případě podezření na non-compliance, při změně současně užívané medikace nebo kouření, které ovlivňují farmakokinetiku léčiva. Měří se celkové koncentrace psychofarmak, přičemž koncentrace získané ze séra nebo z plazmy jsou zaměnitelné. Doporučen je odběr údolních (minimálních) hladin v ustáleném stavu, což je nejméně po 4 eliminačních poločasech od zahájení nebo po změně dávkování a to během terminální beta-eliminační fáze. U většiny psychofarmak se eliminační poločas pohybuje v rozmezí 12-36 hodin. Významnou výjimkou je trazodon a venlafaxin, které vykazují eliminační poločas přibližně 6 hodin, fluoxetin má naopak eliminační poločas výrazně delší. V klinické praxi je u většiny psychofarmak vhodná doba odběru za jeden týden užívání stabilní denní dávky a to těsně před užitím ranní dávky, což je obvykle 12-16 h (nebo 24 h, pokud je lék podáván jednou denně ráno) po poslední dávce. TDM je samozřejmě možné provést kdykoliv po užití léku, jestliže se objeví neočekávané vedlejší účinky. Není nutné měřit pouze údolní (minimální) hladiny, dávkovací schéma by však mělo být na žádance uvedeno kvůli interpretaci. TDM by mělo být požadováno, jestliže je zřejmé, že výsledek poskytne odpověď na konkrétní otázku, přičemž pro vyřešení daného problému je jedno měření často nedostatečné. Výsledek TDM je vodítkem ke správnému dávkování u jednotlivých pacientů. Nicméně, v případě psychofarmak je názor na zavedení TDM do rutinní praxe stále nejednotný (15, 64, 65).

Skupina TDM z „Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie“ (AGNP) opakovaně publikuje doporučené postupy vycházející z odborné literatury pro optimální využití TDM v psychiatrii. Na základě empirických zkušeností byly proto definovány 4 stupně doporučení pro TDM psychofarmak : Stupeň 1: „Strongly recommended“, stupeň 2: „Recommended“, stupeň 3: „Useful“, Stupeň 4: „Potentially useful“, (tabulka č. 2 a 4) (15).

Monitorování hladin v léčbě psychických chorob není zatím do rutinní praxe zavedeno, přestože se subterapeutické nebo toxické plazmatické koncentrace psychofarmak mohou objevit i při standardním dávkování z důvodu interindividuální variability farmakokinetických vlastností jednotlivých pacientů. Terapeutické monitorování může být v klinické praxi využito k personalizované farmakoterapii, to jest k optimalizaci dávkování psychofarmak u každého jednotlivého pacienta. Napomáhá k maximalizaci účinnosti a prevenci toxicity, a to zejména u jedinců, kteří při standardním dávkování nereagují na léčbu nebo mají nežádoucí reakce. Využití TDM v psychiatrii zvyšuje účinek léčby a snižuje náklady, a to především tehdy, pokud je prováděno erudovaným klinickým farmakologem (66). V klinické praxi je snaha stanovit optimální individuální dávku psychofarmaka často řízena strategií pokusu a omylu. Nedostatečné využití TDM v psychiatrii ukazuje potřebu zvyšování edukace psychiatrů a klinických farmakologů o úloze TDM psychofarmak (67).

TDM je spolehlivou pomůckou v personalizované farmakoterapii také v psychiatrii. Pokud je adekvátně používáno, může pomoci mnoha psychiatrickým pacientům v mnoha situacích (15).

#### **1.4 Metody stanovení**

Při léčbě psychofarmaky se používá jak monoterapie tak polyterapie. Z toho důvodu je nutný vývoj metod umožňujících stanovení několika léčiv současně, popřípadě i jejich aktivních metabolitů. Ke stanovení léčiv v biologických tekutinách se používají imunochemické, elektromigrační či elektroforetické a chromatografické metody, které svou detekční citlivostí umožňují stanovení léčiv. Analýza léčiv v biologických tekutinách je často komplikována přítomností množství různých sloučenin v organické matici, které vedou k interferenci matrice s léčivem a dále jejich nízkou koncentrací ve vzorku. Nejčastěji se k analýze používá plazma, sérum nebo krev. Imunochemické metody umožňují stanovení léčiv bez předchozí úpravy vzorku. Běžné postupy úpravy vzorku zahrnují precipitaci proteinů, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci kapalina-kapalina (LLE) (68).

Imunochemické metody oproti chromatografickým metodám neumožňují stanovení léku a jeho metabolitu. Další nevýhodou jsou zkřížené reakce „cross-reactivita“, kdy protilátky reagují odlišně s různými léky a jejich metabolity, což

znemožňuje přesnou kvantifikaci. Riziko interference stoupá se strukturní podobností. (69-71). Všeobecně lze říci, že imunochemické metody je vhodnější používat jako screening předávkování než pro terapeutické monitorování léku, jelikož mají relativně vysoký limit detekce. V analýze psychofarmak se uplatňují i elektromigrační separační metody (72-74). Jejich předností je vysoká separační účinnost, nízká spotřeba vzorku i chemikálií (69-71, 75, 76).

Z chromatografických metod se v posledních letech nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Plynová chromatografie se používá pro stanovení antidepresiv, protože mnohé mají strukturu aminů (77-79).

#### **1.4.1 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií**

HPLC je rychlá, účinná a spolehlivá metoda. Má širokou oblast použití, lze jí analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Asi 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat HPLC metodou. Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, jako jsou LC a GC, výrazně zvyšuje selektivitu (52).

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda k určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. To umožňuje identifikovat a kvantifikovat analyt ve vzorku se složitou maticí (krev, plazma, sérum, moč), popřípadě i stanovit a kvantifikovat jeho metabolity. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ionty vytvoří nebo je emituje do plynného stavu a z plynné směsi molekul, jejich nabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmotností  $m/z$  (52).

Pro analýzu léčiv se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do  $m/z < 1000$ . Mezi hmotnostní analyzátory používané při analýze léčiv patří trojitý kvadrupólový analyzátor, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF), popřípadě jejich kombinace (80). HPLC-MS/MS se vyznačuje vysokou přesností a možností širokého uplatnění. Toto spojení umožňuje vývoj metod s krátkým retenčním časem.

Příprava vzorku je obvykle jednoduchá a nezahrnuje derivatizaci, která je nutná u některých látek v plynové chromatografii. Ve většině případů se používá precipitace

proteinů pomocí směsi acetonitrilu a metanolu, dále extrakce na tuhé fázi a za určitých podmínek je možný i přímý nástřik biologického vzorku na kolonu (81).

Stanovování léků a jejich metabolitů za použití HPLC-MS může být ovlivněno matricovými efekty, které lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. Vznikají jako výsledek soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem. Mechanismů, které způsobují matricové efekty, je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny. Rozdíly v mechanismech ovlivnění ionizace se samozřejmě liší i podle použité ionizační techniky. Předpokládá se, že hlavní příčina vychází z principu ionizace. Matricový efekt zahrnuje jak potlačení tak zvýšení ionizace. Nejsou předvídatelné a mohou ho způsobit i některé složky mobilní fáze a exogenní materiály, jako jsou polymery obsažené v různých odběrových plastických nádobách nebo některá antikoagulancia např. heparin litný, který se běžně používá. Ionizace za atmosferického tlaku (APCI) je vůči matricovým efektům méně citlivá než elektrosprej (81).

Běžně se používají dvě metody hodnocení matricového efektu, infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přídavek po extrakci. Post-kolonovou infuzí se zjišťuje kvalitativní matricový efekt. Při post-kolonovém dávkování je na kolonu nastřikován slepý vzorek a konstantní množství analytu je vstřikováno přímo do iontového zdroje. Vše probíhá za podmínek, které se používají při analýze. Určí se oblast chromatogramu, kde může pravděpodobně docházet k matricovým efektům. Tento způsob lze použít u stanovení s malým počtem analytů nebo u vzorků se stejnou biologickou matricí. U vícesložkových metod se používá přímé porovnání. Matricový efekt je zjišťován přímo během analýzy. Měří se několik vzorků o stejné koncentraci analytu a vnitřního standardu v roztoku bez matrice, blank matrice používané pro přípravu standardů, kalibrátorů a blank matrice získaný z různých zdrojů. Za matricový efekt je považováno, jestliže rozdíl odezvy v matricích je větší než 25 %. Pokud je nižší, lze metodu použít ke kvantifikaci (81).

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií má v rutinním terapeutickém monitorování léčiv zvyšující význam, protože zřejmě všechna léčiva lze takto stanovit. Velkou výhodou tohoto spojení je přesnost, široká oblast použití, výrazné zkrácení doby analýzy, možnost stanovit různé kombinace léčivých látek současně s jejich aktivními metabolity. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a vysoké nároky na obsluhu.

## **2.CÍLE**



- zavést, optimalizovat a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na stanovení simultánní *antidepresiv* (citalopram, sertralin, fluoxetin, norfluoxetin, paroxetin, venlafaxin), *antipsychotik* (risperidon, 9-hydroxyrisperidon, klozapin, quetiapin, olanzapin) a jejich *metabolitů* (desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram, N-desmetylsertralin, O-desmetylvenlafaxin, N-desmetylvenlafaxinu, N-desmetylklozapin, N-desmetyloanzapin, 2-hydroxyolanzapin)
- využití metody pro terapeutické monitorování vybrané skupiny psychofarmak v rutinní praxi
- zhodnocení možností a významu terapeutického monitorování psychofarmak

### **3. METODA**

Pro terapeutické monitorování léčiv je nezbytná analytická metoda, která umožní stanovit dané léčivo a případně i jeho metabolity. Metoda by měla obecně splňovat několik podmínek: měla by být rychlá, pokud možno by měla mít jednoduchou přípravu vzorku a výsledky měření by měly splňovat podmínky pro validaci metody.

Proto byla vyvinuta a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Metoda umožňuje stanovení citalopramu, desmetylcitalopramu, didesmetylcitalopramu, sertralínu, N-desmetylsertralínu, fluoxetinu, norfluoxetinu, paroxetinu, venlafaxinu, O-desmetylvenlafaxinu, N-desmetylvenlafaxinu, risperidonu, 9-hydroxyrisperidonu, klozapinu, N-desmetylklozapinu, quetiapinu, olanzapinu, N-desmetylolanzapinu, 2-hydroxyolanzapinu, trazodonu a mirtazapinu (82).

### **3.1 Příprava standardních roztoků a patientských vzorků**

Zásobní roztoky jednotlivých léčiv o koncentraci 100 mg/l byly připraveny navážením a rozpuštěním v methanole. Léčiva byla podle terapeutických rozmezí rozdělena do tří skupin na látky s nízkou, střední a vysokou koncentrací a byly připraveny jejich směsné roztoky. Mezi látky tvořící směs o nízké koncentraci 400 ng/ml patří risperidon a 9-hydroxyrisperidon, mezi látky tvořící směs se střední koncentrací 4000 ng/ml patří fluoxetin, norfluoxetin, citalopram, desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram, paroxetin, sertralin, demetylsertralin, olanzapin, 2-hydroxyolanzapin, demetylolanzapin, quetiapin, mirtazapin, a mezi látky tvořící směs o vysoké koncentraci 8000 ng/ml patří klozapin, N-desmetylklozapin, venlafaxin, O-desmetylvenlafaxin, N-desmetylvenlafaxin a trazodon. Kalibrační standardy byly naředěny na následující koncentrace: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 a 100 ng/ml pro látky s nízkou koncentrací; 2,5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 a 1000 ng/ml pro látky se střední koncentrací; 5, 50, 100, 250, 500, 1000 a 2000 ng/ml látky s vysokou koncentrací. Alprenolol byl použit jako vnitřní standard o koncentraci 20 000 ng/ml. Následně byla metoda rozšířena o stanovení hladiny mirtazapinu (látko o střední koncentraci) a trazodonu (látko o vysoké koncentraci) a obě byly validovány samostatně.

K přípravě vzorku se používá 0,2 ml patientského séra, 0,05 ml vnitřního standardu, 0,5 ml 0.05% ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O ve směsi acetonitril/metanol (40:60, v/v) a 0,2 ml vody. Směs je 30s míchána na vortexu, 5 minut je ponechána při 4°C a následně

centrifugována 10 minut při 1370 x g. Kalibrační roztoky a kontroly kvality byli připravovány stejným způsobem.

### **3.2 Testování matricového efektu**

Matricový efekt byl zjišťován post-kolonou infuzí, na kolonu byl injektován precipitační roztok s vodou a precipitační roztok se sérem od dárce neužívajícího léky a následně postupně standardy léků o koncentraci 100 ng/ml. Plochy píků precipitačního roztoku se sérem byly porovnány s precipitačním roztokem s vodou.

### **3.3 Podmínky chromatografické analýzy a hmotnostní detekce**

HPLC-MS/MS analýza probíhá na kapalinovém chromatografu Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) ve spojení s kvadrupolovým analyzátozem Quattro Micro API triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK). Separace probíhá na koloně Acquity UPLC RP BEH C18, 1.7 $\mu$ m; 2.1 x 50 mm, při teplotě 30°C. Je používána mobilní fáze A (2 mmol/L octan amonný, 0.1% kyselina mravenčí v 5% acetonitrilu, v/v/v) a mobilní fáze B (2 mmol/L octan amonný, 0.1% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu, v/v/v). Separace probíhá v gradientu mobilní fáze následovně: 0 min A: B = 80:20 (v/v), 3 min 5 : 95, 3.1 min 80 : 20, 5 min 80 : 20, průtok je 0.4 ml/min. Celková doba analýzy je 5 min. Jako způsob ionizace se využívá elektrosprej v pozitivním modu (ESI<sup>+</sup>). Podmínky ESI<sup>+</sup>: kapilární napětí 1.5 kV, teplota zdroje 100 °C, desolvatační teplota 420 °C. Tyto podmínky byly vybrány jako nejlepší z testovaných podmínek. Jako kolizní plyn byl používán argon a pracuje se v MRM módu (multiple reaction monitoring). Všechna data analýzy byla vyhodnocována pomocí programu MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) (82).

### **3.4 Analýza patientských vzorků**

Vzorky krve na stanovení psychofarmak byly získány od pacientů hospitalizovaných na Psychiatrickém oddělení FN Ostrava. Vzorky krve byly pacientům odebírány v den hospitalizace a následně 3. - 4. den hospitalizace před a po užití léků. Za 2 hodiny po podání byly odebírány vzorky u pacientů, kteří užívali citalopram, venlafaxin, mirtazapin, trazodon, klozapin, quetiapin a risperidon. Za 6 hodina po podání byl proveden odběr vzorku u pacientů, kteří užívali fluoxetin, paroxetin, sertralin a olanzapin. U pacientů, kteří užívali léčiva večer, byly vzorky v několika případech odebírány alespoň před večerním užitím. Jedná se o pacienty užívající mirtazapin a trazodon. Čas odběru po podání byl volen na základě  $t_{max}$  daného léčiva (83).

Některí pacienti byli opakovaně hospitalizováni a jejich vzorky byly měřeny jako při první hospitalizaci. Vzorky byly ihned odesílány do laboratoře, centrifugovány a měřeny.

#### 4. VÝSLEDKY

Uřinová R, Brozmannová H., Šišťák P., Šilhán P., Kacířová I., Lemr K., Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *J.Chromatogr. B*, 2012; 907, 101-107

Grundmann M., Uřinová R., Šilhán P., Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem- využití TDM, fenotypizace a genotypizace, *Klin. Farmakol. Farm.*, 2012; 90-92

#### 4.1 Validace metody

Metoda byla validována podle FDA kritérií. Rozsah kalibračních křivek byl zvolen na základě terapeutických rozmezí jednotlivých léčiv, u látek s nízkou koncentrací 0,5-100 ng/ml; u látek se střední koncentrací 2,5-500 ng/ml a u látek s vysokou koncentrací 5-2000 ng/ml. Limit kvantifikace je roven prvnímu bodu kalibrační křivky. Korelační koeficienty kalibračních křivek se nachází v rozmezí 0,995-1,0. Pro hodnocení opakovatelnosti (intraassay) a reprodukovatelnosti (interassay) byly připraveny standardní roztoky o koncentraci: 5, 25, 100 ng/ml pro látky o nízké koncentraci, 10, 100, 500 ng/ml pro látky o střední koncentraci, 50, 250, 1000 ng/ml pro látky o vysoké koncentraci. Každá hladina byla připravena 10krát. Z naměřených hodnot byly vypočítány variační koeficienty a opakovatelnost. Výsledky opakovatelnosti: hodnoty variačních koeficientů všech látek se pohybují v rozmezí 2,1- 8,1 % a výtěžnost 89,1-108,3 %. Výsledky reprodukovatelnosti: hodnoty variačních koeficientů všech látek se pohybují v rozmezí 2,6 – 11,9 % a výtěžnost 88,1 – 112,4 % (82).

#### 4.2 Testování matricového efektu

Matricový efekt, který testován post-kolonovou infuzí, se neprojevil v oblasti chromatogramu 0.45-1.75 min, což je oblast retenčních časů většiny léků, pouze dva nejrychlejší léky olanzapin ( $t_R$  0,52 min) a desmetylolanzapin ( $t_R$  0,47 min) byly testovány porovnáním ploch píků. Průměry ploch jejich píků ve vzorku se sérem byly porovnávány s průměrnou plochou píků ve vzorku bez matrice a výsledné poměry jsou 0.92 a 0.83. Podrobně publikováno v článku *Urinovska et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, J.Chromatogr. B, 2012; 907, 101-107* (82).

#### 4.3 Využití metody pro TDM psychofarmak v rutinní praxi

Hladiny byly stanoveny celkem u 275 pacientů. Z této skupiny pacientů byli vyřazeni ti, u nichž byly měřeny hladiny pouze jednou a nebyly provedeny odběry ve 3.-4.dni hospitalizace a také ti, kteří neměli odběr před a po podání. Ze skupiny pacientů užívajících antidepressiva byli dále vyřazeni pacienti, u nichž nebyl dodržen čas odběrů nebo byla změněna denní dávka. Konečnou skupinu tvořilo 240 pacientů užívající antidepressiva, 163 žen a 77 mužů, průměrný věk pacientů je  $42,8 \pm 15,1$ . V tabulce č. 5

je uvedena charakteristika souboru pacientů, údaje byli získány ze žádanek. Je v ní uveden počet žen a mužů, průměrný věk a průměrná denní dávka u sledovaných látek.

Tabulka č. 5: Základní charakteristika souboru pacientů

látka	celkový počet	počet žen	počet mužů	průměrný věk $\pm$ SD (roky)	průměrná dávka $\pm$ SD (mg/den)
PAR	19	12	7	37,6 $\pm$ 13,2	27,7 $\pm$ 13,4
ESCI	64	42	22	40,2 $\pm$ 12,4	12,9 $\pm$ 4,7
MRT	26	18	8	46,8 $\pm$ 13,8	28,2 $\pm$ 11,5
TRZ	28	18	10	48,6 $\pm$ 7,8	124,1 $\pm$ 67,3
SER	32	24	8	42,4 $\pm$ 29,6	108,5 $\pm$ 47
CIT	24	18	6	41,3 $\pm$ 13,9	20,4 $\pm$ 7,6
VEN	47	31	16	46,4 $\pm$ 11,2	168,8 $\pm$ 78,5

PAR...paroxetin, ESCI.....escitalopram, MRT.....mirtazapin, TRZ.....trazodon, SER....sertralin, CIT....citalopram, VEN...venlafaxin

Pacienti byli dále rozděleni podle užívaných látek, při čemž někteří pacienti užívali kombinace léčiv. U pacientů byli vypočítány průměrné hladiny jednotlivých antidepresiv v den přijetí, po 3-4 dnech hospitalizace před podáním a 2 příp. 6 hod po podání, dále byli rozděleni podle denní dávky a byly vypočítány průměrné hladiny u jednotlivých odběrů.

Průměrné hladiny citalopramu, desmetylcitalopramu, escitalopramu, sertralinu, N-desmetylsertralinu a paroxetinu jsou uvedeny v tabulce č. 6. U citalopramu a escitalopramu jsou uvedeny průměrné hladiny u denní dávky 10 a 20 mg/den, u sertralinu 50, 100 a 200 mg/den, u paroxetinu 20 a 40 mg/den, tabulka č. 7. V tabulce č. 8 jsou uvedeny výsledky venlafaxinu a jeho metabolitů O-desmetylvenlafaxinu, N-desmetylvenlafaxinu. Pacienti byli rozděleni do skupiny podle denní dávky 75, 150 a 300 mg/den, tabulka č. 8.

Trazodon a mirtazapin byli pacientům podávány 1x denně večer, hladiny jsou měřeny 12 hod po podání. Mirtazapin byl změřen u 29 pacientů, průměrná hladina za 12 hod po podání byla 33,7  $\pm$  29,0 ng/ml, průměrná denní dávky byla 28,4  $\pm$  11,6 mg/den. Trazodon byl změřen u 28 pacientů, průměrná hladina za 12 hod po podání byla 877,4  $\pm$  510,2 ng/ml, při průměrné denní dávce 124,  $\pm$  67,3 mg/den.



Hladina fluoxetinu a jeho metabolitu norfluoxetinu byla změřena pouze u 3 pacientů, z toho pouze 2 byli změřeni před a po podání. Denní dávka u těchto pacientů byla 20 mg/den. První den byla průměrná hladina fluoxetinu  $85,7 \pm 57$  ng/ml, norfluoxetinu  $152,8 \pm 86,8$  ng/ml. Čtvrtý den před podáním byla průměrná hladina fluoxetinu  $93,1 \pm 41,1$  ng/ml, norfluoxetinu  $124,4 \pm 58,3$  ng/ml, 4. den po podání průměrná hladina fluoxetinu byla  $112,8 \pm 52,5$  ng/ml, norfluoxetinu  $127,9 \pm 64,3$  ng/ml.

Dále jsme zjišťovali kolik pacientů se nacházelo v terapeutickém rozmezí u jednotlivých odběrů při průměrných denních dávkách (tabulka č. 9 a č.10. a graf č. 1-4). Hladina citalopramu, escitalopramu, sertralinu a paroxetinu 1. den při přijetí k hospitalizaci byla v terapeutickém rozmezí u 27-84 % pacientů. 3.- 4. den před podáním se v terapeutickém rozmezí nacházelo 17-75 % pacientů, opět bylo nejvíce pacientů užívajících sertralin. Po podání bylo 3.- 4. den v terapeutickém optimu 27-94 % pacientů. Pod dolní hranicí terapeutického rozmezí se nacházelo 1. den 13-66 % pacientů. Pouze 2-21 % hladin pacientů se nacházelo nad horní hranicí terapeutického rozmezí. U mirtazapinu a trazodonu byly posuzovány pouze hladiny naměřené 1. den hospitalizace za 12 hodin po podání. Z 29 pacientů u mirtazapinu bylo 62 % pacientů pod dolní hranicí terapeutického rozmezí, 31 % se nacházelo v terapeutickém rozmezí a pouze 7 % pacientů bylo nad jeho horní hranicí. U trazodonu z 28 pacientů se 36 % nacházelo pod a nad, a 28 % v terapeutickém rozmezí. U venlafaxinu, je terapeutické rozmezí (100-400 ng/ml) dáno součtem venlafaxinu a metabolitu O-desmetylvenlafaxinu. 1. den se nacházelo v terapeutickém rozmezí 58 % pacientů, 15 % pacientů bylo pod a 27 % nad horní hranicí terapeutického rozmezí. 3.- 4. den před podáním bylo v terapeutickém rozmezí už 67 % pacientů, pouze 2 % pod a 29 % pacientů nad horní hranicí terapeutického rozmezí. 3.- 4. den za 6 hodin po podání se v terapeutickém rozmezí nacházelo 40 % pacientů, ale 57 % bylo nad horní a pouze jeden pacient pod dolní hranicí terapeutického rozmezí.

U pacientů, jimž byla podávána antipsychotika, z důvodu podpůrné terapie nikoli terapie kauzální, nedosahovaly denní dávky úroveň běžně doporučených denních dávek. Hladiny byly měřeny stejně jako u antidepresiv. Antipsychotika většina pacientů užívá 1x večer, což znamená, že hladiny změřené 1. den hospitalizace jsou hladiny za 12 hodin po podání. Quetiapin byl změřen u 47 pacientů 1. den hospitalizace, pouze 17 pacientů bylo změřeno 3.- 4. den před a po podání, jsou to pacienti jimž je quetiapin podáván nejen 1x denně večer. Hladina risperidonu a jeho aktivního metabolitu

9-hydroxyrisperidonu byla změřena u 8 pacientů, jedná se o pacienty, u nichž byl proveden odběr 1.den a následně před a po podání 3.- 4. den hospitalizace. Klozapin byl stanoven pouze u 6 pacientů, z toho pouze 3 pacienti byli změřeni před a po podání. Olanzapin byl změřen u 27 pacientů první den hospitalizace a pouze u 5 pacientů byly změřeny hladiny před a po podání. Průměrná hladina 2-hydroxyolanzapin byla 2,6 ng/ml u všech pacientů. Průměrné hladiny jednotlivých antipsychotik jsou uvedeny v tabulce č.11.

Z vypočítaných poměrů metabolitu/mateřské látky u venlafaxinu, sertralinu, citalopramu, olanzapinu, klozapinu, risperidonu byl stanoven fenotyp, tabulka č. 12, v níž jsou uvedeny pro srovnání i publikované poměry u sledovaných psychofarmak (15).

Tabulka č.6 : Průměrné hladiny citalopramu, escitalopramu, sertralinu a paroxetinu naměřené u pacientů 1. den hospitalizace, 3.-4. den hospitalizace před a po podání.

látka	DDD (mg/den)	mean DD ± SD (mg/den)	terapeutické rozmezí (15) (ng/ml)	n	průměrná koncentrace ± SD (ng/ml)		
					1.den	3.- 4. den	
						před podáním	po podání
citalopram	20-60	20,0 ± 7,3	50-110	29	43,7 ± 36,6	37,2 ± 22,8	53,3 ± 32,7
desmetylcitalopram					6,1 ± 5,1	6,3 ± 4,1	6,6 ± 3,7
escitalopram	10-20	12,9 ± 4,9	15-80	50	24,3 ± 24,2	17,8 ± 13,8	28,9 ± 18,7
sertralin	50-200	102,9 ± 47,2	10-150	32	40,3 ± 30,7	39,1 ± 38,8	56,9 ± 48,9
N-desmetylsertralin					54,3 ± 48,5	76,1 ± 76,9	92,4 ± 94,6
paroxetin	20-50	26,5 ± 11,8	30-120	19	60,0 ± 69,7	49,4 ± 51,2	70,1 ± 67,2

DDD...doporučená denní dávka, DD ...denní dávka, n....počet pacientu SD.... směrodatná odchylka

Tabulka č.7: Průměrné koncentrace citalopramu, escitalopramu, sertralinu a paroxetinu naměřené u pacientů 1. den hospitalizace, 3.-4. den hospitalizace před a po podání u jednotlivých denních dávek.

látka	denní dávka (mg/den)	počet pacientů	průměrná koncentrace ± SD (ng/ml)		
			1.den	3.- 4. den	
				před podáním	po podání
citalopram	10	5	25,0 ± 12,1	21,7 ± 10,0	29,9 ± 14,1
	20	20	40,1 ± 28,1	34,2 ± 12,9	47,9 ± 15,2
escitalopram	10	27	18,8 ± 20,4	13,6 ± 10,0	21,6 ± 12,5
	20	8	36,6 ± 35	28,2 ± 20,3	47,8 ± 24,3
sertralin	50	6	27,6 ± 18,9	19,3 ± 14,6	32,8 ± 16,1
	100	17	46,6 ± 37,0	45,7 ± 41,7	58,3 ± 45,5
	200	4	46,3 ± 10,6	57,7 ± 58,2	108,3 ± 84,3
paroxetin	20	11	33,5 ± 28,3	27,9 ± 19,0	35,4 ± 25,0
	40	3	91,6 ± 52,6	101,1 ± 76,3	134,3 ± 80,9

Tabulka č. 8: Průměrné koncentrace venlafaxinu a jeho aktivního metabolitu O-desmethylvenlafaxinu naměřené u pacientů 1. den hospitalizace, 3.-4. den hospitalizace před a po podání.

látka	denní dávka (mg/den)	počet	průměrná koncentrace ± SD (ng/ml)			
			1.den	3.- 4. den		
				před podáním	2 hod po podání	6 hod po podání
VEN	75	11 <sup>a</sup> /8 <sup>b</sup> /7 <sup>c</sup>	91,7 ± 83,9	73,5 ± 100,5	107,1±136,3	163,3 ± 176,7
ODV			179,8 ± 157,1	141,4 ± 98,2	154,2 ± 87,1	182,2 ± 138,7
VEN	150	15 <sup>a</sup> /13 <sup>b</sup> /10 <sup>c</sup>	103,5 ± 89,8	55,9 ± 48,7	79,3 ± 35,6	140,0 ± 112,6
ODV			235,9 ± 119,5	218,4 ± 99,5	240,4 ± 123,0	304,4 ± 75,5
VEN	300	6 <sup>a</sup> /4 <sup>b</sup> /4 <sup>c</sup>	184,4 ± 192,7	313,8 ± 414,0	518,2 ± 538,8	296,6 ± 421,8
ODV			204,4 ± 181,3	387,3 ± 268,4	511,3 ± 223,6	223,4 ± 112,1

VEN.....venlafaxin; ODV.....O-desmethylvenlafaxin; NDV ... N- desmethylvenlafaxin; a....počet pacientů 1.den a 3.-4.den před podáním, b..... počet pacientů 3.-4.den 2 hod po podání, c..... počet pacientů 3.-4.den 6 hod po podání

Tabulka č. 9: Počet pacientů v terapeutickém rozmezí, pod dolní a nad horní hranicí terapeutického rozmezí u citalopramu, escitalopramu, sertralinu, paroxetinu, mirtazapinu a trazodonu.

látka	celkový počet pacientů	počet pacientů v terapeutickém rozmezí			počet pacientů pod dolní hranicí terapeutického rozmezí			počet pacientů nad horní hranicí terapeutického rozmezí		
		1.den	3.- 4.den		1.den	3.- 4.den		1.den	3.- 4.den	
			před	po		před	po		před	po
citalopram	29	8	5	8	19	24	18	2	-	3
escitalopram	50	24	25	36	25	25	13	1	-	1
sertralin	32	27	24	30	4	7	-	1	1	2
paroxetin	19	9	8	8	8	9	7	2	2	4
mirtazapin	29	9	-	-	18	-	-	2	-	-
trazodon	28	8	-	-	10	-	-	10	-	-

Tabulka č. 10: počet pacientů v terapeutickém rozmezí, pod dolní a nad horní hranicí terapeutického rozmezí u venlafaxinu

		počet pacientů v terapeutickém rozmezí				počet pacientů pod dolní hranicí terapeutického rozmezí				počet pacientů nad horní hranicí terapeutického rozmezí			
látka	n	1.den	3.- 4.den			1.den	3.- 4.den			1.den	3.- 4.den		
			před	2 hod po	6 hod po		před	2 hod po	6 hod po		před	2 hod po	6 hod po
VEN+ ODV	48 <sup>a</sup> /48 <sup>b</sup> / 29 <sup>c</sup> /35 <sup>d</sup>	28	32	19	14	7	2	-	1	13	14	10	20

VEN.....venlafaxin, ODV...O-desmetylvenlafaxin, n... počet pacientů a... počet pacientů 1.den,

b... počet pacientů 3.-4.den před podáním, c... počet pacientů 3.-4. den 2 hod po podání, d... počet pacientů 3.-4. den 6 hod po podání.

Tabulka č.11: Tabulka průměrných hladin antipsychotik

látka	DDD (mg/den)	mean DD ± SD (mg/den)	n	terapeutické rozmezí (15) (ng/ml)	průměrná koncentrace ± SD (ng/ml)		
					1.den	3.- 4. den	
						před podáním	po podání
quetiapin	200-800	189,5 ± 157,8	47	100-500	81,3 ± 108,4	-	-
		183,7 ± 147,4	17		68,8 ± 99,6	38,0 ± 39,6	112,6 ± 86,6
klozapin	200-600	245,8 ± 105,4	6	350-600	198,9 ± 159,1	133,7 ± 89,7*	207,9 ± 60,2*
N-desmethylklozapin					81,1 ± 121,0	95,7 ± 111,4*	58,7 ± 44,3*
olanzapin	5-20	10,3 ± 5,4	27	20-80	30,7 ± 27,4	-	-
		8,2 ± 4,3	5		31,8 ± 12,4	27,6 ± 12,9	28,7 ± 15,5
N-desmethylolanzapin			27		8,0 ± 9,0		
risperidon	4-6	2,0±1,1	8	20-60*	8,2 ± 9,5	4,1 ± 4,9	8,1 ± 8,9
9-hydroxy-risperidon					11,9 ± 8,5	15,0 ± 11,0	17,3 ± 13,3
risperidon+9-hydroxy- risperidon					19,9 ± 15,4	19,1 ± 13,9	25,4 ± 19,4

\*.... tři pacienti, DDD...doporučená denní dávka, DD...denní dávka, n...počet pacientů, \*...terapeutické rozmezí je dáno součtem mateřské látky a metabolitu

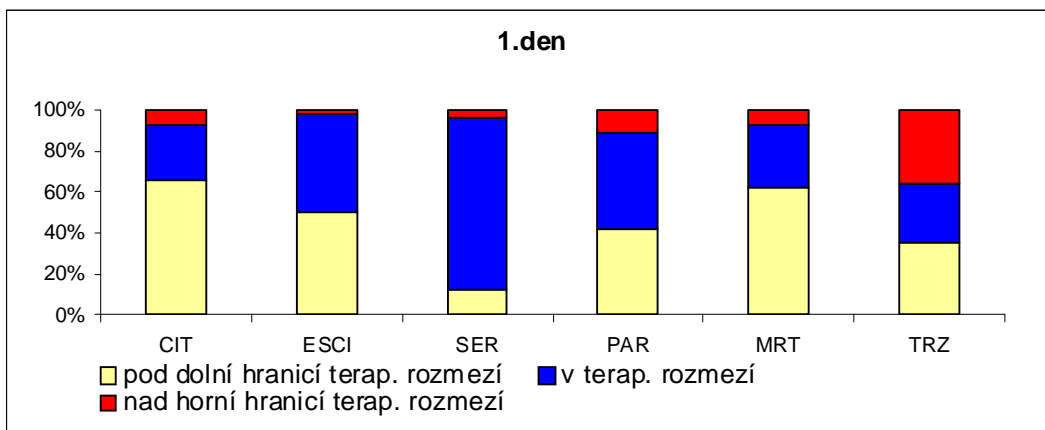


Tabulka č. 12: Průměrné hodnoty poměrů metabolitu/mateřské látky ± směrodatná odchylka

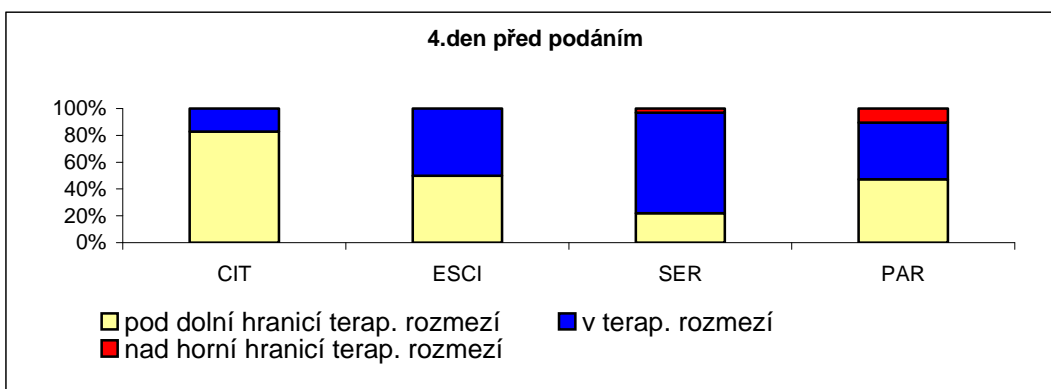
	počet	1.den	3.- 4. den			publikované výsledky poměrů (15)
			před podáním	2 hod po podání	6 hod po podání	
ODV /VEN	43 <sup>a</sup> /29 <sup>b</sup> /30 <sup>c</sup>	3,5 ± 3,8	5,4 ± 5,1	3,9 ± 3,8	2,6 ± 2,3	EM nebo IM CYP2D6 0,3-5,2
NDV/VEN		0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,46-1,48
NSER/SER	31	1,6 ± 1,6	2,6 ± 2,6	-	1,8 ± 1,5	1,7-3,4 (n=348)
dCIT/CIT	29	0,14 ± 0,10	0,19 ± 0,08	0,13 ± 0,09	-	0,31-0,60 (n= 2330)
N-desClz/Clz	6/3*	0,40 ± 0,2	0,58 ± 0,39	0,33 ± 0,27	-	nekuřáci 0,5-0,6 (n=98), kuřáci 0,4-0,7 (n=198)
N-desOla/Ola	27	0,31 ± 0,60	-	-	-	nekuřáci 0,1-0,3 (n=76) kuřáci 0,2-0,4 (n=69),
9-Ris/Ris	8	7,75 ± 11,77	9,0 ± 12,99	4,11 ± 4,01	-	EM nebo IM CYP2D6 1,5-10,0 PM CYP2D6 < 1

VEN...venlafaxin, ODV...O-desmetylvenlafaxin, NDV... N-desmetylvenlafaxin, ser...sertralin, N-ser...desmetylsertralin, dCIT....desmetylcitalopram, CIT..citalopram, N-desClz...N-desmetylklozapin, Clz...klozapin, Ola...olanzapin, N-desola .... N-desmetylolanzapinu, Ris...risperidon, 9-Ris...9-hydroxyrisperidon

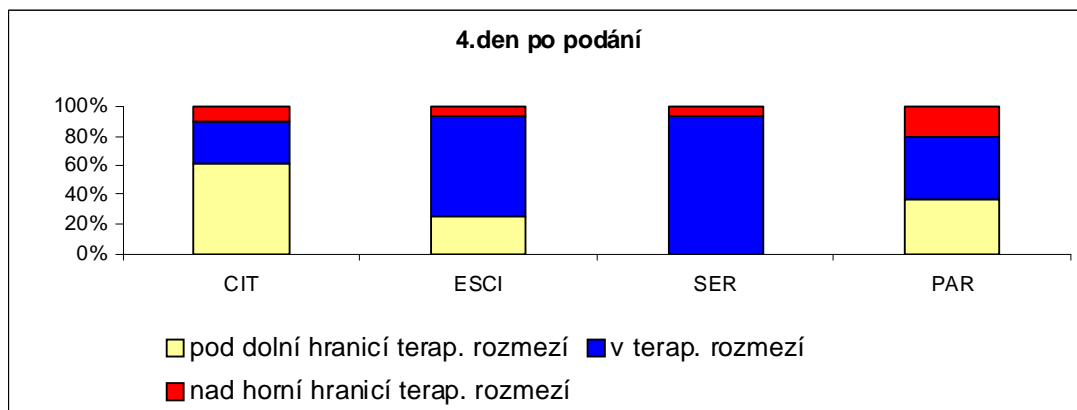
Graf č. 1: procentuální rozložení počtu pacientů nacházejících se pod dolní hranicí, nad horní hranicí a v terapeutickém rozmezí 1.den odběru u citalopramu, escitalopramu, sertralinu, paroxetinu, mirtazapinu a trazodonu.



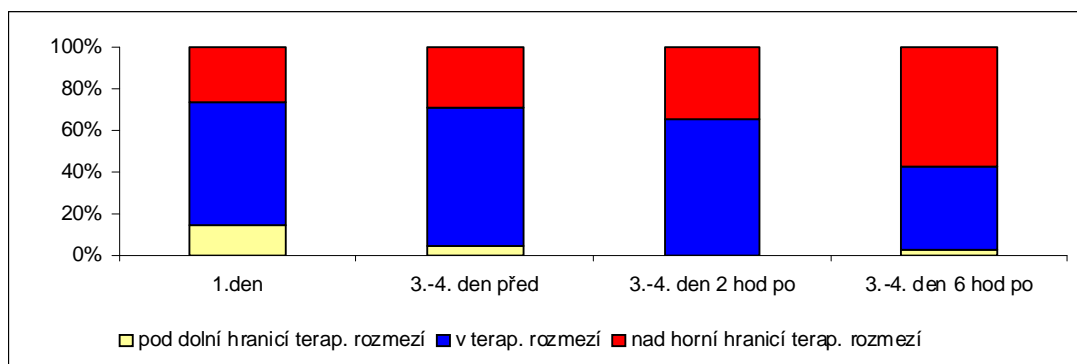
Graf č. 2: procentuální rozložení počtu pacientů nacházejících se pod dolní hranicí, nad horní hranicí a v terapeutickém rozmezí 4.den odběru před podáním u citalopramu, escitalopramu, sertralinu a paroxetinu.



Graf č. 3: procentuální rozložení počtu pacientů nacházejících se pod dolní hranicí, nad horní hranicí a v terapeutickém rozmezí 4.den odběru po podání u citalopramu, escitalopramu, sertralinu a paroxetinu.



Graf č. 4: procentuální rozložení počtu pacientů nacházejících se pod dolní hranicí, nad horní hranicí a v terapeutickém rozmezí 4.den odběru po podání u venlafaxinu.



#### 4.4 Přínos TDM, fenotypizace a genotypizace při terapii deprese (kazuistika)

Pacientka (41 let, hmotnost 72 kg, výška 160 cm, BMI 28.1) byla dlouhodobě léčena na psychiatrické ambulanci pro těžkou depresivní poruchu s psychotickými příznaky kombinovanou terapií: venlafaxin (Olwexya) 150mg 1-0-0 tbl., klonazepam (Rivotril) 0,5mg 1-0-1 tbl., mianserin (Miabene) 30mg 1-0-1 tbl. a olanzapin (Zyprexa) 10mg 0-0-1 tbl.

Pro podezření z intoxikace byla přijata na interní oddělení s krevním tlakem 110/70 mmHg a pulsovou frekvencí 98/min, stěžovala si na velkou únavnost, útlum, nespavost, nechutenství a pokles hmotnosti (za 3 měsíce zhubla 12 kg) a zhoršení nálady trvající 3 měsíce. Uvedla, že před příjmem vzhledem k přetrvávající nespavosti užila navíc 6 tbl Rivotrilu a 4 tbl Miabene, aby lépe spala. Pokus o suicidium odmítla. V průběhu hospitalizace byla vyšetřena psychiatrem, který zvýšil dávkování na Zyprexa 10mg 1-0-1 tbl. Pacientka byla ale za 2 dny propuštěna z důvodu plánované hospitalizace na specializovaném psychiatrickém oddělení pro nedostatečnou terapeutickou odpověď. Při přijetí na psychiatrické oddělení byla pacientka lucidní, orientovaná, odpovědi přiléhavé, v popředí depresivní nálada bez psychotických příznaků. Krevní tlak (TK) 140/90mmHg, puls 68/min, fyzikálně vše v normě.

Po příjmu na psychiatrii bylo provedeno stanovení hladiny venlafaxinu a jeho dvou metabolitů ODV a NDV, olanzapinu a klonazepamu. Byla stanovena hladina venlafaxinu 2638 ng/ml, která vysoce překračovala doporučené rozmezí 100-400 ng/ml. Hladiny olanzapinu se nalézaly v terapeutickém optimu a hladiny klonazepamu pod dolní hranicí terapeutického rozmezí u všech odběrů provedených během hospitalizace.

Za 4 dny při kontrolovaném podávání medikace klesla hladina více než o polovinu, ale byla neustále v potenciálně toxickém rozmezí. Proto bylo doporučeno snížení dávky venlafaxinu na 75mg/den, tedy na polovinu. Kontrola za další 3 dny ukázala stejně vysoké hladiny VEN bez úpravy podávané dávky, znovu bylo doporučeno snížení dávky na 75mg/den. Následně byla dávka snížena, za další 3 dny byly již hladiny v normě a došlo k výraznému zlepšení subjektivních obtíží pacientky, (tabulka č. 13).

Tabulka č. 13: Hladiny venlafaxinu a jeho metabolitů, stanovení fenotypu

den odběru; dávka	čas odběru	VEN (ng/ml)	ODV (ng/ml)	ODV/VEN	NDV (ng/ml)	NDV/VEN
<b>24.10.</b> (150mg/d)	při příjmu	2638	20,6	<b>0,008</b>	731	0,28
<b>28.10.</b> (150mg/d)	před užitím	1106	7,6	<b>0,007</b>	299	0,27
	2 hod po užití	1228	6,7	<b>0,005</b>	301	0,25
	6 hod po užití	977	7,7	<b>0,008</b>	292	0,30
<b>31.10.</b> (150mg/d)	před užitím	1054	12,8	<b>0,012</b>	260	0,25
	2 hod po užití	767	12,6	<b>0,016</b>	241	0,31
	6 hod po užití	1026	11,7	<b>0,009</b>	238	0,23
<b>8.11.</b> (75mg/d)	před užitím	364	2,1	<b>0,006</b>	83	0,23
	6 hod po užití	434	2,4	<b>0,006</b>	73	0,17

Fenotyp byl stanoven jednak z poměru ODV/VEN, jednak použitím modelové látky betablokátoru metoprololu, používaného pro zjištění aktivity CYP2D6 stanovením poměru alfa-hydroxymetoprolol/metoprolol metodou HPLC. Fenotypicky byla pacientka zařazena mezi pomalé metabolizátory (PM), tabulka č. 14.

Tabulka č. 14: Stanovení fenotypu pomocí modelové látky metoprololu

čas (hod)	puls /min	krevní tlak (mmHg)	metoprolol (ng/ml)	hydroxy- metoprolol (ng/ml)	hydroxymetoprolol/ metoprolol
před	65	154/96	-	-	-
8:54	<b>Podání: metoprolol (Betaloc SR 200mg ½ tbl)</b>				
1hod po	59	158/100	65,8	0	-
2hod po	50	148/98	77,6	0	-
3hod po	54	160/96	98,1	0	-

Genetickým vyšetřením pacientky byla zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 (alelická varianta \*5/\*5) (84).

## **5. DISKUSE**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) má široké uplatnění v terapeutickém monitorování léků a jejich metabolitů (imunosupresiva, inhibitory proteáz,  $\beta$  blokátory) a posledních asi 10 letech i při monitorování psychofarmak. Byla publikována řada prací umožňující stanovení jak jednotlivých tak současně několika psychofarmak a jejich aktivních i neaktivních metabolitů (85-88). Jednalo se o práce popisující hlavně metodu stanovení nikoli i stanovení hladin u pacientů. Přesto, že jsou psychofarmaka používána od 60. let minulého století, první guidelines vyšli až v roce 2004 a byli aktualizováni v roce 2011 (15, 53).

Základním předpokladem pro TDM je vývoj metody vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro analýzu léčiv se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI), převážně v pozitivním módu, a v menší míře chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do  $m/z < 1000$  (89-92). Kolizní energie, napětí na kuželu a produktový iont byly zvoleny pro jednotlivé látky na základě jejich nejvyšší odezvy. Tyto parametry byly nastaveny pro ESI i pro APCI, porovnání ionizačních technik bylo provedeno na základě pěti měření standardu o nejvyšší koncentraci. Pouze u olanzapinu byla zjištěna větší průměrná plocha při použití APCI 77121,3, než u ESI 60422,9. U ostatních látek se rozdíl ploch pochyboval v rozmezí dvojnásobku až desetinásobku pro ESI (82). Z toho důvodu byl pro validaci metody a následné měření vybrán elektrosprej. Z autorů jen Berna et al (89) and Bogusz et al (90) využívali ve svých pracích APCI pro stanovení olanzapinu, ale netestovali ESI (81).

Při výběru chromatografických podmínek je důležitý výběr vhodné mobilní fáze, který má vliv na tvorbu iontů a minimalizaci tvorby nežádoucích adduktů. Jako mobilní fáze se nejčastěji používá metanol/voda, acetonitril/voda nebo metanol/acetonitril/voda spolu se slabými kyselinami (kyselina octová nebo mravenčí) nebo kyselý pufr (mravenčan amonný, octan amonný). Slabé kyseliny se přidávají do mobilní fáze v koncentraci 0,005 – 0,05 %. Kyselina mravenčí a kyselina octová se doporučují pro přípravu mobilní fáze s nízkým pH při použití elektrospreje (81). Samozřejmě musí být optimalizovány i parametry jako průtok plynu, teplota analýzy a další. Celková doba analýzy je u naší metody 5 minut, což je velmi výhodné pro rutinní použití a je porovnatelná s již publikovanými pracemi. Jako vnitřní standard

byl zvolen alprenolol, který není již v České republice registrovaný a tedy nevzniká riziko interference.

Extrakce vzorku spočívá v precipitaci proteinů. K precipitaci proteinů se používá metanol, acetonitril, síran zinečnatý nebo jejich kombinace. Metanol a acetonitril jsou účinné při precipitaci proteinů asi v 98 %, jestliže jsou používány v poměru 2:1 nebo vyšším. Při precipitaci proteinů nedojde ale k účinnému odstranění solí a lipidů, které mohou být jednou z příčin matricového efektu. Matricové komponenty charakteristické pro jednotlivé biologické materiály interferují v různých časech a v rozdílném rozsahu v průběhu analýzy (81, 93, 94).

Matricové efekty mají velký význam při stanovování léků a jejich metabolitů za použití HPLC-MS a lze je definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. Vznikají jako výsledek soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem a nejsou předvídatelné (81). Ionizace za atmosferického tlaku (APCI) je vůči matricovým efektům méně citlivá než elektrosprej. Eeckhaut et al. (93) porovnávali vliv matricového efektu při použití APCI a ESI, ale jeho mechanismus nebyl doposud objasněn.

Matricový efekt zahrnuje jak potlačení tak zvýšení ionizace. Důsledkem těchto procesů je snížení nebo zvýšení odezvy. Některé složky mobilní fáze mohou být příčinou matricového efektu, stejně jako i některé exogenní materiály, jako jsou polymery obsažené v různých odběrových plastických nádobách nebo některá antikoagulantia např. heparin litný. Chin et al. (95) zjišťovali matricový efekt běžně používaných antikoagulantii a lipemie. Jejich výsledky naznačují, že použití heparinu sodného nebo  $K_3EDTA$  může komplikovat stanovení a jejich použití není vhodné pro analýzu léků. Z toho důvodu jsme dali přednost odběrovým systémům bez antikoagulantia (81, 94).

Velké rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých technik úpravy vzorku. Precipitace proteinů acetonitrilem u LC-ESI-MS/MS vykazuje největší matricový efekt s mohutnou supresí zejména na začátku a na konci chromatogramu, kde díky neselektivní precipitaci proteinů je tzv. „přečištění“ biologického materiálu nedostatečné. Tímto způsobem se dostatečně neodstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Ty mohou být příčinou snížení ionizace u látek, které mají krátký retenční čas. A proto se dává přednost kombinaci acetonitrilu a metanolu. Proto jsme i my



v naší metodě zvolili k precipitaci proteinů směs acetonitril/metanol (40:60, v/v) s 0.05% síranem zinečnatým. Tento postup byl již široce využíván a diskutován při stanovení imunosupresiv (96-99).

Matricový efekt může ovlivnit jak kvalitu tak kvantitu. Běžně se používají dvě metody hodnocení matricového efektu, infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přídavek po extrakci. Vše probíhá za podmínek, které se používají při vlastní analýze. Určí se oblast chromatogramu, kde může pravděpodobně docházet k matricovým efektům. V našem případě byla na hodnocení matricového efektu použita post-kolonová infuze. Tento způsob lze použít u stanovení s menším počtem analytů nebo u vzorků se stejnou biologickou matricí. Na kolonu kapalinového chromatografu byly injikovány vzorky s extraktem biologické matrice při současné post kolonové infuze jednotlivých látek. V oblasti chromatogramu 0.45-1.75 min, kde se nacházejí retenční časy většiny analyzovaných látek nebyl zjištěn významný matricový efekt. U dvou nejrychlejších analytů, olanzapinu s retenčním časem 0,52 min a desmethylolanzapinu s časem 0,47 min, byl matricový efekt testován i další metodou, a to porovnáním plochy píků jednotlivých látek. Byly vypočítány poměry ploch píku standardů bez matrice séra a s matricí. Za matricový efekt je považováno, jestliže rozdíl odezvy v matricích je větší než 25 %. Zjištěné poměry byly nižší (8 % a 17 %) než 25 % a metodu lze tedy použít ke kvantifikaci (81, 94).

K potlačení matricového efektu může dojít také použitím malých objemů nastříkovaných na kolonu, proto je nastříkováno na kolonu pouze 10 µl vzorku. I použití vnitřního standardu předpokládá, že bude stejně ovlivněn matricovým efektem jako analyty (81).

Druhým cílem této práce bylo využití HPLC-MS/MS metody v klinické praxi, ve spolupráci s Oddělením psychiatrie FN Ostrava byly vzorky odebírány pacientům užívajícím námi stanovovanou antidepresiva, antipsychotika nebo jejich kombinace. Hlavním důvodem využití TDM u psychofarmak je značná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů u jednotlivých pacientů. TDM využívá stanovení koncentrace léčiva v krevní plazmě nebo séru k titraci dávky u jednotlivých pacientů tak, aby bylo dosaženo maximální účinnosti s co nejnižším rizikem toxicity (53).

Češková publikovala, že deprese je častější u žen než u mužů a to v poměru 2:1, což potvrzuje i rozložení naší skupiny pacientů (100).

Při rutinním sledování hladin antidepresiv byla u všech látek při nižších denních dávkách nalezena vyšší koncentrace v den přijetí oproti koncentraci stanovené 3.- 4. den hospitalizace před podáním, což souviselo pravděpodobně s tím, že pacienti již léčivo užili. Naopak u vyšších denních dávek sertralinu (200mg/den) a zejména u venlafaxinu byly nalezeny výrazně nižší koncentrace 1.den než 3.- 4. den. hospitalizace, kdy bylo zajištěno pravidelné užívání medikace.

U venlafaxinu při denní dávce 300mg/den 3.- 4. den hospitalizace byly through hodnoty mateřské látky a účinného metabolitu ODV v průměru 700 ng/ml a 2 hodiny po podání více než 1000 ng/ml. Pacienti si pravděpodobně sami doma snižovali dávku vzhledem k výraznému překročení doporučeného referenčního rozmezí a touto noncompliance si sami snižovali případné nežádoucí účinky.

Většina pacientů byla vzhledem k doporučeným referenčním rozmezím poddávkována, nejvíce v případě citalopramu při dávce 10 i 20 mg/den a u escitalopramu při dávce 10 mg/den. Obdobné nálezy jsme pozorovali i u paroxetinu 20 mg/den, naopak u sertralinu ve všech sledovaných dávkách 50, 100 a 200 mg/den se nalézaly hladiny v terapeutickém optimu.

Simmons et al prokázali, že plazmatické hladiny citalopramu pod 50 ng/ml vykazují výrazně nižší zlepšení podle Hamiltonovy stupnice hodnocení deprese (9), v našem souboru bylo takových pacientů 84 %. Opačné výsledky jsme našli v případě venlafaxinu, kdy 27 % pacientů bylo nad horní hranici terapeutického optima.

U antipsychotik byly v den přijetí všechny hladiny vyšší než 3.- 4. den hospitalizace, což pravděpodobně souvisí s odběrem po podání léku. Pouze v případě olanzapinu se při hospitalizaci nacházeli hladiny v terapeutickém optimu, u risperidonu a jeho metabolitu byly na dolní hranici terapeutického rozmezí. Pacienti užívající quetiapin a zejména klozapin byli výrazně poddávkováni. 40-70 % pacientů léčených klozapinem jsou nonrespodéry nebo parciálními respodéry na klozapin. Právě u těchto by bylo optimální stanovení hladin před změnou strategie. Česková uvádí, že v udržovací léčbě jsou hladiny nad 200 ng/ml spojeny s vyšší pravděpodobností dosažení/udržení remise (43). U tří pacientů 3.- 4. den hospitalizace před podáním byla průměrná hladina nižší než uvedená hladina.

Stanovení poměru metabolitu a mateřské látky může v určitém případě mít i velký klinický význam. V kazuistice pacientky intoxikované venlafaxinem byl zjištěn

její fenotyp a genotyp. Venlafaxin je metabolizována CYP2D6, který vykazuje velký genetický polymorfismus. Stanovení třech nejčastěji se vyskytujících PM alel (CYP2D6\*3, \*4 a \*5) určí 95 % pomalých metabolizátorů, u kterých dochází k minimální metabolizaci na aktivní metabolit ODV, v našem případě byla v DNA pacientky zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 (alelická varianta \*5/\*5). Tento genotyp vysvětluje nález fenotypu – poměr ODV/VEN byl menší než 1% a u modelové látky metoprololu nebyl metabolit vůbec nalezen. Při takovéto konstelaci metabolické kapacity může dojít ke kumulaci mateřské látky v krvi a tím i k projevům intoxikace. Podle naměřených hladin při příjmu na psychiatrické oddělení musela pacientka užívat i výrazně vyšší dávky venlafaxinu, jelikož při kontrolovaném podávání na oddělení se hladiny VEN snížily více než dvojnásobně a zůstaly týden obdobné. Při stanovování fenotypu pomocí modelové látky - betablokátoru metoprololu, je běžně kontrolován krevní tlak, aby se předešlo riziku hypotenze. U pacientky byl zjištěn pokles tepové frekvence, ale navíc hypertenze ve všech sledovaných časech. Hypertenze bývá též častým nežádoucím projevem při terapii VEN, což mohlo být způsobeno zvýšenou koncentrací psychofarmak při akutní intoxikaci. U naší pacientky jsme diagnostikovali pomocí TDM, fenotypizace a genotypizace rizikového pacienta při terapii léčiv metabolizovaných CYP2D6. Jako PM je vystavena většímu riziku intoxikace. Většina nežádoucích účinků vymizela po snížení dávky na 75 mg/den při dosažení doporučeného terapeutického rozmezí. Případ této pacientky poukazuje na důležitost TDM, zjištění diagnózy PM má význam pro pacientku i do budoucna, poněvadž při eventuální další léčbě je potřeba provádět TDM při použití jiných antidepresiv (amitriptylin, klomipramin, desipramin, fluoxetin, imipramin, maprotilin, nortriptylin, paroxetin), neuroleptika (haloperidol, perfenazin, risperidon, thioridazin, zuklopentixol), analgetika (kodein, tramadol), antiemetika (setrony), beta-blokátory (metoprolol, karvedilol), antiarytmika (propafenon) (84, 101, 102).

Nedostatkem naší úvodní studie zavádění TDM antidepresiv a antipsychotik je neznalost klinického stavu pacienta, aby hladiny mohly být interpretovány v korelaci s klinickým stavem. První výsledky ukazují, že TDM psychofarmak může být vhodnou a užitečnou součástí racionální farmakoterapie v psychiatrii.

Kromě přesné a správné analytické metody bude třeba přesné interpretace získaných výsledků a zejména velmi úzká spolupráce s psychiatry.

## **6. ZÁVĚRY**

1. Byla vyvinuta a validována metoda na stanovení pěti antidepresiv a čtyř antipsychotik a některých jejich metabolitů, vyznačující se snadnou přípravou vzorku a krátkým časem analýzy, která je vhodná pro terapeutické monitorování a případně i pro zjištění fenotypu pacientů na základě poměrů metabolitu ku mateřské látce, což dokládá článek *Uřinovska et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum.*

2. Význam terapeutického monitorování psychofarmak v rutinní praxi je publikován v článku *Grundmann M., Uřinovská R., Šilhán P., Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem – využití TDM, fenotypizace a genotypizace.* Tato kazuistika poukazuje na význam TDM, stanovení fenotypu a genotypu a následného využití pro individuální terapii daného pacienta i v budoucnu.

3. Terapeutické monitorování může být v klinické praxi využito k personalizované farmakoterapii, to jest k optimalizaci dávkování psychofarmak u každého jednotlivého pacienta. Napomáhá k maximalizaci účinnosti a prevenci toxicity, a to zejména u jedinců, kteří při standardním dávkování nereagují na léčbu nebo mají nežádoucí reakce. Využití TDM v psychiatrii zvyšuje účinek léčby a snižuje náklady, a to především tehdy, pokud je prováděno erudovaným klinickým farmakologem. V klinické praxi je snaha stanovit optimální individuální dávku psychofarmaka často řízena strategií pokusu a omylu. Nedostatečné využití TDM v psychiatrii ukazuje potřebu zvyšování edukace psychiatrů a klinických farmakologů o úloze TDM psychofarmak, což dokládají články *Grundmann M., Kacirova I., Uřinovska R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs.* *Uřinovská et al. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs* a *Kacířová I., Grundmann M., Uřinovská R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak*, které se zaměřují na jednotlivá psychofarmaka a shrnují již publikované údaje o významu terapeutického monitorování. Pro TDM je nutná i analytická metoda, která umožní stanovení léku a případně i jeho metabolitů. Článek *Uřinovská et al. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak* popisuje metody, které lze využít pro TDM psychofarmak, dále uvádí výhody a nevýhody zmíněných metod a také biologické materiály využívané k jejich stanovení. Nejčastěji používanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotní spektrometrií. Vývoj této metody

může být ovlivněn matricovými efekty, které mají vliv na kvalitu i kvantitu stanovení. Touto problematikou se podrobně zabývá článek *Klapková E., Uřínovská R., Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií*

## 7. SOUHRN

Psychofarmaka jsou široce používána jak v psychiatrii, tak v mnoha dalších oblastech medicíny. Prevalence psychických onemocnění dle epidemiologických studií stoupá a s tím je spojena i zvyšující se preskripce psychofarmak, přesto významný počet pacientů léčených psychofarmaky z nejrůznějších důvodů neodpovídá na léčbu nebo je jejich odpověď neuspokojivá. Kromě patrného úsilí vyvíjet nová psychofarmaka s novými mechanizmy účinku je nezbytné především optimalizovat farmakoterapii dostupnými psychofarmaky. K tomuto účelu se jeví jako potenciálně vhodný nástroj terapeutické monitorování léčiv. Vhodnou metodou pro stanovení psychofarmak je kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí pro vysokou selektivitu, citlivost, snadnou přípravu vzorku a rychlost analýzy. Byla vyvinuta a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na stanovení citalopramu, desmetylcitalopramu, didesmetylcitalopramu, sertralinu, N-desmetylsertralinu, fluoxetinu, norfluoxetinu, paroxetinu, venlafaxinu, O-desmetylvenlafaxinu, N-desmetylvenlafaxinu, risperidonu, 9-hydroxyrisperidonu, klozapinu, N-desmetylklozapinu, quetiapinu, olanzapinu, N-desmetylolanzapinu, 2-hydroxyolanzapinu, mirtazapinu a trazodonu. Separace probíhá v gradientu mobilní fáze (octan amonný: kyselina mravenčí: acetonitrilu, v/v/v), na koloně Acquity UPLC RP BEH C18 při teplotě 30°C. Jako způsob ionizace se využívá elektrosprej v pozitivním modu (ESI<sup>+</sup>). Metoda byla validována podle FDA kritérií. Výsledky opakovatelnosti: hodnoty variačních koeficientů všech látek se pohybují v rozmezí 2,1- 8,1 % a výtěžnost 89,1-108,3 %. Výsledky reprodukovatelnosti: hodnoty variačních koeficientů všech látek se pohybují v rozmezí 2,6 – 11,9 % a výtěžnost 88,1 – 112,4 %. Metoda splňuje všechny podmínky pro validaci a metodu lze použít pro rutinní monitorování psychofarmak. Vzorky krve byly získány od pacientů hospitalizovaných na Psychiatrickém oddělení FN Ostrava, odebírány v den hospitalizace a následně 3.- 4. den hospitalizace před a po užití léků. Pacienti, kteří užívali citalopram, venlafaxin, mirtazapin, trazodon, klozapin, quetiapin a risperidon byli odebíráni za 2 hod po podání, pacienti užívající fluoxetin, paroxetin, sertralin a olanzapin byli odebíráni za 6 hod po užití léku. U pacientů, kteří užívali léčiva večer, byly vzorky v několika případech odebírány alespoň před večerním užitím. Jedná se o pacienty užívající mirtazapin a trazodon. Pacienti byli rozděleni podle užívaných látek, někteří pacienti užívali kombinace léčiv, byly vypočítány průměrné hladiny, denní dávky a poměry mateřské látky ku metabolitu, byla posuzována compliance. 1. den při přijetí k hospitalizaci bylo v terapeutickém rozmezí u 27-84% pacientů



užívajících citalopram, escitalopram, sertralin a paroxetin. Pod dolní hranicí terapeutického rozmezí se nacházelo 1. den 13-66 % pacientů. Pouze 2-21 % hladin pacientů se nacházelo nad horní hranicí terapeutického rozmezí. U venlafaxinu se 1. den nacházelo v terapeutickém rozmezí 58 % pacientů, 15 % pacientů bylo pod a 27 % nad horní hranicí terapeutického rozmezí. 3.- 4. den před podáním bylo v terapeutickém rozmezí už 67 % pacientů, pouze 2 % pod a 29 % pacientů nad horní hranicí terapeutického rozmezí. Průměrné denní dávky podávané pacientům se nacházely na dolní hranici doporučených denních dávek. Kazuistika pacientky intoxikované venlafaxinem poukazuje na důležitost TDM psychofarmak. Vyšetření fenotypu a genotypu má význam pro pacientku i do budoucna při eventuální léčbě léky metabolizovanými CYP2D6.

## **SUMMARY**

Psychiatric medications play a crucial role in recovery of many individuals with mental and health disorders. Finding the most beneficial and well-tolerated medications and correct doses, however, can take multiple trials because effectiveness and side effects vary significantly for every individual. There have been several research studies that actually reported that, mental disorders are highly prevalent and our ability to treat them remains limited, these illnesses cause enormous societal burden. Finding the right medication with appropriate dose is critical because failure to respond to or tolerate a medication may lead devastating relapses and life threatening side effects. A significant number of patients treated with psychotropic drugs for various reasons don't respond to treatment or the response is unsatisfactory. Therefore, Optimizing antipsychotic drug therapy to determine appropriate dose according to patient physiologic status is very essential to minimize the adverse effects and the toxicity. A suitable method for determination the psychotropic drugs is liquid chromatography with mass spectrometry detection for high selectivity, sensitivity, ease of sample preparation and speed of analysis. A rapid and simple ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method was developed and validated to simultaneously determine sertraline, N-desmethylsertraline, fluoxetine, N-desmethylsertraline, citalopram, desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram, paroxetine, venlafaxine, N-desmethylvenlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, clozapine, N-desmethyllozapine, olanzapine, N-desmethylolanzapine, 2-hydroxyolanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, mirtazapine and trazodone. Chromatographic separation was carried out on RP column BEH C18, using gradient mobile phases (ammonium acetate: formic acid: acetonitrile, v / v / v) at 30°C. As ionization mode was using electrospray in positive mode. The method was validated according to FDA criteria. Results repeatability: coefficient of variation values of all drugs are in the range from 2.1 to 8.1% and recovery 89.1 to 108.3%. Results reproducibility: coefficients of variation of all drugs are in the range from 2.6 to 11.9% and recovery 88.1 to 112.4%. The method meets all the conditions for validation and method can be used for routine monitoring of psychotropic drugs. Serum samples were obtained from in-patients treated with antidepressants and antipsychotics in the Psychiatric department of University Hospital Ostrava. Serum samples from patients were measured on the day of the admission to hospital, then on 3rd or 4th days of their hospitalization before and after drug administration. Patients receiving citalopram, venlafaxine, clozapine,

quetiapine and risperidone were sampled 2 hours after dose, patients receiving fluoxetine, paroxetine, sertraline and olanzapine, 6 hours after dose. In patients who took drugs in the evening, the samples were collected in a few cases at least before evening use. These patients were treated with mirtazapine and trazodone. Patients were divided according to taking drugs some patients taking combinations of drugs. Average levels, daily doses and ratios of parent drug to metabolite were calculated and also compliance was evaluated. First day at admission was within the therapeutic range in 27-84% of patients taking citalopram, escitalopram, sertraline and paroxetine. Below the lower limit of the therapeutic range is located on 1st day 13-66% of patients. Only 2-21% of levels were the upper limit of the therapeutic range. At venlafaxine 1st day remained in the therapeutic range 58% of patients, 15% were below and 27% above the upper limit of the therapeutic range. 67% of patients were in the therapeutic range, only 2% below and 29% of patients above the upper limit of the therapeutic range 3rd to 4th day before the application. Average daily dose administered to patients were on the lower limit the recommended daily dose. Case report of patient intoxicated with venlafaxine highlights the importance of TDM psychotropic drugs. The phenotype and genotype information is important for the patient to predict the treatment outcome in the future since CYP2D6 is involved in the metabolism of many important antipsychiatric drugs.

## **8. LITERATURA**

1. Furukawa T, Akechi T, Shimodera S, Yamada M, Miki K, Watanabe N, et al. Strategic use of new generation antidepressants for depression: SUN(^\_^)D study protocol. *Trials*. 2011;12:116-35.
2. Fujáková M, Kopeček M. Antidepresiva-od terapie ke klinické praxi. *Klin Farmakol Farm*. 2012:29-37.
3. Bouček J, Pidrman V. *Psychofarmak v medicíně* 1.vyd. Praha,. Grada Publishing. 2005:9-162.
4. Grundmann M, Kacirova I, Urinovska R. Therapeutic monitoring of psychoactive drugs - antidepressants: A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013, Epub ahead of print
5. Reis M, Aamo T, Spigset O, Ahlner J. Serum Concentrations of Antidepressant Drugs in a Naturalistic Setting: Compilation Based on a Large Therapeutic Drug Monitoring Database. *Ther Drug Monit*. 2009;31(1):42-56.
6. Huffman JC, Alpert JE. An approach to the psychopharmacologic care of patients: antidepressants, antipsychotics, anxiolytics, mood stabilizers, and natural remedies. *Med Clin North Am*. 2010;94(6):1141-60,
7. Glassman AH. Tricyclic Antidepressants - Blood Level Measurements and Clinical Outcome - an Apa-Task-Force Report. *Am J Psychiat*. 1985;142(2):155-62.
8. Glassman AH. Antidepressant Plasma-Levels Revisited. *Int Clin Psychopharm*. 1994;9:25-30.
9. Simmons SA, Perry PJ, Rickert ED, Browne JL. Cost-Benefit-Analysis of Prospective Pharmacokinetic Dosing of Nortriptyline in Depressed Inpatients. *J Affect Disorders*. 1985;8(1):47-53.
10. Preskorn SH, Fast GA. Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety, and cost effectiveness. *J Clin Psychiatry*. 1991;52 Suppl:23-33.
11. Andrews PW, Thomson JA, Jr., Amstadter A, Neale MC. Primum non nocere: an evolutionary analysis of whether antidepressants do more harm than good. *Front Psychol*. 2012;3:117.

12. Rasmussen BB, Brosen K. Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors? *Ther Drug Monit.* 2000;22(2):143-54.
13. Yu BN, Chen GL, He N, Ouyang DS, Chen XP, Liu ZQ, et al. Pharmacokinetics of citalopram in relation to genetic polymorphism of CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(10):1255-9.
14. Rao N. The clinical pharmacokinetics of escitalopram. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(4):281-90.
15. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry.* 2011;44(6):195-235.
16. Spina E, Santoro V, D'Arrigo C. Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: An update. *Clin Ther.* 2008;30(7):1206-27.
17. Obach RS, Cox LM, Tremaine LM. Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: An in vitro study. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(2):262-70.
18. Shams MEE, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Muller MJ, Kaiser R, et al. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther.* 2006;31(5):493-502.
19. Nichols AI, Lobello K, Guico-Pabia CJ, Paul J, Preskorn SH. Venlafaxine Metabolism as a Marker of Cytochrome P450 Enzyme 2D6 Metabolizer Status. *J Clin Psychopharm.* 2009;29(4):383-6.
20. Waldschmitt C, Vogel F, Pfuhlmann B, Hiemke C. Duloxetine Serum Concentrations and Clinical Effects. Data from a Therapeutic Drug Monitoring (TDM) Survey. *Pharmacopsychiatry.* 2009;42(5):189-93.
21. Timmer CJ, Sitsen JMA, Delbressine LP. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin Pharmacokinet.* 2000;38(6):461-74.
22. Jefferson JW, Pradko JF, Muir KT. Bupropion for major depressive disorder: Pharmacokinetic and formulation considerations. *Clin Ther.* 2005;27(11):1685-95.

23. Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan BF, Laethem RM, et al. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P4502B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(10):1222-30.
24. Karhu D, Gossen ER, Mostert A, Cronje T, Fradette C. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of once-daily trazodone extended-release caplets in healthy subjects. *Int J Clin Pharm Th.* 2011;49(12):730-43.
25. Kopeček M. Aktualizované klinické a teoretické aspekty podání antipsychotik. *Klin. Farmakol Farm.* 2012;26(1):18-28.
26. Stahl S. *Essential Psychopharmacology of Antipsychotics and Mood Stabilizers.* Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2002.
27. Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects - A comprehensive literature review. *Cns Drugs.* 2005;19:1-93.
28. Herrmann N, Lanctot KL. Do atypical antipsychotics cause stroke? *Cns Drugs.* 2005;19(2):91-103.
29. Luft B, Taylor D. A review of atypical antipsychotic drugs versus conventional medication in schizophrenia. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7(13):1739-48.
30. Češková E, Novotný T, Floriánová A, Palenský V. Snášelnost a bezpečnost antipsychotik druhé a třetí generace. *Čes. a slov. Psychiat.* 2005;101(2):92-7.
31. Farde L, Nordstrom AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(7):538-44.
32. Nyberg S, Nordstrom AL, Halldin C, Farde L. Positron emission tomography studies on D2 dopamine receptor occupancy and plasma antipsychotic drug levels in man. *Int Clin Psychopharmacol.* 1995;10(3):81-5.
33. Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G. Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr Drug Metab.* 2008;9(5):410-8.
34. Spina E, de Leon J. Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100(1):4-22.



35. Carrillo JA, Herraiz AG, Ramos SI, Benitez J. Effects of caffeine withdrawal from the diet on the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharm.* 1998;18(4):311-6.
36. Erickson-Ridout KK, Sun D, Lazarus P. Glucuronidation of the second-generation antipsychotic clozapine and its active metabolite N-desmethylclozapine. Potential importance of the UGT1A1 A(TA)(7)TAA and UGT1A4 L48V polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(8):561-76.
37. de Leon J. Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003;6(1):57-72.
38. Liston HL, Markowitz JS, DeVane CL. Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol.* 2001;21(5):500-15.
39. Khan AY, Preskorn SH. Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiatr Pract.* 2005;11(5):289-301.
40. Mauri MC, Volonteri LS, Colasanti A, Fiorentini A, De Gaspari IF, Bareggi SR. Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics - A critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(5):359-88.
41. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Scordo MG, Ancione M, Madia AG, et al. Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology.* 2000;148(1):83-9.
42. Češková E, Novotný T, Floriánová A, Palenský V. Zlepší monitorování krevních hladin adherenci a efekt léčby u schizofrenie? *Psychiatr praxi.* 2011;12(4):166-8.
43. Češková E. Farmakorezistentní schizofrenie. *Čes. a slov. Psychiatr.* 2007;103(4):190-7.
44. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Salemi M, Scordo MG, Ancione M, et al. Relationship between plasma risperidone and 9-hydroxyrisperidone concentrations and clinical response in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology.* 2001;153(2):238-43.

45. Erickson-Ridout KK, Zhu J, Lazarus P. Olanzapine metabolism and the significance of UGT1A448V and UGT2B1067Y variants. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(9):539-51.
46. Gefvert O, Bergstrom M, Langstrom B, Lundberg T, Lindstrom L, Yates R. Time course of central nervous dopamine-D-2 and 5-HT<sub>2</sub> receptor blockade and plasma drug concentrations after discontinuation of quetiapine (Seroquel (R)) in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology*. 1998;135(2):119-26.
47. Mauri MC, Fiorentini A, Volonteri LS. Quetiapine in acute psychosis and personality disorders during hospitalization: assessment of a therapeutic range. *Eur Neuropsychopharm*. 2004;14:283-94.
48. Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, Kapur S. Amisulpride - dose, plasma concentration, occupancy and response: implications for therapeutic drug monitoring. *Acta Psychiat Scand*. 2009;120(6):416-28.
49. Vogel F, Gansmuller R, Leiblein T, Dietmaier O, Wassmuth H, Grunder G, et al. The use of ziprasidone in clinical practice: Analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects from data of a drug monitoring survey. *Eur Psychiat*. 2009;24(3):143-8.
50. Cherma MD, Reis M, Hagg S, Ahlner J, Bengtsson F. Therapeutic Drug Monitoring of Ziprasidone in a Clinical Treatment Setting. *Ther Drug Monit*. 2008;30(6):682-8.
51. Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, Kapur S. A Systematic Review of Aripiprazole-Dose, Plasma Concentration, Receptor Occupancy, and Response: Implications for Therapeutic Drug Monitoring. *J Clin Psychiat*. 2010;71(11):1447-56.
52. Uřinovská R, Turjap M, Brozmanová H, Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak. *Čes. a slov. Farm*. 2010;59:103-11.
53. Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, et al. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*. 2004;37(6):243-65.
54. Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. TDM "nouveau". *Ther Drug Monit*. 2004;26(2):145-51.

55. Preskorn SH. Patients Who Do Not Respond to the "Usual" Dose: Why Terry Fell Off the Dose-Response Curve. *J Psychiatr Pract.* 2009;15(6):460-6.
56. Ostad Haji E, Tadic A, Wagner S, Dragicevic A, Muller MJ, Boland K, et al. Association Between Citalopram Serum Levels and Clinical Improvement of Patients With Major Depression. *J Clin Psychopharm.* 2011;31(3):281-6.
57. Lundmark J, Bengtsson F, Nordin C, Reis M, Walinder J. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr Scand.* 2000;101(5):354-9.
58. Perry PJ. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics - Is it of potential clinical value? *Cns Drugs.* 2000;13(3):167-71.
59. Hiemke C. Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: does it hold its promises? *Eur Arch Psy Clin N.* 2008;258:21-7.
60. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13-25.
61. Baumann P, Ulrich S, Eckermann G, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, et al. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci.* 2005;7(3):231-47.
62. Caccia S, Garattini S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic significance of antidepressant drug metabolites. *Pharmacological Research.* 1992;26(4):317-29.
63. Rudorfer MV, Potter WZ. The role of metabolites of antidepressants in the treatment of depression. *Cns Drugs.* 1997;7(4):273-312.
64. Grundmann M, Kacirova I. Significance of TDM, phenotyping and genotyping for the correct drug dosage. *Cas Lek Cesk.* 2010;149(10):482-7.
65. Kacířová I, Grundmann M, Uřinová R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak. *Klin Farmakol Farm.* 2012;26(3):131-4.
66. Eilers R. Therapeutic drug monitoring for the treatment of psychiatric disorders - Clinical use and cost effectiveness. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29(6):442-50.

67. Mitchell PB. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Brit J Clin Pharmacol*. 2000;49(4):303-12.
68. Shihabi ZK. Sample Matrix Effects in Capillary Electrophoresis .2. Acetonitrile Deproteinization. *J Chromatogr A*. 1993;652(2):471-5.
69. Saint-Marcoux F, Sauvage FL, Marquet P. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(7):1327-49.
70. Chattergoon DS, Verjee Z, Anderson M, Johnson D, McGuigan MA, Koren G, et al. Carbamazepine interference with an immune assay for tricyclic antidepressants in plasma. *J Toxicol-Clin Toxicol*. 1998;36(1-2):109-13.
71. Dasgupta A, McNeese C, Wells A. Interference of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in the fluorescence polarization immunoassay for tricyclic antidepressants - Estimation of the true tricyclic antidepressant concentration in the presence of carbamazepine using a mathematical model. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(3):418-25.
72. Pavlíková L, Brozmanová H, Kvasnička F, Grundmann M. Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. *Klin Farmakol Farm*. 2007;27:45-9.
73. Rodriguez Flores J, Barzas Nevado JJ, Contento Salcedo AM, Cabello Diaz MP. Development and validation method for determination of Paroxetine and its metabolites by nonaqueous capillary electrophoresis in human urine. Experimental design for evaluating the ruggedness of the method. *Electrophoresis*. 2004;25(3):454-62.
74. Tomita M, Okuyama T. Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines. *J Chromatogr B*. 1996;678(2):331-7.
75. Dorey RC, Preskorn SH, Widener PK. Results Compared for Tricyclic Antidepressants as Assayed by Liquid-Chromatography and Enzyme-Immunoassay. *Clin Chem*. 1988;34(11):2348-51.
76. Chromý V, Fischer J. Analytické metody v klinické chemii, Brno, Masarykova univerzita. 2000(1):96-7.

77. Fernandes C, Van Hoeck E, Sandra P, Lancas FM. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. *Anal Chim Acta*. 2008;614(2):201-7.
78. de la Torre R, Ortuno J, Pascual JA, Gonzalez S, Ballesta J. Quantitative determination of tricyclic antidepressants and their metabolites in plasma by solid-phase extraction (Bond-Elut TCA) and separation by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection. *Ther Drug Monit*. 1998;20(3):340-6.
79. Eap CB, Bouchoux G, Amey M, Cochard N, Savary L, Baumann P. Simultaneous determination of human plasma levels of citalopram, paroxetine, sertraline, and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci*. 1998;36(7):365-71.
80. Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(7):1315-25.
81. Klapková E, Uřinová R, Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klin. Biochem. Metab*. 2011;1:5-8.
82. Uřinová R, Brožmanová H, Sistik P, Silhan P, Kacirová I, Lemr K, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. *J Chromatogr B*. 2012;907:101-7.
83. Thummel KE, Shen DD, Isoherranen N. Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data. United States 2010.
84. Grundmann M, Uřinová R, Šilhán P, Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem- využití TDM, fenotypizace a genotypizace. *Klin Farm Farm*. 2012;90-2.
85. Kirchherr H, Kuhn-Velten WN. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *J Chromatogr B*. 2006;843(1):100-13.
86. Bhatt J, Jangid A, Venkatesh G, Subbaiah G, Singh S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for simultaneous determination of

venlafaxine and its active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma. *J Chromatogr B*. 2005;829(1-2):75-81.

87. Singh SS, Shah H, Gupta S, Jain M, Sharma K, Thakkar P, et al. Liquid chromatography--electrospray ionisation mass spectrometry method for the determination of escitalopram in human plasma and its application in bioequivalence study. *J Chromatogr B*. 2004;811(2):209-15.

88. Pistos C, Koutsopoulou M, Panderi I. A validated liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of mirtazapine and demethylmirtazapine in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *Anal Chim Acta*. 2004;514(1):15-26.

89. Berna M, Ackermann B, Ruterbories K, Glass S. Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2002;767(1):163-8.

90. Bogusz MJ, Kruger KD, Maier RD, Erkwoh R, Tuchtenhagen F. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 1999;732(2):257-69.

91. Chen X, Duan X, Dai X, Zhong D. Development and validation of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of sertraline in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(16):2483-9.

92. Sutherland FC, Badenhorst D, de Jager AD, Scanes T, Hundt HK, Swart KJ, et al. Sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. *J Chromatogr A*. 2001; 914(1-2):45-51.

93. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B*. 2009;877(23):2198-207.

94. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectr*. 2003;14(11):1290-4.

95. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(5):1149-67.
96. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry routine method for simultaneous determination of sirolimus, everolimus, tacrolimus, and cyclosporin A in whole blood. *Clin Chem.* 2002;48(6 Pt 1):955-8.
97. Holt DW, Lee T, Jones K, Johnston A. Validation of an assay for routine monitoring of sirolimus using HPLC with mass spectrometric detection. *Clin Chem.* 2000;46(8):1179-83.
98. Bogusz MJ, Enazi EA, Hassan H, Abdel-Jawaad J, Ruwaily JA, Tufail MA. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure. *J Chromatogr B.* 2007;850(1-2):471-80.
99. Brozmanova H, Perinova I, Halvova P, Grundmann M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cyclosporine A and its three metabolites AM1, AM9 and AM4N in whole blood and isolated lymphocytes in renal transplant patients. *J Sep Sci.* 2010;33(15):2287-93.
100. Česková E. Léčba antidepresivy-interakce věku a pohlaví. *Čes. a slov. Psychiat.* 2011, 107(5):285-8.
101. Peřinová I, Ďuricová J, Brozmanová H, Kacířová I, Grundmann M. Stanovení metoprololu a jeho metabolitu alfa-hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí. *Čes. a slov. Farm.* 2008;57:254-9.
102. Ďuricová J, Grundmann, M CYP2D6 a jeho klinický význam. *Klin Farmakol Farm.* 2007;21:133-6.

## 9. Publikované práce, které jsou součástí disertační práce

9.1 Uřinová R., Turjap M., Brozmannová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, Čes. Slov. Farm., 2010; 59, 103-111

9.2 Klapková E., Uřinová R., Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, Klin. Biochem. Metab. 2011; 1, 5-8.

9.3 Uřinová R., Brozmannová H., Šišťák P., Šilhán P., Kacířová I., Lemr K., Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. J.Chromatogr. B, 2012; 907, 101-107

9.4 Kacířová I., Grundmann M., Uřinová R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak, Klin Farmakol Farm. 2012; 26(3), 31-134

9.5 Grundmann M., Uřinová R., Šilhán P., Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem- využití TDM, fenotypizace a genotypizace, Klin Farmakol Farm. 2012; 90-92

9.6 Grundmann M., Kacirova I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic. 2013, 157, Epub ahead of print

9.7 Grundmann M., Kacirova I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs (článek v přípravě do tisku)



**9.1 Uřinová R., Turjap M., Brozmanová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, Čes. Slov. Farm. 2010; 59, 103-111**

Tento přehled shrnuje metody a možné biologické materiály, včetně jednotlivých příkladů, které lze použít k terapeutickému monitorování (TDM) psychofarmak. Při stanovení se uplatňují imunochemické, elektrochemické a chromatografické metody. Imunochemické metody jsou vhodnější pro screening předávkování než pro TDM oproti chromatografickým metodám. S chromatografických metod převažuje kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, protože zřejmě všechna léčiva lze takto stanovit. Velkou výhodou tohoto spojení je přesnost, široká oblast použití, výrazné zkrácení délky analýzy, možnost stanovit různé kombinace léčivých látek současně s jejich aktivními metabolity.

## Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak

UŘINOVSKÁ R.<sup>1</sup>, TURJAP M.<sup>1</sup>, BROZMANOVÁ H.<sup>1</sup>, GRUNDMANN M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fakultní nemocnice Ostrava, Ústav klinické farmakologie

<sup>2</sup>Ostravská univerzita Ostrava, FZS, Ústav klinické farmakologie

Došlo 27. dubna 2010 / Přijato 27. května 2010

### SOUHRN

#### Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak

V současnosti máme k dispozici již více než stovku psychofarmak s více či méně specifickými účinky na symptomy jednotlivých duševních poruch. Navzdory novým léčebným a diagnostickým možnostem je stále mnoho pacientů, jejichž odpověď na léčbu psychofarmaky není uspokojivá. Zavedení rutinního terapeutického monitorování některých psychofarmak by mohlo pomoci individualizovat a optimalizovat léčbu dle potřeb konkrétního pacienta. Tento článek popisuje analytické metody, které umožňují jejich stanovení se zaměřením na antidepresiva a antipsychotika. V současnosti jsou základními technikami pro stanovení hladin psychofarmak plynová a kapalinová chromatografie. Hlavním biologickým materiálem pro stanovení je sérum nebo plazma. Vzorky k analýze jsou připravovány nejčastěji pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny nebo extrakcí na tuhé fázi. V literatuře byly publikovány metody umožňující stanovení jednoho nebo několika psychofarmak současně, včetně jejich případných aktivních metabolitů.

**Klíčová slova:** psychofarmaka – terapeutické monitorování léčiv – vysokoúčinná kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie

Čes. a slov. Farm., 2010; 59, x–xx

### SUMMARY

#### Analytical methods for the determination of selected psychopharmaceuticals

At present at our disposal there are more than one hundred psychopharmaceuticals with more or less specific effects on the symptoms of individual mental disorders. Despite new therapeutic and diagnostic possibilities there are still many patients whose response to treatment with psychopharmaceuticals is not satisfactory. Introduction of a routine therapeutic monitoring of some psychopharmaceuticals could help to individualize and optimize the treatment according to the needs of a concrete patient. This paper describes the analytical methods which enable their determination with regard to antidepressants and antipsychotics. At present the principal techniques for the determination of the levels of psychopharmaceuticals are gas and liquid chromatography. The principal biological material for the determination is serum or plasma. Samples for analysis are prepared most frequently by means of extraction from a liquid to a liquid or extraction on a solid phase. The published literature presents the methods making it possible to determine one or several psychopharmaceuticals simultaneously, including their possible active metabolites.

Key words: psychopharmaceuticals – therapeutic monitoring of drugs – high-performance liquid chromatography – mass spectrometry

Čes. a slov. Farm., 2010; 59, x–xx

*Má*

#### Adresa pro korespondenci:

Mgr. Romana Uřínovská  
Ústav klinické farmakologie FN Ostrava  
14. listopadu 1790, 708 52 Ostrava – Poruba  
e-mail: romanaurinovska@seznam.cz

## Deprese a antidepressiva

Afektivní poruchy, především deprese, představují zřejmě největší zdravotní zátěž společností moderního světa měřeno roky ztracenými předčasným úmrtím nebo strávenými pod negativním vlivem závažné nemoci. Poruchy nálady začínají v časně dospělosti (25–32 let) a postihují z celoživotního pohledu více než jednu pětinu obyvatelstva. Ani v nejvyspělejších státech světa však nejsou správně diagnostikovány a včas léčeny. V České republice bylo dle dat z roku 2000 adekvátně léčeno pouze 13,4 % pacientů trpících depresivními syndromy, přičemž depresivní porucha je ve většině případů chronickým onemocněním. Pacienti trpící depresí častěji čerpají zdravotní služby, častěji jsou v pracovní neschopnosti a 7–15 % z nich ukončí život sebevraždou<sup>1)</sup>.

**Antidepressiva I. generace** se používají již více než 40. let. Jedná se o látky, které zvyšují koncentraci biogenních aminů (serotoninu, noradrenalinu a dopaminu) v limbické oblasti CNS a dále ovlivňují celou řadu neurotransmiterových receptorů včetně histaminových, muskarinových a  $\alpha_1$  adrenergických, z čehož vyplývá, že mohou vyvolat celou řadu nežádoucích účinků. Některé z těchto účinků jsou pro pacienty obtěžující (například tachykardie, zácpa, útlum, porucha akomodace, vzestup tělesné hmotnosti a sucho v ústech) a často mohou být důvodem špatné adherence k léčbě. Mezi závažné komplikace patří zmatenost, srdeční arytmie, posturální hypotenze a u mužů s hypertrofií prostaty močová retence. Doba nástupu antidepressivního účinku je zhruba 10–20 dnů od začátku terapie. Nevýhodou je zejména nutnost titrace dávky, nežádoucí účinky, vysoký interakční potenciál a úzké terapeutické rozmezí. Patří sem amitriptylin, nortriptylin, imipramin, klomipramin<sup>2,3)</sup>.

**Antidepressiva II. generace** vykazují méně nežádoucích anticholinergních účinků, působí pouze na noradrenergický a serotoninergický systém, neovlivňují tedy histaminergický a  $\alpha_1$  adrenergický receptory. Jsou pacienty lépe snášena a lze je použít i u pacientů s glaukomem, hypertrofií prostaty a ischemickou chorobou srdeční. Po zavedení III. generace antidepressiv má tato skupina poněkud menší význam, podobně jako první generace. Zástupci jsou maprotilin, mianserin<sup>2,3)</sup>.

**Antidepressiva III. generace** jsou tvořena látkami selektivně inhibujícími zpětné vychytávání serotoninu (SSRI). Oproti předchozím generacím antidepressiv mají příznivější bezpečnostní profil, nepůsobí sedativně, nezvyšují tělesnou hmotnost a nepotencují účinek alkoholu. Protože mají výhodnější farmakokinetické vlastnosti, mohou se užívat pouze v jedné denní dávce. Negativem jsou zejména sexuální a gastrointestinální potíže. Účinek nastupuje zpravidla za 2–4 týdny. Všechny šest zástupců SSRI jsou více či méně silnými inhibitory aktivity enzymu P450 a zejména fluvoxamin, fluoxetin a paroxetin mají významný interakční potenciál. Patří sem citalopram a escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin a sertralín<sup>2,3)</sup>.

**Antidepressiva IV. generace a další nová antidepressiva** zastupují látky různých mechanismů účinku, jak bylo zmíněno výše, např. SNRI (duální inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu) (duloxe-

tin, venlafaxin, milnacipran), NDRI (duální inhibitory zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu) (bupropion), NASSA (noradrenergní a specifická serotoninergní antidepressiva) (mirtazapin) a SARI (duální antagonisté/inhibitory zpětného vychytávání 5-HT) (trazodon) a další. Díky svým specifickým vlastnostem jsou jednotlivá léčiva používána nejen k léčbě deprese samotné, ale také deprese s komorbiditami, jako je algický syndrom, stresová inkontinence apod. Jinými indikacemi některých zástupců mohou být například generalizovaná úzkostná porucha, sociální fobie nebo bipolární afektivní porucha<sup>2,3)</sup>.

## Antipsychotika

Termíny antipsychotika a/nebo neuroleptika zahrnují skupinu léčiv, která mají příznivý vliv na psychické integrace. Jedná se o heterogenní skupinu léčiv, kterou běžně dělíme na antipsychotika **I. generace**, tzv. klasická nebo konvenční, a antipsychotika **II. generace**, tzv. atypická. Mezi antipsychotika I. generace patří například chlorpromazin, levomepromazin, flufenazin, haloperidol, zyklopentixol a další, k atypickým antipsychotikům řadíme například risperidon, paliperidon, klozapin, olanzapin, quetiapin a další<sup>2,3)</sup>.

## Terapeutické monitorování léčiv (TDM)

Psychofarmaka jsou široce používána jak v psychiatrii, tak v mnoha dalších oblastech medicíny. Prevalence psychických onemocnění dle epidemiologických studií stoupá a s tím je spojena i zvyšující se preskripce psychofarmak. Ovšem významný počet pacientů léčených psychofarmaky z nejrůznějších důvodů neodpovídá na léčbu nebo je jejich odpověď neuspokojivá. Kromě patrného úsilí vyvíjet nová psychofarmaka s novými mechanismy účinku je nezbytné především optimalizovat farmakoterapii dostupnými psychofarmaky. K tomuto účelu se jeví jako potenciálně vhodný nástroj terapeutické monitorování léčiv (TDM)<sup>1,4)</sup>.

Obecně vhodná léčiva k TDM jsou ta, kde: a) je známa dobrá korelace mezi koncentrací léčiva v plazmě a účinkem léčiva, b) je dobře definované terapeutické rozmezí, c) léčivo vykazuje saturační kinetiku, d) je úzké terapeutické rozmezí, e) je tvořen aktivní metabolit, f) terapeutický efekt nemůže být popsán na základě klinických měření a g) kde je dostupná validovaná analytická metoda<sup>5)</sup>.

Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že ne všechna psychofarmaka jsou pro TDM vhodná. U mnoha látek zatím nebyla prokázána jasná korelace mezi plazmatickou hladinou a účinkem, nejsou dostatečně stanoveny a potvrzena terapeutická rozmezí a podobně. Přes tyto nedostatky pro využití TDM hovoří například poměrně vysoký interakční potenciál některých psychofarmak, běžná polyfarmakoterapie u pacientů léčených psychofarmaky, častá non-compliance, pomalý nástup účinku nebo vliv genetického polymorfismu biotransformujících enzymů na účinek některých látek. V roce 2003 byly expentní skupinou TDM při AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie)

vypracovány guidelines pro psychiatry, klinické farmakology, analytiku a další odborníky k optimalizaci využití TDM u psychofarmak. Pro širší využití TDM u psychofarmak je ovšem nutné mimo jiné provést další kontrolované klinické studie a také studie efektivity vynaložených nákladů <sup>4)</sup>.

## Metody stanovení

Při léčbě psychofarmaky se používá jak monoterapie, tak polyterapie. Z toho důvodu je nutný vývoj metod umožňujících stanovení několika léčiv současně, popřípadě i stanovení jejich aktivních metabolitů. Ke stanovení léčiv v biologických tekutinách se používají imunochemické, elektromigrační či elektroforetické a chromatografické metody, které svou detekční citlivostí umožňují stanovení léčiv.

## Úprava vzorku

Analýza léčiv v biologických tekutinách je často komplikována přítomností množství různých sloučenin v organické matici, které vedou k interferenci matrice s léčivem, a dále jejich nízkou koncentrací ve vzorku. Imunochemické metody umožňují stanovení léčiv bez předchozí úpravy vzorku. Běžné postupy úpravy vzorku zahrnují precipitaci proteinů, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci kapalina-kapalina (LLE). K precipitaci se používají běžná organická rozpouštědla, jako je acetonitril nebo methanol <sup>6)</sup>.

Klasická extrakce z kapaliny do kapaliny je často používána a velmi důležitá analytická separační metoda, přesto má své nevýhody, jako jsou interference matrice, používání nebezpečných chemikálií a v některých případech i použití velkého objemu vzorku <sup>7,8)</sup>. Základem této extrakce je kvalitativní pravidlo „podobné se rozpouští v podobném“. Nejčastěji se jako extrakční činidlo používá hexan, dichlormethan, diethylether, popřípadě směs jednotlivých rozpouštědel pro zvýšení extrakční účinnosti <sup>9-11)</sup>. SPE má několik výhod oproti tradiční LLE, jsou to vyšší selektivita, čistější extrakt, lepší reprodukovatelnost výsledků. SPE je omezena na relativně čisté biologické materiály, jako je plazma, sérum nebo moč. Je jen málo publikací, které popisují extrakci na tuhé fázi z plné krve <sup>12)</sup>. K separaci léčiv z biologických tekutin lze použít i modifikaci SPE mikroextrakci na tuhé fázi (SPME). In-tube SPME používá otevřené kapilární kolony jako extrakční zařízení. Organické složky ve vodném vzorku jsou přímo extrahovány a zkoncentrovány na stacionární fázi, následně jsou dopraveny na chromatografickou kolonu. In-tube SPME je vhodná technika přípravy vzorků, protože je rychlá, levná a lze ji snadno automatizovat. Obvykle je ve spojení s LC/MS <sup>13)</sup>. SPME má vysoký prekoncentrační faktor u hydrofobních látek, a proto není široce použitelná v analýze léčiv. Prekoncentrační faktor je definován jako poměr mezi konečnou koncentrací analytu v extrahovaném vzorku a počáteční koncentrací ve vzorku <sup>14)</sup>. Martínez <sup>12)</sup> porovnával dvě SPE kolony (Chem Elut a Bond Elut Certify), které použil k extrakci šesti antidepresiv. Koncentrace léčiv byly následně změřeny pomocí plynové chromatografie s NP

detektorem. Lepší výsledky byly dosaženy použitím SPE Bond Elut Certify <sup>12)</sup>.

Jako alternativa plazmy pro TDM různých léčiv byly také testovány sliny. Sliny mají několik výhod: bezbolestný a neinvazivní odběr, ke kterému není nutný kvalifikovaný personál. Sliny jako možný biologický materiál pro TDM mají i své nevýhody. Obvykle je možné odebrat jen malý objem a některé faktory: jako pH, ústní kontaminace, stimulovaný nebo nestimulovaný odběr, mohou ovlivnit difuzi léku z plazmy do slin. Z těchto důvodů by měla být před začátkem používání slin pro TDM zjištěna korelace mezi koncentrací léku v plazmě a ve slinách, protože ve slinách je přítomna jen volná, farmakologicky účinná frakce léčiva. De Castro <sup>15)</sup> popisuje LC-MS/MS metodu pro stanovení devíti antidepresiv a některých jejich hlavních metabolitů ve slinách a v plazmě. Popisuje také studii korelace koncentrace venlafaxinu v obou matricích. Výsledky této studie neukázaly dobrou korelaci koncentrací venlafaxinu ve slinách a volné frakce v plazmě. Jako možný důvod zmiňuje malý počet vzorků a jejich nedostatečnou homogenitu <sup>15)</sup>.

Také stanovení léčiv v mateřském mléce je důležité. Přítomnost léčiva v mléce může být potencialem zdrojem nežádoucích účinků u kojeného dítěte. Kasper <sup>16)</sup> publikoval stanovení olanzapinu v mateřském mléce metodou HPLC s elektrochemickým detektorem <sup>16)</sup>.

Stanovení léčiv v moči je méně důležité než v krvi, protože koncentrace je značně závislá na hydrataci organismu a na pH moče a využívá se především v toxikologii <sup>17)</sup>.

## Imunochemické metody

Imunochemické metody oproti chromatografickým metodám neumožňují stanovení léku a jeho metabolitu <sup>18)</sup>. Další nevýhodou jsou zkřížené reakce „cross-reactivity“, kdy protilátky reagují odlišně s různými léky a jejich metabolity, což znemožňuje přesnou kvantifikaci. Riziko interference stoupá se strukturální podobností <sup>19)</sup>. Chattergoon <sup>20)</sup> popisuje falešně pozitivní nález tricyklických antidepresiv (TCA) u dvou pacientů, kteří nikdy neužívali TCA a přesto byly u nich naměřeny hladiny 80 ng/ml a 130 ng/ml při použití fluorescenčně polarizační imunoanalýzy (FPIA) <sup>20)</sup>. Dasgupta <sup>21)</sup> potvrdil statisticky významně vyšší zkřížené reakce karbamazepinu a jeho metabolitu 10,11-epoxid karbamazepinu u 35 pacientů <sup>21)</sup>.

Imunochemické metody lze rozdělit na izotopové a neizotopové. Izotopové imunochemické metody jsou vývojově starší.

Izotopové imunochemické metody (Radio Immuno Assay – RIA, Immuno Radio Metric Assay – IRMA, Radio Enzymo Assay – REA, Radio Receptor Assay – RRA). RIA metody jsou vysoce citlivé. Ke značení antigenů se většinou používá radioaktivní izotop jodu <sup>125</sup>I, ke značení haptenů tritium <sup>3</sup>H <sup>22)</sup>.

V roce 1979 Brunswick <sup>23)</sup> popsal specifickou radioimunoanalýzu na stanovení amitriptylinu a nortriptylinu. Jako radioaktivní značení bylo použito <sup>3</sup>H <sup>23)</sup>. Tyto metody byly postupně nahrazeny metodami s jinak značenými

mi reaktanty, např. enzymy nebo fluoroforem <sup>24</sup>).

Mezi neizotopové imunochemické metody patří:

1. Enzymové na fotometrických principech (Enzymo Immuno Assay – EIA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA, Immuno Enzymo Metric Assay – IEMA).

2. Fluorescenční (Fluorescence Immuno Assay – FIA, Fluorescence Polarization Immuno Assay – FPIA, Time Resolved Fluorescence Immuno Assay – TR-FIA).

3. Luminiscenční, popř. elektrochemiluminiscenční (Lumino Immuno Assay – LIA, Immuno Lumino Metric Assay – ILMA, ElectroChemiLuminiscence – ECL) <sup>22</sup>.

Neizotopové imunochemické metody většinou využívají vybavení běžných analytických, popřípadě biochemických laboratoří. Dorey <sup>18</sup>) publikoval článek, ve kterém porovnávali výsledky stanovení tricyklických antidepresiv (TCA) kapalinovou chromatografií a enzymoimunoanalýzou (EMIT) <sup>18</sup>).

Všeobecně lze říci, že imunochemické metody je vhodnější používat jako screening předávkování než pro terapeutické monitorování léku, jelikož mají relativní vysoký limit detekce <sup>18, 19, 22</sup>).

### Elektromigrační separační metody

V analýze psychofarmak se uplatňují i elektromigrační separační metody. Jejich předností je vysoká separační účinnost, nízká spotřeba vzorku i chemikálií. Jsou založeny na pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli a lze je použít pro separaci nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek. Mezi elektromigrační separační metody patří kapilární elektroforéza (CE) a její ostatní módy, tj. kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC), kapilární elektrochromatografie (CEC), izotachoforéza (ITP), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární gelová elektroforéza (CGE) <sup>25</sup>). CZE v organických rozpouštědlech se označuje jako nevodná CZE (NACE). Umožňuje separaci hydrofobních látek, které jsou těžko dělitelné ve vodném prostředí. Vysoké rozlišení, krátký čas analýzy a možnost zvýšení rozpustnosti analytu jsou hlavními důvody pro použití organických rozpouštědel <sup>26, 27</sup>).

DelleAquila <sup>24</sup>) publikoval separaci tricyklických antidepresiv (TCAs) kapilární zónovou elektroforézou. N,N,N<sub>e</sub>,N<sub>e</sub>-tetramethyl-1,3-butanediamine byl použit jako účinný elektrolyt. TCAs mají podobnou strukturu, molekulovou hmotnost a pK<sub>a</sub> hodnoty. Jejich separace kapilární zónovou elektroforézou vyžaduje přesné pH a vhodné složení elektrolytu <sup>24</sup>).

Flores <sup>26</sup>) ve své práci popisuje snadnou, rychlou, senzitivní a robustní metodu nevodné kapilární elektroforézy s DAD detekcí pro stanovení paroxetinu a jeho tří metabolitů v moči. Moč byla extrahována pomocí C<sub>18</sub> <sup>26</sup>).

Schafroth <sup>28</sup>) publikoval metodu na stanovení benzodiazepinů flunitrazepamu, diazepamu, midazolamu, klonazepamu, bromazepamu, temazepamu, oxazepamu, alorazepamu v moči pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie s UV detekcí. Vzorek byl připraven enzymatickou hydrolyzou a SPE <sup>28</sup>).

Extrakci pomocí SPE publikoval také Tomita <sup>29</sup>) na sta-

novení nitrazepam a jeho metabolitů v moči micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií s UV detekcí <sup>29</sup>). Obě metody byly použity pro soudní a toxikologické analýzy.

### Chromatografické metody

Z chromatografických metod se v posledních letech nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Základním principem všech chromatografických metod je rozdělení složek směsi látek mezi stacionární a mobilní fázi. Obecné požadavky na detektory v HPLC jsou shodné s GC. K detekci se využívá analytická vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu <sup>9</sup>).

### Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) se používá pro stanovení antidepresiv, protože mnohé mají strukturu aminů. GC je jednoduchá, vysoce rozlišující, citlivá, reprodukovatelná a levná metoda. Aminy mají tendenci adsorbovat se na kyselou kolonu, kde také často dochází k jejich rozložení. Eluční píky aminů snadno chvostují a mají nízkou detekční citlivost. K odstranění všech těchto problémů se využívá derivatizace, čímž dojde ke snížení polarit aminoskupiny. Zlepšit selektivitu a citlivost je možné i použitím kapilární kolony <sup>30, 31</sup>). GC se používají ve spojení s plamenově-ionizačním NP detektory a hmotnostními (MS) detektory <sup>32</sup>). Počátek GC-MS je v roce 1970, kdy byl vyvinut pro biomedicínský výzkum i pro rutinní použití <sup>33</sup>).

Torre <sup>31</sup>) publikoval kvantitativní stanovení šesti tricyklických antidepresiv pomocí kapilární GC s NP detektorem. Jako vnitřní standard byl použit promazin a SPE k přípravě vzorků. Separace proběhla na 5% fenylmethylsilikonové kapilární koloně <sup>31</sup>).

Fernandes <sup>30</sup>) publikoval metodu stanovení fluoxetinu v plazmě pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. K přípravě vzorku byla použita modifikace mikroextrakce na tuhé fázi SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) a desipramin jako vnitřní standard. Analýza probíhala při teplotním gradientu od 80 do 280 °C na HP5MS koloně. Jako nosný plyn bylo použito helium. MS detektor pracoval v EI modu a v SIM modu <sup>30</sup>).

Langner <sup>34</sup>) publikoval metodu GC/MS na stanovení oxazepamu v moči. Mnohé benzodiazepiny jsou metabolizovány na oxazepam a jsou eliminovány hlavně ledvinami. K hydrolyze glukuronidů oxazepamu v moči byla použita β-glukoronidaza. Extrakce byla provedena pomocí SPE za použití d<sub>5</sub>-oxazepam jako vnitřního standardu <sup>34</sup>).

Eap <sup>35</sup>) publikoval GC/MS metodu na stanovení citalopramu, paroxetinu, sertralinu a jejich metabolitů v plazmě po derivatizaci. Jako vnitřní standard byl použit methylmaprotilin a separace proběhla na silikonové kapilární koloně (fused-silica Optima 5) <sup>35</sup>).

### Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tab. 1. Příklady stanovení psychofarmak kapalinovou chromatografií s elektrochemickou, fluorescenční a UV detekcí

Látka	Biologický materiál	Příprava vzorku	Vnitřní standard	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Detekce	Odkaz
amitriptylin, nortriptylin, imipramin, despramin, klomipramin, norklomipramin	plazma, sérum	LLE	ekonazol	fosfátový pufr: acetonitril: diethylamin	Nova-Pack C18	UV	10
paroxetin, risperidon, 9-hydroxyrisperidon	plazma	SPE	remoxiprid	methan: acetonitril: dihydrogenfosforečnan draselný	Sherisorb cyano guard, Ultrasphere cyano analytical	kulochemická	11
mirtazapin, citalopram, paroxetin, duloxetin, fluoxetin, sertralin	plazma	in tube - SPME	klomipramin	fosfátový pufr: acetonitril	LiChrosphere 60 RP select B	UV	13
olanzapin	mateřské mléko	SPE	thienobenzodiazepin	fosfátový pufr : acetonitril: methanol	YMC	elektrochemická	16
alprazolol, klonazepam, nitrazepam	plazma, sérum	SPE C18	flunitrazepam	acetonitril: methanol: dihydrogenfosforečnan draselný	Nova-Pac C18	DAD	38
imipramin, amitriptylin, klomipramin, fluoxetin, sertralin, paroxetin, citalopram, mirtazapin, moklobemid, duloxetin	plazma	LLE	etidokain	35 % směs acetonitril: methanol: 65 % octan sodný	LiChrosphere 60 RP select B	UV	39
citalopram, fluoxetin, paroxetin a jejich metabolity	krev, plazma	SPE	protriptylin	70 % mravenčan amonný: acetonitril	Symmetry C18	fluorescenční a UV	41
venlafaxin, O-desmethylvenlafaxin	plazma	SPE	citalopram	fosfátový pufr: acetonitril	Zorbax RP C8	fluorescenční	42
fluoxetin, norfluoxetin	plazma	LLE	maprotilin	fosforečnan draselný: acetonitril	Supelcosil LC-18	fluorescenční	43
fluoxetin, norfluoxetin	plazma	SPE	citalopram	acetonitril: tetrametylamonium kyseliny perchlorové	Microsorb MV C18 RP	DAD	45
risperidon, 9-hydroxyrisperidon	plazma	LLE	metylrisperidon	fosfátový pufr: acetonitril	Novapack C18	UV	46
fluoxetin, norfluoxetin	plazma	LLE	fluvoxamin	acetonitril: kyselina dusičná	Phenomenex C18	fluorescenční	47
sertralin, n-desmethylsertralin	plazma	SPE	klomipramin hydrochlorid	acetonitril: fosfátový pufr	Genesis C18 RP	UV	48

SPE – extrakce na tuhé fázi, LLE – extrakce kapalina-kapalina

HPLC je rychlá, účinná a spolehlivá metoda. Má širokou oblast použití, lze jí analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Asi 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat HPLC metodou. Mezi běžné detektory používané v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické a hmotnostní. Spektrofotometrické jsou vhodné pro svou jednoduchost a provozní spolehlivost<sup>14, 36-40</sup>. Fluorimetrické detektory jsou selektivní pro látky, které mají přirozenou fluorescenci nebo je lze na fluoreskující deriváty převést. Jsou citlivější než spektrofotometrické detektory s detekčním limitem v pg/ml. Detektory s fluorescencí indukovanou laserem (LIFD) se vzhledem k malému objemu měrné cely uplatňují v kapilární HPLC a kapilární elektroforóze<sup>9, 41-43</sup>.

Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami, jako jsou LC a GC, výrazně zvyšuje selektivitu. Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda k určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. To umožňuje identifikovat a kvantifikovat analyt ve vzorku se složitou maticí (krev, plazma, sérum, moč), popřípadě i stanovit a kvantifikovat jeho metabolity. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které

ionty vytvoří nebo je emituje do plynného stavu a z plynné směsi molekul, jejich nabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmotností  $m/z$ . Pro analýzu léčiv se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do  $m/z < 1000$ . Mezi hmotnostní analyzátory používané při analýze léčiv patří trojitý kvadropólový analyzátor, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF), popřípadě jejich kombinace<sup>17</sup>.

HPCL-MS/MS se začala používat v bioanalytickém výzkumu již v roce 1980. V devadesátých letech 20. století našla své využití i v klinických laboratořích, kde se používala pro novorozenecký screening. HPLC-MS/MS se vyznačuje vysokou přesností a možností širokého uplatnění. Toto spojení umožňuje vývoj metod s krátkým retenčním časem. Příprava vzorku je obvykle jednoduchá a nezahrnuje derivatizaci. Z těchto důvodů má široké využití v terapeutickém monitorování léků, endokrinologii a toxikologii<sup>33</sup>.

K vývoji metody je velmi důležitý výběr vhodného vnitřního standardu. Vnitřní standard musí být strukturně podobný stanovované látce a lze ho použít i pro více látek současně stanovovaných v jedné analýze. Mobilní

Tab. 2. Příkladky stanovení psychofarmak LC-MS(/MS)

Látka	Biologický materiál	Příprava vzorku	Vnitřní standard	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Způsob ionizace	Odkaz
amitriptylin, imipramin, klomipramin, fluoxetin, paroxetin, sertralin, fluvoxamin, citalopram, venlafaxin, nortriptylin, desipramin, norklomi- pramin, norfluoxetin	sliny, plazma	SPE	nortriptylin-d <sub>3</sub> , imipramin-d <sub>3</sub> , klomipramin-d <sub>3</sub> , paroxetin-d <sub>3</sub> , norfluoxetin-d <sub>3</sub> , fluoxetin-d <sub>3</sub>	gradient acetonitril: mravenčan amonný	Sunfire C18 IS	ESI	15
fluoxetin, citalopram, paroxetin, venlafaxin	plasma	SPE	fluvoxamin	voda (kyselina mravenčí, octan amonný): acetonitril mravenčan amonný- kyselina mravenčí: acetonitril	Macherey-Nagel C18	ESI	49
citalopram	plazma	LLE	imipramin	kyselina mravenčí: acetonitril	Hypersil BDS C8	ESI	50
venlafaxin, O-desmethyl venlafaxin	plazma	HLB extrakční cartridge	escitalopram	acetonitril: octan amonný	Betasil C18	ESI	51
ziprasidon	plazma	LLE	N-methyl ziprasidon	2 mmol/l octan amonný v acetonitrilu: voda	Symmetry C8	ESI	52
klozapin, desmethylkloza- pin, klozapin- N-oxid	plazma	on-line SPE	mirtazapin	octan amonný: metanol	Zorbax Eclipse XDB C18, Zorbax Eclipse XDB C8	ESI	53
levosulpirid	plazma	LLE	tiaprid hydrochlorid	acetonitril: mravenčan amonný	Atlantis HILIC silica	ESI	54
aripiprazol	plazma	LLE	OPC-14857	0,1% kyselina octová ve vodě: acetonitril	RP Chemcobond ODS-W	ESI	55
escitalopram	plazma	LLE	paroxetin	octan amonný: acetonitril	ODS YMC™ AQ	ESI	56
amisulprid	plazma	LLE	sulprid	mravenčan amonný: acetonitril	Phenomenex Synergi Polar-RP	ESI	57
fluoxetin, norfluoxetin	plazma	LLE	flumazenil	mravenčan amonný: acetonitril	Lichrospher 100 RP-8E	ESI	58
mianserin, N- desmethylmianserin	plazma	LLE	imipramin	mravenčan amonný: acetonitril: methanol	Kromasil RP-18	ESI	59
mitrazepin, demethylmertazepin	plazma	LLE	imipramin	kyselina mravenčí ve vodě: acetonitril	XTerra MS C8	ESI	60
sertralin	plazma	LLE	diphenhydramin	kyselina mravenčí v methanolu: acetonitril	Zorbaxeclipse XDB C18	APCI	61
sertralin	plazma	SPE	imipramin	mravenčan amonný: acetonitril	Beta Basic C-8	ESI	62
haloperidol	plazma	SPE	haloperidol-D4	kyselina mravenčí ve vodě: metanol	Symmetry C18	ESI	63
olanzapin	plazma	SPE	LY17 222	octan amonný ve vodě: propan-1-ol v metanolu	MetaChem Monochrom	APCI	64
olanzapin	kev	LLE	LY170158	octan amonný ve vodě: propan-1-ol v metanolu	MetaChem Monochrom	APCI	65
olanzapin	sérum	SPE	LY17 222	mravenčan amonný: acetonitril	Superspher RP 18	APCI	66
risperidon, 9-OH risperidon	plazma	LLE	methylrisperidon	octan amonný: methanol: acetonitril	Phenyl-hexyl	ESI	67
risperidon, 9-OH risperidon	plazma	precipitace proteinů acetonitrem	methylrisperidon	octan amonný: acetonitril	Betasil C18	ESI	68
risperidon, 9-OH risperidon	plazma	SPE	R068809	mravenčan amonný: acetonitril	BDS-Hypersil	ESI	60
klozapin, olanzapin, risperidon, quetiapin	plazma	LLE	diazepam	octan amonný: acetonitril	Macherey-Nagel C18	ESI	70
paroxetin	plazma	LLE	fluoxetin	acetonitril: voda	Polaris C18	ESI	71
fluoxetin, norfluoxetin	plazma	LLE	doxepin	acetonitril: kyselina mravenčí	Phenomenex Luna C18	API	72

SPE – extrakce na tuhé fázi, LLE – extrakce kapalina-kapalina, ESI – elektrosprej, APCI – chemická ionizace za atmosferického tlaku, API –fotoionizace za atmosferického tlaku

fáze je ve většině případů složena ze směsi methanol, acetonitril a voda s přidavkem slabé kyseliny (kyselina mravenčí nebo octová) nebo kyselého pufu (mravenčan amonný nebo octan amonný). Slabé kyseliny se přidávají do mobilní fáze v koncentraci 0,005–0,05 %<sup>33</sup>.

Kirchherr<sup>44</sup> popsal metodu kvantitativního stanovení 48 psychofarmak (amisulprid, amitriptylin, aripiprazol, benperidol, chlorpromazin, chlorprothixen, citalopram, klomipramin, klozapin, desipramin, doxepin, fluoxetin, flupentixol, fluphenazin, fluvoxamin, haloperidol, hyd-

roxyrisperidon, imipramin, levomepromazin, maprotilin, mianserin, mitrazapin, moklobemid, norklomipramin, nordoxepin, norfluoxetin, nortriptylin, O-desmethylenlafaxin, olanzapin, opipramol, paroxetin, perazin, perphenazin, pimozid, pipamperon, quetiapin, reboxetin, risperidon, sertralin, sulpirid, thioridazin, trazodon, trimipramin, venlafaxin, viloxazin, ziprasidon, zotepin, zyklopentixol). Jako vnitřní standard byl použit klonidin, dehydromethylrisperidon a methabenzthiazuron. Pomocí směsi acetonitrilu a methanolu byla provedena precipitace proteinů ve vzorku, po centrifugaci byl supernatant naředěn 100 µl mobilní fáze. Chromatografická separace proběhla na monolitické koloně (Chromolith Speed ROD C<sub>18</sub>). Mobilní fázi tvořila směs methanol a 5 mM octanový pufr. Průtok byl 1,0 ml/min. K detekci byl použit API 4000 tandemový hmotnostní spektrometr<sup>44)</sup>.

Příklady stanovení psychofarmak kapalinovou chromatografií s elektrochemickou, fluorescenční a UV detekcí jsou uvedeny v tabulce 1. Tabulka 2 obsahuje příklady stanovení psychofarmak kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí.

---

## ZÁVĚR

---

Afektivní poruchy, především deprese představují zřejmě největší zdravotní zátěž moderní společnosti, která postihuje z celoživotního pohledu více než jednu pětinu obyvatelstva. Psychofarmaka jsou široce používána jak v psychiatrii, tak v mnoha dalších oblastech medicíny. Jelikož významný počet pacientů léčených psychofarmaky z nejrůznějších důvodů neodpovídá na léčbu, nebo je jejich odpověď neuspokojivá, jeví se jako potenciálně vhodný nástroj terapeutické monitorování těchto léčiv, především tam, kde je prokázána korelace mezi plazmatickou hladinou a účinkem a kde jsou stanovena a potvrzena terapeutická rozmezí.

Tento přehled shrnuje metody, včetně jednotlivých příkladů, které lze použít k TDM psychofarmak.

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií má v rutinním terapeutickém monitorování léčiv zvyšující význam, protože zřejmě všechna léčiva lze takto stanovit. Velkou výhodou tohoto spojení je přesnost, široká oblast použití, výrazné zkrácení délky analýzy, možnost stanovit různé kombinace léčivých látek současně s jejich aktivními metabolity. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a vysoké nároky na obsluhu.

---

## LITERATURA

---

1. **Vanek, D., Raboch, J., Vanek, J.:** The prevalence of depression in the Czech Republic. *Eur. Psychiat.*, 2000; 15, 397S–98S.
2. **Suchopár, J. et al.:** *Remedia Compendium*. 4. vyd. Praha: Panax, 2009; 242–262.

3. **Bouček, J., Pidrman, V.:** *Psychofarmaka v medicíně*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005; 16–40, 49–63, 114–162.
4. **Evans, W. E., Oellerich, M., Holt, D. W.:** Therapeutic drug monitoring clinical guide. second edition. Cincinnati: Harvey Whitney Books Company, 1993; 2–10.
5. **Baumann, P., Hiemke, C., Ulrich, S., Eckermann, G., Gaertner, I., Gerlach, M., Kuss, H. J., Laux, G., Muller-Oerlinghausen, B., Rao, M. L., Riederer, P., Zernig, G.:** The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Pharmacopsychiat.*, 2004; 37, 243–265.
6. **Shihabi, Z. K.:** Sample matrix effects in capillary electrophoresis: II Acetonitrile deproteinization. *J. Chromatogr. A*, 1993; ROČNÍK, 652–471.
7. **Martinavarró-Domínguez, A., Capella-Peiró, M. E., Gil-Agustí, M., Marcos-Tomás, J. V., Esteve-Romero, J.:** Therapeutic drug monitoring of antikonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples. *Clin. Chem.*, 2002; 48, 1696–1702.
8. **Jasińska, A., Starczewska, B.:** The use of the new SPE methods for isolation of some tricyclic antidepressant drugs from human serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003; 31, 795–799.
9. **Štulík, K., Bosáková, Z., Coufal, P., Jelínek, I., Pacáková, V., Ševčík, J.:** Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 136–166, 210–220.
10. **Theurillat, R., Thormann, W.:** Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998; 18, 751–760.
11. **Schatz, D. S., Saria, A.:** Simultaneous determination of paroxetine, risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *Pharm.*, 2000; 60, 51–56.
12. **Martínez, M. A., Torre, C. S., Almarza, E.:** A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Anal. Toxicol.*, 2004; 28, 174–180.
13. **Silva, B. J. C., Lancas, F. M., Queiroz, M. E. C.:** In tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in tube-SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2008; 862, 181–188.
14. **Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., Krogh, M., Uglund, H. G., Gronhaug, T.:** Development of simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2000; 873, 3–11.
15. **Castro, A., Concheiro, M., Quintela, O., Cruz, A., López-Rivadulla, M.:** LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008; 48, 183–193.
16. **Kasper, S. C., Mattiuz, E. L., Swanson, S. P., Chiu, J. A., Johnson, J. T., Garner, C. O.:** Determination of olanzapine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 726, 203–209.
17. **Maurer, H. H.:** Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem*, 2007; 388, 1315–1325.



18. **Dorey, R. C., Preskorn, S. H., Widener, P. K.:** Results compared for tricyclic antidepressants as assayed by liquid chromatography and enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 1988; 34, 2348–2351.
19. **Saint-Marcoux, F., Sauvage, F. L., Marquet, P.:** Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007; 388, 1327–1349.
20. **Chattergoon, D. S., Verjee, Z., Anderson, M., Johnson, D., McGuigan, M. A., Koren, G., Ito, S.:** Carbamazepine interference with an immune assay for tricyclic antidepressants in plasma. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 1998; 36, 109–113.
21. **Dasgupta, A., Mc Neese, C., Wells, A.:** Interference of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in fluorescence polarization immunoassay for tricyclic antidepressants. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004; 121, 418–425.
22. **Chromý, V., Fischer, J.:** Analytické metody v klinické chemii. 1. vyd. Brno, Masarykova univerzita, 2000, s 96–97.
23. **Brunswick, D. J., Needelman, B., Mendels, J.:** Specific radioimmunoassay of amitriptyline and nortriptyline. *J. Clin. Pharmacol.*, 1979; 7, 343–348.
24. **Dell'Aquila, C.:** Separation of tricyclic antidepressants by capillary zone electrophoresis with N,N,N<sub>e</sub>,N<sub>e</sub>-tetramethyl-1,3-butanediamine (TMBD) as an effective electrolyte additive. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002; 30, 341–350.
25. **Pavliková, L., Brozmanová, H., Kvasnička, F., Grundmann, M.:** Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. *Klin. Farmakol. Farm.*, 2007; 27, 45–49.
26. **Flores, J. R., Nevado, J. J. B., Salcedo, A. M. C., Díaz, M. P. C.:** Development and validation method for determination of paroxetine and its metabolites by non-aqueous capillary electrophoresis in human urine. *Experimental design for evaluating the ruggedness of the method. Electrophoresis*, 2004; 25, 454–462.
27. **Tomita, M., Okuyama, T.:** Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1996; 678, 331–337.
28. **Schafroth, M., Thormann, W., Allemann D.:** Micellar electrokinetic capillary chromatography of benzodiazepines human urine. *Electrophoresis*, 1994; 15, 72–78.
29. **Tomita, M., Okuyama, T., Sato, S., Ishizu, H.:** Simultaneous determination of nitrazepam and its metabolites in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.*, 1993; 621, 249–255.
30. **Fernandes, Ch., Hoeck, E., Sandra, P., Lancas, F. M.:** Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. *Anal. Chim. Acta*, 2008; 614, 201–207.
31. **Torre, R., Ortuno, J., Pascual, J. A., González, S., Ballesta, J.:** Quantitative determination of tricyclic antidepressants and their metabolites in plasma by solid-phase extraction (Bond-Elut TCA) and separation by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection. *Ther. Drug Monit.*, 1998; 20, 340–346.
32. **Linder, M. W., Keck, P. E.:** Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clin. Chem.*, 1998; 44, 1074–1084.
33. **Vogeser, M., Seger, Ch.:** A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – Goals for further developments. *Clin. Biochem.*, 2008; 41, 649–662.
34. **Langner, J., Gan, B. K., Liu, R. H., Baugh, L. D., Chand, P., Weng, J. L., Edwards, C., Walia, A. S.:** Enzymatic digestion, solid-phase extraction, and gas chromatography/mass spectrometry of derivatized intact oxazepam in urine. *Clin. Chem.*, 1991; 37, 1595–1601.
35. **Eap, C. B., Bouchoux, G., Amey, M., Cochard, N., Savary, L., Baumann, P.:** Simultaneous determination of human plasma levels of citalopram, paroxetine, sertraline, and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, 1998; 36, 365–371.
36. **Mercolini, L., Bugamelli, F., Kenndler, E., Boncompagni, G., Franchini, L., Raggi, M. A.:** 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. *J. Chromatogr. B*, 2007; 846, 273–280.
37. **Llorca, P. M., Coudore, F., Corpelet, Ch., Buyens, A., Hoareau, M., Eschalier, A.:** Integration of olanzapine determination in HPLC-diode array detection system for routine psychotropic drug monitoring. *Clin. Chem.*, 2001; 47, 1719–1721.
38. **Akerman, K., Jolkkonen, J., Parviainen, M., Penttilä, I.:** Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid phase extraction. *Clin. Chem.*, 1996; 42, 1412–1416.
39. **Malfará, W. R., Bertucci, C., Queiroz M. E. C., Carvalho, S. A. D., Bianchi, M. L. P., Cesarino, E. J., Crippa, J. A., Queiroz, R. H. C.:** Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007; 44, 955–962.
40. **Carrillo, J. A., Ramos, S. I., Agundez, J. A. G., Martínez, C., Benitez, J.:** Analysis of midazolam and metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography: Probe of CYP3A. *Ther. Drug Monit.*, 1998; 20, 319–324.
41. **Kristoffersen, L., Bugge, A., Lundanes, E., Slordal, L.:** Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 1999; 734, 229–246.
42. **Mandrioli, R., Mercolini, L., Cesta, R., Fanali, S., Amore, M., Raggi, M. A.:** Analysis of the second generation antidepressant venlafaxine and its main active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr. B*, 2007; 856, 88–94.
43. **Suckow, R. F., Zhang M. F., Cooper, T. B.:** Sensitive and selective liquid-chromatographic assay for fluoxetine and norfluoxetine in plasma with fluorescence detection after precolumn derivatization. *Clin. Chem.*, 1992; 38/9, 1756–1761.
44. **Kirchherr, H., Kühn-Velten, W. N.:** Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *J. Chromatogr. B*, 2006; 843, 100–113.
45. **Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Saracino, M. A., Fanali, S., Raggi, M. A.:** A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004; 36, 351–356.
46. **Titier, K., Déridet, E., Cardone, E., Abouelfath, A., Moore, N.:** Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose. *J. Chromatogr. B*, 2002; 772, 373–378.
47. **Ertürk, S., Cetin, S. M., Atmaca, S., Ersoy, L., Bakır, G.:** A Sensitive HPLC method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma with fluorescence detection. *Ther. Drug Monit.*, 2005; 27, 38–43.
48. **Mandrioli, R., Saracino, M. A., Ferrari, S., Berardi, D., Kenndler, E., Raggi, M. A.:** HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its

- main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2006; 836, 116–119.
49. **Juan, H., Zhiling, Z., Huande, L.:** Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2005; 820, 33–39.
  50. **Pistos, C., Panderi, I., Atta-Poltou, J.:** Liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry method for the quantification of citalopram in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2004; 810, 235–244.
  51. **Bhatt, J., Jangid, A., Venkatesh, G., Subbaiah, G., Singh, S.:** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethyl venlafaxine in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2005; 829, 75–81.
  52. **Al-Dirbashi, O. Y., Aboul-Enein, H. Y., Al-Odaib, A., Jacob, M., Rashed, M. S.:** Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of ziprasidone in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 2006; 20, 365–368.
  53. **Niederländer, H. A., Koster, E. H., Hilhorst, M. J., Metting, H. J., Eilders, M., Ooms, B., de Jong, G. J.:** High throughput therapeutic drug monitoring of clozapine and metabolites in serum by on-line coupling of solid phase extraction with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2006; 834, 98–107.
  54. **Peak, I. B., Moon, Y., Ji, H. Y., Hui-Hyun, K., Hye, W. L., Yong-Bok, L., Hye, S. L.:** Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of levosulpirid in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2004; 809, 345–350.
  55. **Kubo, M., Mizooku, Y., Hirao, Y., Osumi, T.:** Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantitative determination of aripiprazole and its main metabolite, OPC-14857, in human plasma. *J. Chromatogr. B*, 2005; 822, 294–299.
  56. **Singh, S. S., Shah, H., Gupta, S., Jain, M., Sharma, K., Thakkar, P., Shah, R.:** Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry method for the determination of escitalopram in human plasma and its application in bioequivalence study. *J. Chromatogr. B*, 2004; 811, 209–215.
  57. **Gschwend, M. H., Arnold, P., Ring, J., Martin, W.:** Selective and sensitive determination of amisulpride in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with positive electrospray ionisation and multiple reaction monitoring. *J. Chromatogr. B*, 2006; 831, 132–139.
  58. **Djordjevic, S., Kovacevic, I., Miljković, B., Vukсанovic, J., Pokrajac, M.:** Liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma: application to clinical study. *Il. Farmaco*, 2005; 60, 345–349.
  59. **Chauhan, B., Rani, S., Guttikar, S., Zope, A., Jadon, N., Padh, H.:** Analytical method development and validation of mianserin hydrochloride and its metabolite in human plasma by LC-MS. *J. Chromatogr. B*, 2005; 823, 69–74.
  60. **Pistos, C., Koutsopoulou, M., Panderi I.:** A validated liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of mirtazapine and demethylmirtazapine in human plasma: application to a pharmacokinetic study. *Anal. Chim. Acta*, 2004; 514, 15–26.
  61. **Chen, X., Duan, X., Dai, X., Zhong, D.:** Development and validation of liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of sertraline in human plasma. *Rapid Commun. in Mass Spectrom.*, 2006; 20, 2483–2489.
  62. **Jain, D. S., Sanyal, M., Subbaiah, G., Pande, U. C., Shrivastav, P.:** Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B*, 2005; 829, 69–74.
  63. **Hempenius, J., Steenvoorden, R. J. J. M., Lagerwerf, F. M., Wieling, J. J., Jonkman, H. G.:** „High throughput“ solid-phase extraction technology and turbo ionspray LC-MS-MS applied to the determination of haloperidol in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999; 20, 889–898.
  64. **Berna, M., Shugert, R., Mullen, J.:** Determination of olanzapine in human plasma and serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 1998; 33, 1003–1008.
  65. **Berna, M., Ackermann, B., Ruterbories, K., Glass, S.:** Determination of olanzapin in human blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2002; 767, 163–168.
  66. **Bogusz, M. J., Krüger, K. D., Maier, R. D., Erkwow, R., Tuchtenhagen, F.:** Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1999; 732, 257–369.
  67. **Aravagiri, M., Marder, S., R.:** Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2000; 35, 718–724.
  68. **Bhatt, J., Subbaiah, G., Singh, S.:** Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006; 20, 2019–2114.
  69. **Remmerie, B. M. M., Sips, L. L. A., Vries, R., Jong, J., Schothuis, A. M., Hooijschuur, E. W. J., Merbel, N. C.:** Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2003; 783, 461–472.
  70. **Zhou, Z., Li, X., Li, K., Xie, Z., Cheng, Z., Peng, W., Wang, F., Zhu, R., Li, H.:** Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2004; 802, 257–262.
  71. **Massaroti, P., Cassioano, N. M., Duarte, L. F., Campos, D. R., Marchioretto, M. A. M., Bernasconi, G., Calafatti, S., Barros, F. A. P., Meurer, E. C., Pedrazzoli, J.:** Validation of a selective method for determination of paroxetine in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005; 8, 340–347.
  72. **Sutherland, F. C. W., Badenhorst, D., de Jager, A. D., Scanes, T., Hundt, H. K. L., Swart, K. J., Hundt, A. F.:** Sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of fluoxetine and its primary active metabolite norfluoxetine in human plasma. *J. Chromatogr. A*, 2001; 914, 45–51.

**9.2 Klapková E., Uřinová R., Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, Klin. Biochem. Metab. 2011; 1, 5–8.**

Práce se zabývá zhodnocením vlivů jednotlivých analytických kroků na matricové efekty při vývoji metody na stanovení léků metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Matricové efekty lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. Mechanismů, které je způsobují, je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny. Testování matricového efektu je nutnou součástí při vývoji metody. V článku je diskutován vliv způsobu ionizace, úpravy vzorku, složení mobilní fáze, výběr vnitřního standardu a biologické matrice.

# Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Klapková E.<sup>1</sup>, Uřinová R.<sup>2</sup>, Průša R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a patobiochemie, UK 2. LF a FN Motol

<sup>2</sup>Ústav klinické farmakologie, FN Ostrava

## SOUHRN

Práce se zabývá zhodnocením vzájemných vlivů jednotlivých analytických kroků na matricové efekty při vývoji metody stanovení léků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (HPLC-MS). Matricové efekty ovlivňují jak kvalitu, tak i kvantitu analýzy a jsou jedny z mnoha příčin chyb v LC-MS. Mechanismů, které je způsobují, je mnoho a ne všechny lze zcela objasnit. Autoři v článku diskutují o vlivu typu ionizace (elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku), způsobu úpravy vzorku, vlivu složení mobilní fáze a jejích aditiv, zvolení vhodného vnitřního standardu a typu biologického vzorku při vývoji nové metody. Testování matricových efektů u HPLC-MS je nezbytné pro úspěšnou validaci metody.

*Klíčová slova:* matricové efekty, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace.

## SUMMARY

**Klapková E., Uřinová R., Průša R.: The influence of matrix effects on high performance liquid chromatography-mass spectrometry methods development and validation**

The purpose of the present work was to evaluate the synergistic effects of analytical procedures on matrix effects during method development of the drugs determination by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Matrix effects influence both the quantitative and the qualitative analysis, and they are one from the many errors in LC-MS. They are many mechanisms evoking these errors and it is not trivial to clear up all of them. We evaluated the influence of the optimal ionization type (electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization), the sample preparation procedure, the mobile phase composition and the additives, the choice of suitable internal standard, and the type of biological material during the development of new method. For the successful validation of HPLC-MS method is mandatory to evaluate the matrix effect parameters.

*Key words:* matrix effects, liquid chromatography, mass spectrometry, validation.

## Úvod

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení na kladné nebo záporné ionty. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ionty vytvoří, nebo je emituje do plynného stavu a z plynné směsi molekul, jejich nabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmotností  $m/z$ . Pro analýzu léčiv se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI je primárně určena pro ionizaci nízkomolekulárních látek do  $m/z < 1000$ . Mezi hmotnostní analyzátory používané při analýze léčiv patří trojitý kvadrupólový analyzátor, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF), popřípadě jejich kombinace [1].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) má široké uplatnění v terapeutickém monitorování léků a jejich metabolitů (imunosupresiva, inhibitory proteáz, psychofarmaka, betablokátory), v analýze dědičných metabolických poruch, steroidů, mastných kyselin, aminokyselin, catecholaminů, v toxikologii atd.

U APCI je možné použít průtok v rozmezí 0,1 až 2 ml/min, optimální citlivosti lze dosáhnout při průtoku 1 ml/min. U ESI je vhodnější použít průtok v rozmezí 10–500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , kdy optimální průtok je okolo 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  [1].

APCI je vhodné pro méně polární látky s molekulovou hmotností nižší než 1000 Da a pro látky obsahující v molekule heteroatom. Naopak ESI je vhodný pro středně až vysokomolekulární polární a iontové látky [4].

## Metody HPLC-MS – kalibrace, optimalizace, vlivy matrice

Před zavedením nové metody je nejprve nutné definovat cíle, kterých je třeba dosáhnout, zda bude prováděno stanovení samotného léku nebo i jeho metabolitu. Dále navrhnout řešení problémů spojených s analýzou, jako jsou výběr materiálu, ze kterého bude stanovení prováděno (plná krev, plazma, sérum, moč, tkáň), limitace množstvím vzorku (pediatrické vzorky). V případě HPLC-MS je nezbytné vyhledat fyzikálně-chemické vlastnosti stanovovaných látek, jejich strukturu a přítomnost funkčních skupin, které mají vliv na výběr ana-

lytické kolony a mobilní fáze, rozpustnost, pKa a stabilitu. U většiny biologických vzorků je předpokladem, že musí být před samotnou analýzou nějakým způsobem upraveny. K úpravě vzorku se nejčastěji používá extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na tuhou fázi (SPE) a precipitace proteinů [1, 2, 7]. K precipitaci proteinů se používá metanol, acetonitril, síran zinečnatý nebo jejich kombinace. Při precipitaci proteinů nedojde k účinnému odstranění solí a lipidů, které mohou být jednou z příčin matricového efektu. Metanol a acetonitril jsou účinná rozpouštědla při precipitaci proteinů asi v 98 %, jestliže jsou používány v poměru 2 : 1 nebo vyšším. Rozpouštědla jako kyselina perchloroctová a trifluoroctová jsou sice vhodné k precipitaci proteinů, ale nedoporučují se používat u LC/MS v negativním modu [2, 4].

### Vnitřní standard (IS)

V případě, že jsou vzorky upravovány extrakcí, je nezbytné použití vnitřního standardu, který minimalizuje rozdíly v účinnosti extrakce a ionizace. V současné době jsou k dispozici tři druhy IS – strukturní analog stanovované látky, izotopem značený analyt ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ) nebo jiná vhodná chemická látka. Izotopem značený vnitřní standard je nejlepší volbou, nejlépe splňuje požadavky kladené na spolehlivost analýzy. Při nedostatečné výtěžnosti nedochází k ovlivnění výsledků, stejně jako při koeluci iontů dochází k rovnoměrné změně u IS i u analytu. Matricové efekty v tomto případě neovlivňují poměr IS/analytu, ale nepříznivě ovlivňují dolní mez stanovitelnosti.

Při použití strukturálně podobné látky jako IS je třeba dbát na přítomnost funkčních skupin. V případě, že funkční skupiny obsahují atomy jako O, N, S, P, halogeny dochází ke změně v rozložení náboje dané molekuly a tím i k rozdílné účinnosti ionizace. Z tohoto důvodu je doporučováno, aby se strukturální analog lišil od původní látky pouze vazbami C-H. Při analýzách léků a jejich metabolitů je doporučováno užití více IS [7].

### Optimalizace parametrů měření

Dalším krokem při zavádění nové metody je optimalizace podmínek měření. Výběr vhodného iontového zdroje, kdy ESI je používána zejména pro silně polární látky přibližně v 73 %, APCI je používána pro méně polární látky přibližně ve 23 % a pro nepolární látky je používána fotoionizace za atmosférického tlaku [6]. Výběr vhodné mobilní fáze má vliv na tvorbu iontů, minimalizaci tvorby nežádoucích aduktů. Jako mobilní fáze se nejčastěji používá metanol/voda, acetonitril/voda nebo metanol/acetonitril/voda a slabé kyseliny (kyselina octová nebo mravenčí) nebo kyselé pufrы (mravenčan amonný, octan amonný). Slabé kyseliny se přidávají do mobilní fáze v koncentraci 0,005–0,05 %. Kyselina mravenčí a kyselina octová se doporučují pro přípravu mobilní fáze s nízkým pH při použití elektrospreje, kyselina trifluoroctová pro stanovení proteinů nebo peptidů, ale není vhodná pro stanovení v negativním modu. Nízké pH mobilní fáze podporuje ionizaci analytu s bazickými funkčními skupinami. Kyselinu trifluoroctovou je možné také použít ke snížení „chvostování“ piků

a spolu s kyselinou propionovou k potlačení matricového efektu u zásaditých látek. Samozřejmě musí být optimalizovány i parametry jako průtok plynu, teplota analýzy a další [4, 7].

### Matricové efekty

Jak již bylo v textu několikrát zmíněno, matricové efekty mají velký význam při stanovování léků a jejich metabolitů za použití HPLC-MS. Matricové efekty lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. Vznikají jako výsledek soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem. Mechanismů, které způsobují matricové efekty, je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny. Rozdíly v mechanismech ovlivnění ionizace se samozřejmě liší i podle použité ionizační techniky. Předpokládá se, že hlavní příčina vychází z principu ionizace. Je dána změnou ve vlastnostech kapky vznikající při ionizaci, což způsobí přítomnost netěkavých nebo málo těkavých látek, které změní účinnost vytváření kapky nebo její vypařování. Výsledkem je změna v množství iontů v plynné fázi, které nakonec doputují do detektoru. Matricový efekt zahrnuje jak potlačení, tak zvýšení ionizace. Potlačení ionizace může způsobit zkřížená reakce mezi stanovovanou látkou, metabolity nebo vnitřním standardem. Zvýšení ionizace může být naopak způsobeno fragmentací metabolitů ve zdroji nebo silnou vazbou látky na biologickou matici. Důsledkem těchto procesů je snížení nebo zvýšení odezvy. Matricové efekty nejsou předvídatelné. Ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je vůči matricovým efektům méně citlivá než elektrosprej [1, 2].

Také některé složky mobilní fáze mohou způsobit matricový efekt. Mezi tyto složky patří kyseliny trifluoroctová, přídavky směsi kyseliny propionové a izopropanolu za kolonou, ale také přidání kyseliny octové a kyseliny propionové k mobilní fázi, která obsahuje kyselinu trifluoroctovou. Vznik matricového efektu mohou způsobit i exogenní materiály. Polymery obsažené v různých odběrových plastických nádobách nebo některá antikoagulantia, např. heparin litný, který se běžně používá. Rozdílný matricový efekt se může objevit jak při analýze standardních vzorků, tak při analýze biologického materiálu [2, 3].

Matricové efekty jsou pozorovány u obou typů ionizace, ale mnohem více se projevují u ESI. ESI je významně ovlivněna látkami v širokém rozsahu jejich polarit, zatímco APCI je ovlivňována především hydrofobními komponentami. Velké rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých technik úpravy vzorku. Precipitace proteinů acetonitrem u LC-ESI-MS/MS vykazuje největší matricový efekt s mohutnou supresí, zejména na začátku a na konci chromatogramu; díky neselektivní precipitaci proteinů je tzv. „přečištění“ biologického materiálu nedostatečné. Tímto způsobem se dostatečně neodstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Ty mohou být příčinou snížení ionizace u látek, které mají krátký retenční čas. SPE umožňuje mnohem intenzivnější přečištění biologického vzorku, ale na druhé straně dochází ke zvýšení koncentrace cílového analytu a spolu s ním i ke zvýšení koncentrace interferujících substancí,

čímž dochází ve výsledku k poměrně silnému matricovému efektu. Matricové komponenty charakteristické pro jednotlivé biologické materiály interferují v různých časech a v rozdílném rozsahu v průběhu analýzy. Při analýze moči se nejvíce uplatňují hydrofobní reziduální komponenty, zejména anorganické soli. Analýzou slin bylo prokázáno větší množství interferujících látek při použití ESI hydrofilní i hydrofobní povahy – aminokyseliny, proteiny a mucin [5].

Matricový efekt může ovlivnit jak kvalitu, tak kvantitu. Běžně se používají dvě metody hodnocení matricového efektu: infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přírůstek po extrakci. Post-kolonovou infuzí se zjišťuje kvalitativní matricový efekt. Při post-kolonovém dávkování je na kolonu nastříkovan slepý vzorek a konstantní množství analytu je vstříkováno přímo do iontového zdroje. Vše probíhá za podmínek, které se používají při analýze. Určí se oblast chromatogramu, kde může pravděpodobně docházet k matricovým efektům. Tento způsob lze použít u stanovení s malým počtem analytů nebo u vzorků se stejnou biologickou matricí. U vícerozložkových metod se používá přímé porovnání. Matricový efekt je zjišťován přímo během analýzy. Měří se několik vzorků o stejné koncentraci analytu a vnitřního standardu v roztoku bez matrice, slepý vzorek matrice používané pro přípravu standardů, kalibrátorů a blank matrice získaný z různých zdrojů. Za matricový efekt je považováno, jestliže rozdíl odezvy v matricích je větší než 25 %. Pokud je nižší, lze metodu použít ke kvantifikaci. Standardní přírůstek po extrakci vzorku slouží ke kvantitativnímu hodnocení [2].

K potlačení matricového efektu může dojít použitím malých objemů nastříkovaných na kolonu, nařazením vzorku, vhodnou úpravou vzorku anebo chromatografických podmínek, použitím vnitřního standardu, popř. použitím metody standardního přírůstku. Při použití vnitřního standardu se předpokládá, že bude stejně ovlivněn matricovým efektem jako analyt.

Matricové efekty jsou jedny z mnoha důležitých příčin chyb v LC/MS/MS. Jejich pochopení je velice důležité pro úspěšnou validaci [2, 3].

## Validace metody

Poté, co byly optimalizovány veškeré podmínky analýzy, může být provedena validace metody. Na validaci HPLC-MS metody jsou kladeny některé specifické požadavky.

### Linearita

Linearita musí být testována pro všechny stanovené léky a jejich metabolity v celém koncentračním rozsahu klinických aplikací. Kalibrační křivka by měla být sestavena alespoň z 6 kalibračních bodů. Jednotlivé kalibrační standardy by měly být připraveny ve stejné matrici, jako bude biologický materiál, ze kterého bude analýza prováděna. Pouze v některých případech (tkáň, ultrafiltrát) je možné použít kalibrační standard, který nebude rozpuštěn ve stejné matrici. Nejnižší bod kalibrační křivky by měl mít hodnotu dolní meze stanovitelnosti (LLOQ). Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti, nesmí být v průběhu analýzy měněna. Akceptovatelná odchylka pro LLOQ je 20 %, pro ostatní kalibrační standardy 15 % [7].

vitelnosti (LLOQ). Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti, nesmí být v průběhu analýzy měněna. Akceptovatelná odchylka pro LLOQ je 20 %, pro ostatní kalibrační standardy 15 % [7].

### Bias a přesnost

Pravdivost a přesnost metody je stanovována analýzou 5 kontrolních vzorků na 5 hladinách v testovaném rozsahu linearity:

1. kontrolní vzorek by měl mít koncentraci nejnižšího nenulového standardu kalibrační křivky, čili dolní mez stanovitelnosti.
2. kontrolní vzorek by měl mít koncentraci nejvyššího standardu kalibrační křivky.
3. kontrolní vzorek (nízká kontrola) by měl mít koncentraci rovnou trojnásobku hodnoty dolní meze stanovitelnosti.
4. kontrolní vzorek (střední kontrola) by měl mít koncentraci standardu nacházejícího se uprostřed kalibrační křivky.
5. kontrolní vzorek (vysoká kontrola) by měl mít vysokou koncentraci, ale nižší než poslední bod kalibrační křivky.

Může být používán i 6. kontrolní vzorek o koncentraci vyšší než poslední bod kalibrační křivky, který je následně nařazen na koncentraci v testovaném rozsahu linearity. Správnost i přesnost má být stanovena i pro vzorky, které jsou limitované objemem (pediatrické vzorky), a to při ředění 1 : 1 a 1 : 4. Vzorky musí být ředěny stejným biologickým materiálem s nulovou hodnotou analytu, ve kterém budou stanovovány. Opakovatelnost je třeba měřit u 5 vzorků od každé kontroly v jednom dni, reprodukovatelnost u 1 vzorku od každé kontroly v pěti následujících dnech. Akceptovatelná odchylka na hladině meze stanovitelnosti je 20 %, u ostatních kontrolních vzorků 15 % [7].

### Analytická selektivita

Schopnost analytické metody správně a přesně detekovat analyt v přítomnosti ostatních interferujících látek je důležitá právě u LC-MS. Provádí se testováním nulových vzorků matrice, vzorků obsahujících standard bez přítomnosti matrice a kalibračních vzorků na hladině meze stanovitelnosti. U každého vzorku je testována míra interference tím, že se stanoví velikost a rozptyl signálů pozadí a významnost těchto signálů vzhledem k výsledku kalibračního standardu [3, 7].

### Stabilita

Stabilita musí být testována v průběhu celého procesu. Měla by být testována stabilita vnitřního standardu, zejména deuterovaného IS, stabilita zásobních kalibračních roztoků, ale i stabilita matrice. Je zkoumána stabilita vzorků při skladování při -4 °C, -20 °C a -80 °C a při samotné analýze v autosampleru. Dále by měla být otestována stabilita vzorků při opakovaném rozmrazování [7].

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se vyznačuje vysokou přesností, širokou oblastí použití, výrazným zkrácením délky analýzy. Pro úspěšnou detekci léků je nezbytné zvolit nejen vhod-

nou chromatografickou metodu, ale zejména adekvátní způsob úpravy vzorku. Všechny kroky při vývoji metody spolu úzce souvisí a v průběhu vývoje musí být opakovaně optimalizovány. Mnoho parametrů, které jsou měřeny v průběhu validace HPLC-MS metody, je stejných jako u jiných analytických metod, ale u HPLC-MS je nezbytné pro vývoj a validaci robustní a spolehlivé analytické metody testování vlivu matricových efektů.

## Literatura

1. **Hoffmann, E., Stroobant, V.** *Mass Spectrometry Principles and Application*. Wiley-Interscience, 3<sup>rd</sup> edition, Chichester, 2007, p. 15–60. ISBN-13: 978-0470033111.
2. **Korfmaier, W. A. et al.** *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*, 1<sup>st</sup> edition, CRC Press, 2004, p. 103–129. ISBN-13: 978-0849319631.
3. **Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y.** Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. of Chromatography B*, 2009, 887, p. 2198–2207.
4. **Rossi, D. T., Sinz, M. et al.** *Mass Spectrometry in drug discovery*, 1. edition, CRC Press, 2001, p. 125–142, 171–195. ISBN-13: 978-0824706074.

5. **Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., Murphy, C. M.** Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14, p. 1290–1294.
6. **Oliveira, E. J., Watson D. G.** Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomed Chromatogr.*, 2000, 14, s. 351–372.
7. **Taylor, P. J.** *Method development and optimisation of LC-MS (Chapter 2)*. In: *Polettini, A., ed. Application of liquid chromatography-mass spectrometry in toxicology*. London: Pharmaceutical Press, 2006.

Do redakce došlo dne 18. 8. 2010.

Adresa pro korespondenci:  
Ing. Eva Klapková, Ph.D.  
Ústav klinické biochemie a patobiochemie  
UK 2. LF a FN Motol  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5-Motol  
e-mail: eva.klapkova@email.cz

**9.3 Uřinová R, Brozmannová H, Šišťák P, Šilhán P, Kacířová I, Lemr K, Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, J.Chromatogr. B. 2012; 907, 101-107**

Tato práce je věnována vývoji a validaci metody na simultánní stanovení devíti psychofarmak a jejich metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Při vývoji metody byl zjišťován matricový efekt post-kolonou infuzí. Metoda se vyznačuje snadnou přípravou vzorku, která spočívala v precipitaci proteinů pomocí směsi acetonitril:metanol (40:60, v/v) spolu s 0,05% síranem zinečnatým. Na základě terapeutických referenčních rozmezí byly látky rozděleny do tří koncentračních skupin, na látky s nízkou, střední a vysokou koncentrací. Separace probíhá na koloně Acquity UPLC RP BEH C18, při teplotě 30°C v gradientu mobilní fáze (octan amonný:kyselina mravenčí: acetonitrilu, v/v/v). Celková doba analýzy byla 5 min. Jako způsob ionizace se využívá elektrosprej v pozitivním modu (ESI<sup>+</sup>). Metoda byla validována podle FDA pravidel.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum

Romana Uřinová<sup>a,\*</sup>, Hana Brozmanová<sup>a</sup>, Pavel Šišťík<sup>a,b</sup>, Petr Šilhán<sup>c</sup>, Ivana Kacířová<sup>a</sup>, Karel Lemr<sup>b</sup>, Milan Grundmann<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine University of Ostrava and University Hospital Ostrava, 708 52 Ostrava, Czech Republic

<sup>b</sup> Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 779 00 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Psychiatry, University Hospital Ostrava, 708 52 Ostrava, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 February 2012

Accepted 6 September 2012

Available online 13 September 2012

#### Keywords:

Psychotropic drugs

Therapeutic drug monitoring

High performance liquid chromatography

Mass spectrometry

### ABSTRACT

The rapid and simple ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method was developed and validated for simultaneous determination parent drugs: sertraline, fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine, clozapine, olanzapine, quetiapine, risperidone, and their active and nonactive metabolites N-desmethylsertraline, norfluoxetine, desmethylcitalopram, didemethylcitalopram, N-desmethylvenlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, N-desmethylclozapine, N-desmethyloanzapine, 2-hydroxyolanzapine and 9-hydroxyrisperidone in human serum. Precipitation of serum proteins was performed with a precipitation reagent consisting of 0.05% solution of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in acetonitrile/methanol (40:60, v/v). Alprenolol was used as an internal standard. Chromatographic separation was carried out on a BEH C18 column using gradient elution mobile phase A (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 5% acetonitrile, v/v/v) and B (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 95% acetonitrile, v/v/v). Electrospray in positive mode was used for ionization. Detection was performed on a triple–quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring. Analysis time was 5 min. Drugs were separated into three groups with low, medium and high levels. Correlation coefficients of calibration curves were in the range 0.995–1.000. Coefficients of variation were 4.2–9.5% for intra-assay and 3.0–11.9% for inter-assay. Recoveries were 87.1–110% for intra-assay and 88.1–108.2% for inter-assay. The method was fully validated and can be successfully applied for routine analyses.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Therapeutic drug monitoring is an important tool for the clinical management of patients receiving pharmacotherapy, particularly in psychiatry. There is evidence of therapeutic and economic benefits of monitoring these drugs to avoid adverse effects, intoxication, no response or non-compliance. Baumann et al. [1] worked out guidelines for the routine use of TDM of psychoactive drugs as follows: (a) strongly recommended for clozapine and olanzapine; (b) recommended for venlafaxine plus O-desmethylvenlafaxine and risperidone plus 9-hydroxyrisperidone; (c) useful for citalopram, fluoxetine plus norfluoxetine, paroxetine, sertraline and

quetiapine; (d) probably useful for fluvoxamin and escitalopram; (e) not recommended for clomethiazol and zolpidem.

Psychoactive drugs can be classified according to their chemical structure or mechanism of action. Clozapine, olanzapine and risperidone represent atypical antipsychotics. Olanzapine and clozapine are mainly metabolized into N-desmethyloanzapine and N-desmethylclozapine, respectively. Since the ongoing usage of clozapine can cause agranulocytosis, it should primarily be used in schizophrenic patients who are resistant to, or intolerant of, conventional antipsychotic medication. 9-Hydroxyrisperidone is a major active metabolite of risperidone and its pharmacological activity is almost similar to the parent drug [2,3]. Venlafaxine (VEN) is a non-tricyclic antidepressant, which inhibits the reuptake of serotonin, noradrenaline and, to a lesser extent, dopamine. In humans, VEN is metabolized into two minor metabolites (N-desmethylvenlafaxine, N,O-didesmethylvenlafaxine) and one major active metabolite (O-desmethylvenlafaxine) [4]. Fluoxetine, paroxetine, citalopram and sertraline belong to selective

\* Corresponding author at: Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine University of Ostrava and University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava, Czech Republic. Tel.: +420 59 737 4393; fax: +420 59 737 4393.

E-mail address: [romanaurinovska@seznam.cz](mailto:romanaurinovska@seznam.cz) (R. Uřinová).

serotonin reuptake inhibitors. Sertaline and fluoxetine are metabolized into active metabolite N-desmethylsertraline and N-desmethylfluoxetine, respectively. Paroxetine and citalopram have no active metabolites [5].

To monitor psychoactive drugs, the analytical methods have to be highly sensitive and selective for accurate and precise quantification. Generally, the plasma concentrations of the drugs are low and patients are frequently co-medicated with other drugs, which may interfere with the assay. HPLC with fluorimetric detection [6–8], with coulometric detection [3], or UV detection [9–13] and HPLC/MS [14–21] were applied in analysis of one or a group of selected antidepressants or antipsychotics.

The first implementation of HPLC/MS in clinical routine laboratories started about fifteen years ago with the first therapeutic drug monitoring [22]. The technique has been used in particular for a new generation of antipsychotic drugs. In the beginning, it was applied for the determination of only one drug [23], subsequently, a few additional drugs and their metabolites have been quantified in one chromatographic run [14,15,17,24].

The presented work is aimed at the development and validation of a new analytical method for simultaneous separation and determination of the most important psychoactive drugs belonging to groups' a–d of Baumann's guidelines [1]. In routine laboratories, such a method allows the analysis of all clinical samples containing some of the studied drugs with the same instrumental and experimental set-up.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and solution

Acetonitrile and methanol of HPLC gradient grade, ammonium acetate fractopur, and formic acid extra pure were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Water of HPLC grade and zinc sulphate ( $\geq 99\%$ ) was obtained from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). The following reference standards of antidepressants and antipsychotics were purchased from TRC (Toronto Research Chemicals Inc., Canada): fluoxetine, norfluoxetine, citalopram, desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram, paroxetine, sertraline, desmethylsertraline, venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, N-desmethylvenlafaxine, olanzapine, 2-hydroxy olanzapine, desmethylolanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone. Quetiapine was obtained from JS Research Chemicals Trading (Wedel, Germany). Clozapine, N-desmethylclozapine and alprenolol hydrochloride were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). The drug-free serum of healthy volunteers was provided by The Blood Centre University Hospital, Ostrava. Quality control samples were obtained from Chromsystems (Munich, Germany).

### 2.2. Preparation of calibration standards and patient samples

Standard stock solutions of 100 mg/L were prepared by dissolving single drugs in methanol. Three standard mixtures were prepared. Their concentration was related to the therapeutic range of drugs. A low level standard mixture (400 ng/mL) was prepared for risperidone and hydroxyrisperidone, a medium level mixture (4000 ng/mL) for fluoxetine, norfluoxetine, citalopram, desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram, paroxetine, sertraline, desmethylsertraline, olanzapine, 2-hydroxyolanzapine, desmethylolanzapine and quetiapine, and a high level mixture (8000 ng/mL) for clozapine, N-desmethylclozapine, venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine and N-desmethylvenlafaxine. Calibration standards were prepared in concentrations as follows: 0.5, 1, 2.5,

5, 10, 25, 50 and 100 ng/mL for low level drugs, 2.5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ng/mL for medium level drugs, and 5, 50, 100, 250, 500, 1000 and 2000 ng/mL for high level drugs. Alprenolol was used as an internal standard at concentration 20,000 ng/mL and was stored at 4 °C. Standard stock solutions and calibration standards were stored at –20 °C. Solution 0.05% ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in acetonitrile/methanol (40:60, v/v) was utilized for protein precipitation.

The drug-free serum (0.2 mL) was spiked with 0.05 mL internal standard and 0.05 mL calibration standard. 0.5 mL precipitation solution and 0.2 mL water was added. The mixture was vortex-mixed for 30 s and was left for 5 min at 4 °C. After centrifugation for 10 min at 1370 × g and 4 °C, the upper layer was transferred into vials and 10 µL was injected into a chromatographic column. Patient samples and quality control samples were prepared in the same manner.

### 2.3. Chromatographic and mass spectrometric conditions

HPLC/MS/MS analysis was carried out using a Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) connected to a Quattro Micro API triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK) with a Acquity UPLC RP BEH C18, 1.7 µm; 2.1 mm × 50 mm column. The gradient elution was performed using mobile phase A (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 5% acetonitrile, v/v/v) and mobile phase B (2 mmol/L ammonium acetate, 0.1% formic acid in 95% acetonitrile, v/v/v) with the time program: 0 min A:B=80:20 (v/v), 3 min 5:95, 3.1 min 80:20, 5 min 80:20. The flow rate was 0.4 mL/min. The temperature of the column was maintained at 30 °C. The injection interval of samples was 5 min. Both positive ion electrospray ionization and positive atmospheric pressure chemical ionization were tested in the method development. The final optimized conditions for ESI<sup>+</sup> were: capillary voltage 1.5 kV, source temperature 100 °C, desolvation temperature 420 °C; for APCI<sup>+</sup>: corona current 3 µA, source temperature 100 °C, desolvation temperature 350 °C. Cone voltage and collision energy were optimized for both ionization techniques and for each drug individually. Finally, the positive ion electrospray ionization mode was chosen for routine analysis. High purity argon was used as collision gas and multiple reaction monitoring (MRM) was applied to follow the analytes. All data were evaluated using MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, MA, USA).

### 2.4. Matrix effect

Matrix effects were evaluated using post-column infusion experiments [25]. A precipitation solution with 0.2 mL water (A) and a precipitation solution with 0.2 mL drug-free serum (B), respectively, were injected into a chromatographic column and then, separately, all drugs and metabolites were infused post-column in concentration 100 ng/mL. Samples A and B were enriched with olanzapine and desmethylolanzapine in concentration 100 ng/mL and were repeatedly injected on column. Peak areas of serum samples were correlated with corresponding peaks in a reference samples prepared from water and precipitating reagent.

### 2.5. Validation of method

The method was validated for linearity, accuracy and precision using FDA criteria [26]. Calibration curves for serum standard samples were constructed by plotting ratios of the peak area of each drug to peak area of internal standard versus standard concentrations. Linearity of calibration curves were chosen to cover the therapeutic range of individual drugs.

**Table 1**  
Correlation of ionization sources ESI and APCI.

Drug	ESI <sup>+</sup>				APCI <sup>+</sup>				R <sub>t</sub> (min)
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE	Area ± SD	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE	Area ± SD	
Risperidone	411.3	191.1	30	55748.2 ± 1914.9	411.2	191.1	34	3011.5 ± 54.7	0.84
9-Hydroxyrisperidone	427.2	206.9	30	44151.8 ± 1383.1	427.1	207.1	29	1608.1 ± 60.6	0.78
Sertraline	306	158.6	24	48701.7 ± 1959.2	306	158.9	27	1367.2 ± 102.8	1.36
N-desmethylsertraline	292.2	158.9	24	21989.9 ± 528.9	291.9	158.9	23	3656.9 ± 272.7	1.33
Fluoxetine	310.2	43.6	11	38780.8 ± 1009.7	310.1	43.5	29	1084.7 ± 199.6	1.36
Norfluoxetine	296.2	133.7	7	20863.9 ± 487.1	295.9	134	6	1511.7 ± 131.6	1.28
Citalopram	325.2	109.2	27	149130.2 ± 8757.7	325.2	108.9	25	12290.2 ± 828.1	1.08
Desmethylcitalopram	311.2	108.8	25	136648 ± 4202.2	312.9	192	41	6270.1 ± 507.7	1.05
Didesmethylcitalopram	297.2	108.9	25	53994.6 ± 1051.8	296.9	108.9	19	7987.9 ± 244.1	1.03
Paroxetine	330	191.7	30	11313.9 ± 242.9	330.1	69.8	26	3489.3 ± 226.2	1.15
Quetiapine	384.2	252.8	20	663495.3 ± 20454.3	384.4	253.2	21	5703.3 ± 171.8	1.00
Clozapine	327	269.6	25	1167626.1 ± 31951.2	327.1	269.8	25	11320.8 ± 439.3	0.94
N-desmethylclozapine	313.2	270.2	24	98364.2 ± 4579.3	312.9	269.9	25	2635.6 ± 131.8	0.85
Venlafaxine	278.6	57.6	17	44168.6 ± 2731.2	278.1	57.6	18	9495.7 ± 257.7	0.87
O-desmethylvenlafaxine	264.3	57.7	18	171314.1 ± 6779.3	264	57.6	17	27608.1 ± 546.8	0.58
N-desmethylvenlafaxine	264.2	120.8	29	83740.0 ± 690.3	264.2	121	27	1755.8 ± 123.3	0.83
Olanzapine	313.3	212.8	30	60422.9 ± 1630.7	313.1	255.9	23	77121.3 ± 3688.4	0.52
N-desmethylolanzapine	299.2	197.8	40	185190.6 ± 3063.9	299	198	38	8787.0 ± 680.8	0.47
2-Hydroxyolanzapine	329.2	271.9	23	1447401.2 ± 33374.7	329	271.9	25	73516.1 ± 5637.1	0.42
Alprenolol (IS)	250.2	91	34	66567.4 ± 2377.8	250.1	90.9	40	2402.7 ± 256.8	0.99

ESI<sup>+</sup>, electrospray ionization; APCI<sup>+</sup>, atmospheric-pressure chemical ionization; Q1, parent ion mass; Q3, daughter ion mass; CE, collision energy.

### 2.5.1. Limit of quantification

The LOQs in the serum, defined as the lowest concentration with acceptable precision and accuracy (coefficient of variations less than 20%) were defined as the first point of reference curves.

### 2.5.2. Accuracy, precision and recovery

The assays were repeated ten times within the same day to obtain repeatability (intraday precision) and ten times over different days to obtain inter-day precision. Intra-assay and inter-assay precision, accuracy and recovery for each drug were evaluated by analyses of the three various concentrations: (5, 25, 100 ng/mL for the low level mixture, 10, 100, 500 ng/mL for the medium level mixture, and 50, 250, 1000 ng/mL for the high level mixture). The precision of the method was determined by coefficient of variation (%CV) which was expected to be within ±15.0%. Similarly, the accuracy should not deviate by ±15.0% of nominal concentration. For recovery, the analytes' responses from extracted samples at known concentration were compared with responses un-extracted standards that represent 100% recovery.

### 2.6. Analysis of patient samples

Serum samples were obtained from in-patients treated with antidepressants and antipsychotics in the psychiatric department of University Hospital Ostrava. Serum samples from patients were measured on the day of the admission to hospital, then on 3rd or 4th days of their hospitalization before and after drug administration. Some patients were admitted to hospital repeatedly and their serum samples were collected and measured by the same manner as in the first stay. Patients receiving citalopram, venlafaxine, clozapine, quetiapine and risperidone were sampled 2 h after dose, patients receiving fluoxetine, paroxetine, sertraline and olanzapine, 6 h after dose (in accordance with drug pharmacokinetic) [27]. All samples were sent to our laboratory immediately after being taken from the patient, centrifuged and analyzed the same day.

## 3. Results

Chromatographic analysis of the highest concentration of standards from each group of drugs (low, medium and high) was performed five times to compare the ionization efficiency of ESI and APCI (Table 1). The method was further validated using +ESI

as it offers better response in comparison with APCI for all drugs, except olanzapine (Table 1).

### 3.1. Matrix effect

A negligible matrix effect was observed between 0.45 and 1.75 min, but more significantly evaluated in the time window where elution of olanzapine and desmethylolanzapine occurs (typical response is seen in Fig. 1). The possible matrix effect for olanzapine and desmethylolanzapine was further tested as follows. The mean peak areas of olanzapine and desmethylolanzapine in serum samples were compared with corresponding peaks in a reference sample and the ratios were 0.92 and 0.83, respectively.

### 3.2. Validation of method

Chromatograms of all analyzed drugs are shown in Fig. 2. Linearity of calibration curves were chosen to cover over therapeutic range of individual drugs. Correlation coefficients of calibration curves so as and concentration range for each drug are summarized in Table 2. The limit of quantification in the serum was determined

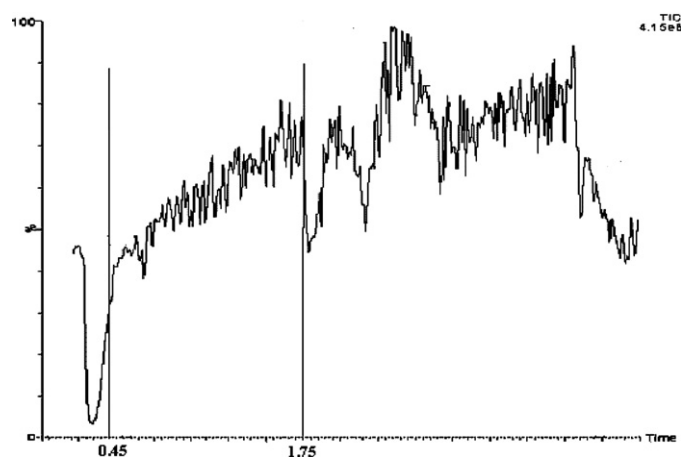


Fig. 1. Chromatogram of sample prepared from drug free serum with post column infusion of olanzapine. Verticals indicate a part of chromatogram without matrix effects.

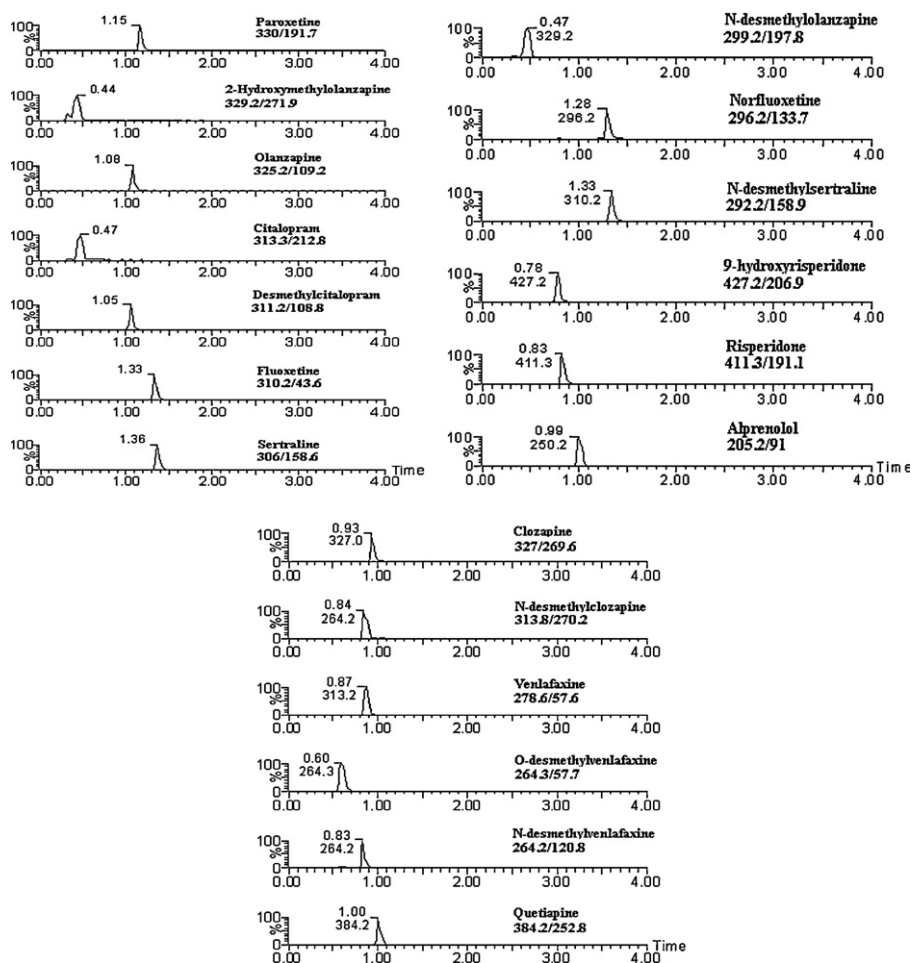


Fig. 2. Chromatograms of single drugs with retention time and mass transition.

as the lowest concentration of calibration curves. The parameters of intra-assay and inter-assay precision, accuracy and recovery met validation requirements and are stated in Table 2.

### 3.2.1. Quality control

QC samples at two concentration levels (low and high) with declared concentrations were used as an independent source of data and were not included in the validation protocol. Quality control samples were prepared and measured in each run with patient samples. Results of quality control were compared with declared range.

### 3.3. Analysis of patient samples

Overall, 379 samples from 228 patients (63 male and 165 female) were measured and some of the patients were examined repeatedly. The average age of the patients was  $35.4 \pm 7.4$  years (19–81) for males and  $38.9 \pm 10.3$  years (17–88) for females. The average weight of the patients was  $90.1 \pm 9.6$  kg for males and  $69.8 \pm 2.8$  kg for females. The concentration of the drugs and their main measured metabolites, together with therapeutic range, number of patients in and out of therapeutic range and average daily dosage for single drugs, are given in Table 3. Since co-medication with antiepileptic drugs such as carbamazepine, lamotrigine, valproic acid and clonazepam has often occurred in this group of patients, these drugs were tested for possible interference. None of them influence analysis of the target compounds as they elute in a different retention time.

## 4. Discussion

Although HPLC methods for determination of psychoactive drugs have been gradually developed, clinical significance of TDM was confirmed only when Baumann et al. published their guidelines [1]. Our method was developed and validated for simultaneous analysis of most antidepressants and antipsychotics, including their main metabolites, which were recommended for TDM.

HPLC method with mass spectrometric detection was applied to one, or a selected group of drugs, using either ESI or APCI [28–31]. Concerning psychoactive drugs, APCI is used less often, most authors preferring ESI. Our results confirmed that ESI offers a more efficient ionization for the determination of analyzed psychoactive drugs (except olanzapine). Berna et al. [28] and Bogusz et al. [29] employed APCI in the analysis of olanzapine, but ESI were not tested. Precipitation of proteins by acetonitrile/methanol (40:60, v/v), with a small amount of zinc sulphate, was confirmed as a useful procedure. This procedure is widely adopted in analysis of immunosuppressive drugs and has been described in detail elsewhere [32–35].

The quantitative analysis of biological samples, using mass spectrometry with atmospheric pressure ionization, can be complicated by the presence of matrix components, e.g. lipids and phospholipids that can co-elute with analytes and influence their response [36]. Chin et al. [37] investigated the matrix effect of a commonly used anticoagulant and lipemia. Their results indicate that sodium heparin and  $K_3$ EDTA can complicate determination and are not useful

**Table 2**  
Parameters of validation.

Drug	Correlation coefficient	Concentration range (ng/ml)	Concentration (ng/ml)	Intra-assay ( <i>n</i> = 10)			Inter-assay ( <i>n</i> = 10)		
				Found concentration Mean ± SD (ng/mL)	CV (%)	R (%)	Found concentration Mean ± SD (ng/mL)	CV (%)	R (%)
Risperidone	0.998	1–100	5	4.9 ± 0.4	8.1	98.4	5 ± 0.4	8.4	99.4
			25	25 ± 0.6	2.2	100.1	26 ± 0.7	2.6	103.8
			100	98.7 ± 3.6	3.7	98.2	101.1 ± 3.2	3.1	101.1
9-Hydroxyrisperidone	0.998	1–100	5	4.9 ± 0.4	5.4	97.7	5 ± 0.3	6.5	100.0
			25	25.6 ± 0.8	3.3	102.3	26.5 ± 1.58	6.0	105.8
			100	98.3 ± 3.1	3.1	98.3	103.6 ± 3.6	3.5	103.6
Sertraline	0.998	5–500	10	9.8 ± 0.6	6.6	98.3	9.2 ± 0.8	9.0	91.8
			100	102.1 ± 5	5.0	102.1	100.5 ± 5	5.0	100.5
			500	487.5 ± 41.3	8.5	96.7	499.5 ± 38.3	7.7	99.9
N-desmethylsertraline	0.999	5–500	10	9.9 ± 0.4	4.2	99.0	10.3 ± 0.7	6.9	103.0
			100	105.5 ± 2.8	2.7	105.5	112.4 ± 3.8	3.4	112.4
			500	459.6 ± 17.5	3.8	91.9	476.7 ± 22.2	4.7	95.3
Fluoxetine	0.999	5–500	10	10.1 ± 0.9	8.9	100.5	10.4 ± 1.1	10.8	104.0
			100	91.1 ± 4.1	4.2	99.1	98 ± 8.2	8.4	98.0
			500	480.7 ± 30.3	6.3	96.1	487.7 ± 33.5	6.9	97.5
Norfluoxetine	1.0	5–500	10	10.3 ± 0.4	3.7	103.1	9.9 ± 0.6	6.1	98.7
			100	101.1 ± 5	5.0	101.1	104.5 ± 6.2	5.9	104.5
			500	445.7 ± 20.3	4.5	89.1	503.6 ± 32.4	6.4	100.7
Desmethylcitalopram	0.999	5–500	10	10.2 ± 0.3	2.9	100.6	9.7 ± 0.4	3.7	97.2
			100	101.8 ± 6.5	6.4	101.9	97.7 ± 6.4	6.6	97.7
			500	505.0 ± 22.6	4.5	101.1	505 ± 17.9	3.5	101
Drug	Correlation coefficient	Concentration range (ng/ml)	Concentration (ng/ml)	Intra-assay ( <i>n</i> > 10)			Inter-assay ( <i>n</i> > 10)		
				Found concentration Mean ± SD (ng/mL)	CV (%)	R (%)	Found concentration Mean ± SD (ng/mL)	CV (%)	R (%)
Didesmethylcitalopram	0.999	5–500	10	10.1 ± 0.3	3.2	101.3	10.8 ± 0.7	6.2	108
			100	108 ± 6.7	6.2	108.3	108.2 ± 5.4	5.0	108.2
			500	502.2 ± 3.6	0.7	100.4	477.9 ± 20.3	4.2	95.6
Paroxetine	0.995	5–500	10	10.1 ± 0.6	5.5	101	10 ± 0.8	8.3	99.9
			100	110.4 ± 6.1	5.5	110	102.4 ± 12.1	11.9	102.4
			500	521.9 ± 32.4	6.2	104.4	492.8 ± 14.5	2.9	98.6
Quetiapine	0.999	5–500	10	9.8 ± 0.8	7.9	98.4	10.4 ± 0.6	6.0	103.5
			100	97.9 ± 4.9	5.0	97.9	101.3 ± 5.7	5.6	101.3
			500	507.6 ± 10.7	2.1	101.5	491.7 ± 8.3	1.7	98.3
Clozapine	0.997	5–2000	50	44.2 ± 1.3	2.9	88.3	45.2 ± 1.4	3.0	90.5
			250	227.8 ± 7.1	3.1	91.1	225 ± 13	5.8	90.0
			1000	1012.8 ± 33.2	3.3	101.3	1008.9 ± 40.6	4.0	100.9
N-desmethylclozapine	0.998	50–1000	50	45.3 ± 2.6	5.7	90.6	49.9 ± 2.9	5.8	99.8
			250	240.3 ± 14	5.8	96.1	264.5 ± 17.6	6.7	105.8
			1000	1065 ± 47.1	4.4	106.5	996.6 ± 70.8	7.1	99.7
Venlafaxine	0.998	50–2000	50	54.4 ± 3	5.4	108.8	48.6 ± 4.6	9.5	97.1
			250	271.2 ± 12.2	4.5	108	225.8 ± 9.5	4.2	90.3
			1000	1051.1 ± 36.4	3.5	105.1	1062.7 ± 59.1	5.6	106.3
O-desmethylvenlafaxine	0.998	5–2000	50	48.7 ± 2.5	5.2	97.5	44.1 ± 1.6	3.7	88.1
			250	246 ± 10.4	4.2	98.4	231.1 ± 25.6	11.1	92.5
			1000	1018 ± 29.5	2.9	101.8	1031.9 ± 48.2	4.7	103.2
N-desmethylvenlafaxine	0.998	5–1000	50	45.3 ± 2.5	2.7	90.6	47.6 ± 3	6.2	95.2
			250	252 ± 10.8	4.3	100.8	245.9 ± 11	4.5	98.4
			1000	1049.4 ± 37.5	3.6	105	1036.7 ± 65.9	6.4	103.7
Olanzapine	0.999	5–500	10	10.2 ± 0.5	4.9	102.2	9.9 ± 0.6	6.1	99.4
			100	106.9 ± 8.2	7.7	106.9	97.6 ± 7.1	7.3	97.6
			500	512.1 ± 38.8	7.6	102.4	501.2 ± 17.2	3.4	100.2
N-desmethylolanzapine	0.996	5–500	10	10.7 ± 0.6	5.8	106.8	10 ± 0.9	8.9	99.7
			100	109.7 ± 4.2	3.8	109.7	100.6 ± 6.2	6.2	100.6
			500	495.4 ± 17.5	3.5	99.1	488.6 ± 17	3.5	97.7
2-hydroxyolanzapine	0.998	5–500	10	10.9 ± 0.7	6.1	108.6	10 ± 0.6	6.3	99.6
			100	107.7 ± 5.9	5.5	107.7	103.8 ± 7.7	7.4	103.8
			500	519.1 ± 41.4	8.0	103.4	495.4 ± 8.1	8.2	99.1

CV, coefficient of variation; R, recovery.

for the clinical study of drugs. It is better to analyze serum samples without additives. The matrix effect can also be caused by exogenous substances such as polymers contained in different brands of plastic tubes. Eeckhaut et al. [36] described the influence of matrix effects on APCI and ESI but the mechanism of these effects is still not fully understood. In our study matrix effects were evaluated using post-column infusion experiment and were found to be negligible

between 0.45 and 1.75 min, where the most compounds were measured. Only olanzapine and des-methylolanzapine which had faster elution (RT below 0.45 min) could co-eluted with matrix components decreasing their response and ion suppression 8% and 17%, respectively, was observed. Finally, a matrix effect of about 20% is generally tolerated, as it does not significantly influence analytical results [38].

**Table 3**  
Therapeutic range, range of measured concentrations and usual dosage range/average daily dosage.

Drug	Therapeutic range (ng/ml)	n/o	Range of measured concentrations (ng/ml)	UDR/ADD (mg/day)
Risperidone	20–60*	13/9	0.5–28.5	2–8/2.1 [27]
9-Hydroxyrisperidone		13	3.2–30.7	
Sertraline	10–50	56/30	3.4–111.9	100–150/115 [27]
N-desmethylsertraline		56	2.5–249.7	
Fluoxetine	120–300*	4/3	58.7–151.2	20–40/20 [27]
Norfluoxetine		4	165.6–203.8	
Citalopram	30–130	80/50	2.8–172.0	20–40/18 [27]
Desmethylcitalopram		46	2.7–18.8	
Didesmethylcitalopram		13	2.7–9.0	
Paroxetine	70–120	43/4	3.9–229.8	20–40/30 [27]
Quetiapine	70–170	76/10	3.1–344.5	200–900/144 [27]
Clozapine	350–600	6/1	62.9–484.3	200–900/350 [27]
N-desmethylclozapine		6	38.4–332.9	
Venlafaxine	195–400*	90/43	4.4–1017.3	75–225/174 [27]
O-desmethylvenlafaxine		89	3.8–1054.6	
N-desmethylvenlafaxine		87	3.5–781.1	
Olanzapine	20–80	11/7	4.9–46.6	7.5–30/10 [27]
N-desmethyloanzapine		6	3.3–12.9	
2-Hydroxyolanzapine		3	2.6–2.7	

n/o, number of samples/number of samples in therapeutic range. UDR/ADD, usual dosage range/average daily dosage.

\* Drug plus metabolite.

Coefficients of correlation between 0.995 and 1.0 were obtained for calibration curves of all analytes. Because of significant differences in the therapeutic concentration of drugs in the serum, analytes were divided into three groups with low, medium and high concentrations, and validated separately. Validation criteria of precision and accuracy were evaluated in intra-assay and inter-assay conditions and were between 0.7–11.9 and 88.1–110, respectively, which met validation requirements. Analyses of quality control samples in two concentration levels (low and high with declared values) confirmed the validity of the method. The clinical significance of the method was verified using analyses of real patient samples, which were taken during the whole dosing interval for one or more given drugs.

Overall, 379 samples from 228 patients have so far been measured, which is relatively a small group to use to state any clinical conclusions. Nevertheless, some relationship between drug concentrations in the serum and daily dose can be described. Patients with the lowest concentration levels, which were significantly below the therapeutics range, had the lowest recommended daily dose. Metabolism of antidepressant and antipsychotic drugs is due to cytochrome P 450 and shows a high inter-individual variability in the concentrations of parent drugs and their main metabolites. The further flow of patients raised the question of their compliance, because many of these drugs are badly tolerated. When the drugs were analyzed during admission of the patients to the psychiatric department, concentrations were often lower in comparison with those measured later when regular dosing is guaranteed.

For all of the drugs, except venlafaxine, measured concentrations were in the therapeutic range or below the lower limit. For venlafaxine, the measured concentrations remained well above the upper range in spite of the fact that the patients received only an average daily dose of 300 mg/day.

As is indicated, therapeutic drug monitoring of antidepressants and antipsychotics might be important to optimize pharmacotherapy and thus improve care of psychiatric patients. The validated LC–MS/MS method for simultaneous analysis of the nine drugs and their main metabolites represents a significant tool which enables measurement and monitoring of frequently taken psychoactive drugs.

## 5. Concluding remarks

This method was developed and validated for analysis of nine psychoactive drugs and ten metabolites. Because of the different

concentration ranges of single drugs observed in the serum, analytes were divided into three groups with low, medium and high levels. The method uses electrospray ionization (ESI) with a negligible matrix effect of co-eluting compounds. It allows determination of a new, so far unpublished, group of drugs and their metabolites, which are suitable for routine use, in a very short period of time. This may be important in terms of possible intoxication or drug interactions.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

## Acknowledgements

Karel Lemr acknowledges the financial support of the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

## References

- [1] P. Baumann, C. Hiemke, S. Ulrich, G. Eckermann, I. Geartner, M. Gerlach, H.J. Kuss, G. Laux, B. Müller-Oerlinghausen, M.L. Rao, P. Riedere, C. Zernig, *Pharmacopsychiatry* 37 (2004) 243.
- [2] M. Kollroser, C. Schober, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1266.
- [3] D.S. Schatz, A. Saria, *Pharmacology* 60 (2000) 51.
- [4] F. Qin, N. Li, T. Qin, Y. Zhang, F. Li, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 689.
- [5] M. Segura, J. Ortuno, M. Farré, R. Pacifici, S. Pichini, J. Joglar, J. Segura, R. de la Tore, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1455.
- [6] L. Kristoffersen, A. Bugge, E. Lundanes, L. Slordal, *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 229.
- [7] R. Mandrioli, L. Mercolini, R. Cesta, S. Fanali, M. Amore, M.A. Raggi, *J. Chromatogr. B* 856 (2007) 88.
- [8] R.F. Suckow, F. Zhang, T.B. Cooper, *Clin. Chem.* 38 (9) (1992) 1756.
- [9] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Uglund, T.J. Gronhaug, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 3.
- [10] L. Mercolini, F. Bugamelli, E. Kennedler, G. Boncompagni, L. Franchini, M.A. Raggi, *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 273.
- [11] P.M. Llorca, F. Coudore, Ch Corpelet, A. Buysen, M. Hoareau, A. Eschaliere, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1719.
- [12] K. Akerman, J. Jolkonen, M. Parviainen, I. Penttila, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1412.
- [13] W.R. Malfará, C. Bertucci, M.E.C. Queiroz, S.A.D. Carvalho, M.L.P. Bianchi, E.J. Cesarino, J.A. Crippa, R.H. Costa Quieros, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 955.
- [14] A. Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 183.
- [15] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande, *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 33.
- [16] C. Pistos, I. Panderi, J. Atta-Poltou, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 235.

- [17] J. Bhatt, A. Jangid, G. Venkatesh, G. Subbaiah, S. Singh, J. Chromatogr. B 829 (2005) 75.
- [18] O.Y. Al-Dirbashi, H.Y. Aboul-Enein, A. Al-Odaib, M. Jacob, M.S. Rashed, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 365.
- [19] H.A. Niederländer, E.H. Koster, M.J. Hilhorst, H.J. Metting, M. Eilders, B. Ooms, G.J. de Jong, J. Chromatogr. B 834 (2006) 98.
- [20] I.B. Peak, Y. Moon, H.Y. Ji, K. Hui-Hyun, W.L. Hye, L. Yong-Bok, S.L. Hye, J. Chromatogr. B 809 (2004) 345.
- [21] M. Kubo, Y. Mizooku, Y. Hirao, T. Osumi, J. Chromatogr. B 822 (2005) 294.
- [22] M. Vogesser, Ch. Seger, Clin. Biochem. 41 (2008) 649.
- [23] M.O. Moraes, F.E. Lerner, G. Corso, F.A. Bezerra, M.E. Moraes, G. De Nucci, J. Clin. Pharmacol. 39 (1999) 1053.
- [24] H. Kirchherr, W.N. Kühn-Velten, J. Chromatogr. B 843 (2006) 100.
- [25] H. Mei, in: W.A. Kofmarcher (Ed.), Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies, CRC Press, Boca Raton, 2004, p. 103.
- [26] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, May 2001.
- [27] K.E. Thummel, D.D. Shen, N. Isoherranen, in: L.L. Brunton, B.A. Chabner, Knollmann (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Companies, United States, 2010, p. 1891.
- [28] M. Berna, B. Ackermann, K. Rutterbories, S. Glass, J. Chromatogr. B 767 (2002) 163.
- [29] M. Bogusz, K.D. Krüger, R.D. Maier, R. Erkwow, F. Tucgtenhagen, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 732 (1999) 257.
- [30] X. Chen, X. Duan, X. Dai, D. Zhong, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 2483.
- [31] F.C.W. Sutherland, D. Badenhorst, A.D. de Jager, T. Scanes, H.K.L. Hundt, K.J. Swart, A.F. Hundt, J. Chromatogr. A 914 (2001) 45.
- [32] F. Streit, V.W. Armstrong, M. Oellerich, Clin. Chem. 48 (2002) 955.
- [33] D.W. Holt, T. Lee, K. Jones, A. Johnston, Clin. Chem. 46 (2000) 1179.
- [34] M.J. Bogusy, E.A. Enazi, H. Hassan, J. Abdel-Jawaad, J.A. Ruwaily, J. Chromatogr. B 850 (2007) 471.
- [35] H. Brozmanová, I. Peřinová, P. Halvová, M. Grundmann, J. Sep. Sci. 33 (2010) 2287.
- [36] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, J. Chromatogr. B 877 (2009) 2198.
- [37] C. Chin, Z.P. Zhang, H.T. Karnes, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 1149.
- [38] E. Klapková, R. Uřinová, R. Průša, Klin Biochem. Metab. 1 (2010) 5 (in Czech).

**9.4 Kacířová I., Grundmann M., Uřinová R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak, Klin Farmakol Farm, 2012; 26(3), 131-134**

Práce je zaměřena na terapeutické monitorování psychofarmak. V případě psychofarmak je názor na zavedení TDM do rutinní praxe stále nejednotný, přesto je doporučováno pravidelné monitorování plazmatických koncentrací nejméně jednou za 3-6 měsíců při udržovací terapii, aby se zabránilo relapsům a opakovaným hospitalizacím. V případě suspektní non-compliance nebo intoxikace je stanovení plazmatické koncentrace obecně uznávaným postupem u všech léčiv a všech skupin pacientů. Na základě empirických zkušeností byly proto definovány 4 stupně doporučení pro TDM psychofarmak.



# Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak

Ivana Kacířová<sup>1</sup>, Milan Grundmann<sup>1</sup>, Romana Uřinová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické farmakologie, LF OU, Ostrava

<sup>2</sup>Oddělení klinické farmakologie, FN Ostrava

Psychická onemocnění významně přispívají k celosvětové morbiditě a mortalitě. Přestože v případě deprese a schizofrenie je efektivní farmakoterapie dostupná, 30–50 % pacientů na léčbu ve standardních dávkách neodpovídá dostatečně a u části pacientů jsou naopak pozorovány závažné vedlejší účinky, což je velkým problémem poškozujícím zdraví jedince a zvyšujícím náklady na léčbu. Hlavním důvodem je značná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů u jednotlivých pacientů, kdy při stejné dávce psychofarmak může dojít k více než 20násobným interindividuálním rozdílům v dosažené ustálené koncentraci, a to v důsledku odlišné schopnosti absorbovat, distribuovat, metabolizovat a vylučovat léky kvůli souběžným onemocněním, věku, pohlaví, kouření, stravovacím návykům, další medikaci nebo genetickým rozdílům. V klinické praxi je snaha stanovit optimální individuální dávku psychofarmaka často řízena strategií pokus-omyl. Vhodným nástrojem k individuální úpravě dávkování psychofarmak je terapeutické monitorování hladin léčiv (TDM), stanovení fenotypu a případně i genotypu léčiva. V případě tricyklických antidepresiv, lithia a antiepileptik používaných z psychiatrické indikace, napomáhá TDM již delší dobu k nalezení dávkovacího optima. U selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu je TDM také doporučováno. Důkazy o statisticky významném vztahu mezi koncentrací léčiv a terapeutickou odezvou chybí u tetracyklických antidepresiv maprotilinu, mianserinu, mirtazapinu a také u trazodonu, reboxetinu a inhibitorů monoaminoxidázy. Význam TDM byl naopak prokázán pro mnohá starší (haloperidol, trifluoperazin a fluphenazin) i novější (zejména klozapin a olanzapin) antipsychotika.

**Klíčová slova:** psychofarmaka, terapeutické monitorování, personalizovaná farmakoterapie.

## General principles of therapeutic monitoring of psychoactive drugs

Psychiatric disorders contribute significantly to worldwide morbidity and mortality. In depression and schizophrenia, effective drug therapy is available, but 30–50 % of all patients do not respond sufficiently to the initial treatment regime. On the other hand, severe side effects from correctly applied drug therapy have been repeatedly shown to be a major problem of drug therapy with considerable health burden and cost. The major reason is the considerable interindividual variability in the pharmacokinetic properties of the patient. At the very same dose of psychotropic drugs, a more than 20-fold interindividual variation in the medication's steady state concentration in the body may result, as patients differ in their ability to absorb, distribute, metabolize and excrete drugs due to concurrent disease, age, gender, smoking or eating habits, concomitant medication or genetic peculiarities. In clinical practice, the effort to determine an individual psychotropic agents drug dose optimum is often guided by a trial-and-error dose titration strategy. A valuable tool for tailoring the dosage of the psychoactive drugs to the individual characteristics of a patient are therapeutic drug monitoring (TDM), phenotyping and if necessary genotyping. With the tricyclic antidepressant drugs, lithium and anticonvulsants used in psychiatry, TDM is a long-established tool for finding the individual dose optimum. For SSRIs, TDM is also recommended. Evidence for a statistically significant relationship between drug concentration and therapeutic outcome is lacking for the tetracyclic antidepressants maprotiline, mianserin and mirtazapine and also for trazodone, reboxetine and the monoamine oxidase inhibitors. Clear evidence of the benefits of TDM has been given for a number of old (haloperidol, trifluoperazine and fluphenazine) and new (especially for clozapine and olanzapine) antipsychotic drugs.

**Key words:** psychoactive drugs, therapeutic monitoring, personalized pharmacotherapy.

Klin Farmakol Farm 2012; 26(3): 131–134

Psychická onemocnění významně přispívají k celosvětové morbiditě a mortalitě. V případě deprese a schizofrenie je efektivní farmakoterapie dostupná, nicméně 30% až 50% pacientů neodpovídá dostatečně na počáteční léčbu. Na druhé straně jsou opakovaně pozorovány závažné vedlejší účinky při standardních dávkách, které jsou velkým problémem poškozujícím zdraví pacienta a zvyšujícím náklady na léčbu (1). Vhodným nástrojem pro individualizovanou úpravu dávkování předepsaných léků u jednotlivých pacientů je terapeutické monitorování hladin léčiv (TDM) (2). Tato metoda využívá stanovení koncentrace

léčiva v krevní plazmě nebo séru k titraci dávky u jednotlivých pacientů tak, aby bylo dosaženo maximální účinnosti s co nejnižším rizikem toxicity. TDM je již dlouhodobě dobře zavedenou metodou u antiepileptik, pro další léčiva používaná v neuropsychiatrii je však jeho rutinní aplikace vzácností. V případě tricyklických antidepresiv (TCA), lithia a antiepileptik používaných z psychiatrické indikace napomáhá TDM již delší dobu k nalezení individuálního dávkovacího optima (3, 4). U tricyklických antidepresiv TDM nejenže zvyšuje účinnost a bezpečnost, ale také snižuje náklady na léčbu deprese (5, 6). TDM redukuje riziko in-

toxikace TCA a u mnohých byla také prokázána závislost klinického efektu na plazmatické koncentraci. V případě **selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)** je TDM v klinické praxi také doporučováno, i když toxicita tohoto typu antidepresiv je nízká ve srovnání s většinou předchozích antidepresiv. Nicméně u citalopramu bylo prokázáno, že plazmatická koncentrace naměřená 7. den po zahájení léčby je prediktivní pro pozdější špatnou odpověď. Pacienti vykazující plazmatické koncentrace citalopramu pod 50 ng/ml měli výrazně menší zlepšení podle Hamiltonovy stupnice hodnocení deprese (7). Údaje ze Švédska

ukázaly, že TDM SSRI je cenově výhodné u starších pacientů, kde pomůže k použití minimální efektivní dávky (8). Důkazy o statisticky významném vztahu mezi koncentrací léčiva a terapeutickou odezvou chybí u **tetracyklických antidepresiv** maprotilinu, mianserinu a mirtazapinu a také u **trazodonu a reboxetinu**, a u **inhibitorů monoaminoxidázy** moklobemidu a tranilcyprominu (9). U **typických antipsychotik** haloperidolu, trifluoperazinu a fluphenazinu byla prokázána signifikantní korelace mezi plazmatickou koncentrací a terapeutickým účinkem (10). O významu TDM u **atypických antipsychotik** se stále vedou diskuze, nicméně se objevuje stále více důkazů, že tato metoda může zlepšit účinnost, a to zejména u pacientů, kteří neodpovídají na terapeutické dávky nebo vykazují nežádoucí účinky (11). U psychofarmak **typu stabilizátorů nálady a antimanik** je TDM důrazně doporučováno, poněvadž jsou dobře definovány terapeutické referenční rozmezí i toxické hladiny (9).

Hlavním důvodem využití TDM u psychofarmak je značná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů u jednotlivých pacientů. Aby mohlo léčivo uplatnit svůj terapeutický účinek, musí dosáhnout dostatečné koncentrace v místě svého působení, což závisí pouze na podané dávce. Naopak, při stejné dávce psychofarmak může dojít k více než 20násobným interindividuálním rozdílům v dosažené ustálené koncentraci, a to v důsledku odlišné schopnosti pacientů absorbovat, distribuovat, metabolizovat a vylučovat léky kvůli souběžným onemocněním, věku, pohlaví,

kouření, stravovacím návykům, další medikaci nebo genetickým rozdíly. Odlišné lékové formy stejného léčiva mohou také ovlivnit míru a dobu absorpce, a tím i jeho koncentraci v těle. Nedávné výzkumy ukazují, že i P-glykoprotein ve střevní sliznici a hematoencefalické bariéry mozku má významnou roli ve farmakokinetické variabilitě psychofarmak (12). Studie na zvířatech dokumentují, že plazmatická koncentrace psychotropních léčiv koreluje s koncentrací v jejich cílovém orgánu, v mozku. Byla nalezena jednoznačná závislost mezi plazmatickou koncentrací antidepresiv a antipsychotik a obsazováním dopaminových receptorů nebo míst zpětného vstřebávání serotoninu v mozku pomocí pozitronové emisní tomografie. Monitorování koncentrací psychofarmak v plazmě je proto užitečné pro nastavení dávky k dosažení optimální receptorové blokády (9, 13).

Skupina TDM z „Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie“ (AGNP) opakovaně publikuje doporučené postupy vycházející z odborné literatury pro optimální využití TDM v psychiatrii (9). TDM je založeno na předpokladu, že existuje vztah mezi plazmatickými koncentracemi a klinickými účinky (terapeutické zlepšení, vedlejší účinky a nežádoucí účinky). Dále se předpokládá, že existuje plazmatická koncentrace léčiva, která se vyznačuje maximální účinností a maximální bezpečností, tzv. „terapeutické okno“ nebo „terapeutické referenční rozmezí“, které lze definovat jako rozmezí koncentrací, které jsou určeny dolní mezí, pod kterou je vyvolán té-

rapeutické odpovědi léku nepravděpodobné, a horní mezí, nad kterou se snižuje tolerance nebo se již terapeutické zlepšení nepředpokládá. Toto „terapeutické referenční rozmezí“ je orientační, založené na populaci a nemusí být použitelné pro všechny pacienty. Někteří pacienti mohou vykazovat optimální terapeutickou odpověď při nižší koncentraci léčiva, která se liší od „terapeutického referenčního rozmezí“. Terapie psychofarmaky může být u daného pacienta nejlépe nastavena na základě jeho „individuální terapeutické koncentrace“ (14, 15). Mnoho psychofarmak je používáno pro několik různých indikací (např. antidepresiva jsou používána také k léčbě úzkosti), nicméně informací o optimálních plazmatických koncentracích v těchto indikacích je nedostatek a referenční rozmezí jsou obecně uváděna pouze pro primární indikaci. Uváděny jsou také tzv. „laboratorní varovné hladiny“ označující koncentrace léčiva nad doporučené referenční rozmezí, při kterých by pracovníci provádějící TDM měli ihned informovat ošetřujícího lékaře. Tyto varovné hladiny jsou založeny na hlášených intolerancích nebo intoxikacích a na měřeních plazmatických koncentrací. Ve většině případů však byly pouze definovány jako 2krát vyšší plazmatické koncentrace než je uváděná horní hranice „terapeutického referenčního rozmezí“. Upozornění by mělo vést ke snížení dávky, pokud pacient vyazuje známky toxicity nebo intolerance. Jestliže je však vysoká koncentrace léčiva pacientem dobře tolerována a pokud by snížení dávky vedlo ke zhoršení příznaků, měla by dávka zůstat nezměněna (9).

**Tabulka 1a.** Stupně doporučení pro TDM psychofarmak (9)

Stupeň 1: „Strongly recommended“
<p><b>Důkazy:</b> Uváděné koncentrace léčiv jsou prokázány a stanovují terapeutické referenční rozmezí. Kontrolované klinické studie prokázaly přínos TDM a informovaly o snížené tolerabilitě nebo intoxikaci.</p> <p><b>Doporučení:</b> TDM je důrazně doporučováno pro titraci dávky a speciální indikace. V případě lithia by TDM mělo být běžně prováděno.</p> <p><b>Klinické důsledky:</b> Při „terapeutické“ plazmatické koncentraci je nejvyšší pravděpodobnost odpovědi nebo remise; při „subterapeutických“ plazmatických koncentracích je míra odpovědi při akutní léčbě srovnatelná s placebem stejně jako riziko relapsu při dlouhodobé léčbě; při „supraterapeutických“ plazmatických koncentracích hrozí riziko intolerance nebo intoxikace.</p>
Stupeň 2: „Recommended“
<p><b>Důkazy:</b> Uváděné koncentrace léčiv byly získány z plazmatických koncentrací při terapeuticky účinných dávkách a se vztahem ke klinickým účinkům; informují o snížené tolerabilitě nebo intoxikaci při „supraterapeutických“ plazmatických koncentracích.</p> <p><b>Doporučení:</b> TDM je doporučováno pro titraci dávky a u speciálních indikací nebo při řešení problémů.</p> <p><b>Klinické důsledky:</b> TDM zvýší pravděpodobnost odpovědi u non-respondérů. Při „subterapeutických“ koncentracích je riziko špatné odpovědi; při „supraterapeutických“ koncentracích hrozí riziko intolerance nebo intoxikace.</p>
Stupeň 3: „Useful“
<p><b>Důkazy:</b> Uváděné koncentrace léčiv byly vypočteny z plazmatických koncentrací při účinných dávkách získaných z farmakokinetických studií. Plazmatické koncentrace spojené s farmakodynamickým účinkem buď nejsou dosud k dispozici, nebo vycházejí z retrospektivní analýzy dat TDM, jednotlivých kazuistik nebo nesystematických klinických zkušeností.</p> <p><b>Doporučení:</b> TDM je užitečné pro speciální indikace nebo pro řešení problémů.</p> <p><b>Klinické důsledky:</b> TDM může být použito ke kontrole, zda plazmatické koncentrace odpovídají dané dávce, nebo v případě, kdy klinické zlepšení může být dosaženo zvýšením dávky u non-respondérů, kteří mají příliš nízké koncentrace v plazmě.</p>
Stupeň 4: „Potentially useful“
<p><b>Důkazy:</b> Plazmatické koncentrace nekorelují s klinickým účinkem z důvodu unikátních farmakologických vlastností léčiva, jako je např. ireverzibilní blokáda enzymu, nebo když lze dávkování snadno upravit podle klinických příznaků (např. spánek vyvolaný hypnotiky).</p> <p><b>Doporučení:</b> TDM není doporučováno pro titraci dávky, ale může být potenciálně vhodné pro speciální indikace nebo při řešení problémů.</p> <p><b>Klinické důsledky:</b> TDM by mělo být omezeno pro speciální indikace.</p>

**Tabulka 1b.** Stupně doporučení pro TDM psychofarmak (9)

	stupeň 1	stupeň 2	stupeň 3	stupeň 4
<b>antidepressiva</b>	amitriptylin, imipramin, klomipramin, nortriptylin	citalopram, desipramin, dosulepin, doxepin, duloxetin, escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, maprotilin, mirtazapin, sertralin, trazodon, trimipramin, venlafaxin	bupropion, mianserin, moklobemid, paroxetin, reboxetin	agomelatin, tranlycypromin
<b>antipsychotika</b>	amisulprid, klozapin, flufenazin, haloperidol, olanzapin, perazin, perfenazin, tioridazin	aripirazol, bromperidol, chlorpromazin, flupentixol, fluspirilen, paliperidon, quetiapin, risperidon, sertindol, sulpirid, ziprasidon	benperidol, chlorprotixen, iloperidon, levomepromazin, melperon, pimozid, pipamperon, zotepin, zyklopentixol	asenapin, protipendyl
<b>stabilizátory nálady</b>	lithium	karbamazepin, lamotrigin, kyselina valproová		
<b>antiepileptika</b>	fenobarbital, fenytoin	karbamazepin, klobazam, klonazepam, etosuximid, felbamát, lamotrigin, levetiracetam, metsuximid, oxkarbazepin, primidon, rufinamid, spiripentol, sultiam, tiagabin, kyselina valproová, zonisamid	gabapentin, pregabalin, topiramát	vigabatrin
<b>anxiolytika/hypnotika</b>			buspiron, opipramol, pregabalin	alprazolam, bromazepam, brotizolam, chlordiazepoxid, klonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nitrazepam, nordazepam, oxazepam, temazepam, triazolam, zolpidem, zopiklon
<b>léčba demence</b>		donepezil	galantamin, memantin, rivastigmin	
<b>léčba závislosti</b>		buprenorfin, bupropion, levomefandol, metadon, naltrexon	akamprosat, disulfiram, vareniklin	klometiazol
<b>antiparkinsonika</b>			amantadin, biperiden, bornaprin, bromokriptin, kabergolin, karbidopa, levodopa, entakapon, pramipexol, ropinirol, tiaprid, tolkapon	
<b>ostatní</b>		dexmetylfenidat, metylfenidat	atomoxetin, modafinil	

TDM je výhodné, protože je to objektivní metoda, která ukáže ošetřujícímu lékaři, zda se léčivo nachází v organizmu v koncentraci, která je potenciálně dostačující pro očekávanou klinickou odpověď. Odchylky od očekávaného referenčního rozmezí závislého na dávce ukazují na pacientovu compliance nebo na odlišný rozsah metabolismu léčiva. V biotransformaci psychofarmak hrají velmi důležitou roli formy cytochromu P450, jako jsou CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 a 3A4/5. Status pomalého metabolizátora (PM) zvyšuje riziko nežádoucích účinků, zatímco status velmi rychlého metabolizátora (UM) způsobuje vyšší riziko nedostatečného účinku v důsledku subterapeutické plazmatické koncentrace (16). Současné stanovení metabolitů je způsob, jak zjistit fenotyp pacienta, to jest současný metabolický stav (tzv. „state marker“), který zahrnuje účinek stravy, kouření, současné choroby, souběžně užívaná léčiva a genetickou predispozici. Genotyp je nazýván jako „trait marker“, který není ovlivněn zevními faktory a zůstává stejný v průběhu celého života. U řady psychofarmak metabolity aktivně přispívají k celkovému klinickému účinku mateřské látky. Z tohoto důvodu musí TDM obsahovat také kvantifikaci aktivních metabolitů, např. u klomipr-

aminu (norklomipramin), fluoxetinu (norfluoxetin) nebo risperidonu (9-hydroxyrisperidon). Stanovení metabolitů farmakologicky aktivních i neaktivních umožňuje také stanovení fenotypu pacienta (17, 18). Ke zjištění fenotypu je možno použít také modelových látek jako je kofein pro CYP1A2, omeprazol pro CYP2C19, dextrometorfan nebo metoprolol pro CYP2D6, nebo midazolam pro CYP3A4/5 (2, 9). Porovnáním získaných a předpokládaných časově závislých plazmatických koncentrací po odběru několika krevních vzorků v průběhu dne můžeme rozlišit, zda nízká plazmatická koncentrace je výsledkem snížené dostupnosti, zvýšené biodegradace nebo špatné compliance. TDM je doporučováno také v případě potvrzeného abnormálního genotypu cytochromu P450, protože genotypizace odhadne pouze přibližně do jaké míry mohou být plazmatické koncentrace u daného pacienta změněny. U genotypicky pomalého nebo naopak ultrarychlého metabolizátora by neměl být lék automaticky nahrazen jiným, ale často může být dávka upravena pomocí klinického posouzení a TDM (9). Klinický význam genetického polymorfizmu systému UDP-glukuronosyltransferázy a P-glykoproteinu nebyl zatím jednoznačně stanoven (9, 16).

AGNP doporučuje pravidelné monitorování plazmatických koncentrací nejméně jednou za 3–6 měsíců při udržovací terapii, aby se zabránilo relapsům a opakovaným hospitalizacím. Četnost požadavků na TDM může být zvýšena v případě podezření na non-compliance nebo při změně současně užívané medikace nebo kouření, které ovlivňují farmakokinetiku léčiva. Měří se celkové koncentrace psychofarmak, přičemž koncentrace získané ze séra nebo z plazmy jsou zaměnitelné. Doporučen je odběr úrodních (minimálních) hladin v ustáleném stavu, což je nejméně po 4 eliminačních poločasech od zahájení nebo po změně dávkování, a to během terminální beta-eliminační fáze. U většiny psychofarmak se eliminační poločas pohybuje v rozmezí 12–36 h. Významnou výjimkou je trazodon a venlafaxin, které vykazují eliminační poločas přibližně 6 hodin, fluoxetin má naopak eliminační poločas výrazně delší. V klinické praxi je u většiny psychofarmak vhodná doba odběru za jeden týden užívání stabilní denní dávky, a to těsně před užitím ranní dávky, což je obvykle 12–16 h (nebo 24 h, pokud je lék podáván jednou denně ráno) po poslední dávce. TDM je samozřejmě možné provést kdykoliv po užití léku, jestliže

**Tabulka 2.** Indikace TDM v psychiatrii (9)

- Optimalizace dávkování po začátku léčby nebo po změně dávky
- Léky, u nichž je povinné TDM z bezpečnostních důvodů (např. lithium)
- Podezření na úplnou nebo částečnou non-compliance pacienta
- Nedostatečné klinické zlepšení při obecně doporučených dávkách
- Nežádoucí účinky při obecně doporučených dávkách
- Kombinace s léky se známým interakčním potenciálem nebo podezření na lékovou interakci
- TDM u farmakovigilančních programů
- Prevence relapsu při udržovací léčbě
- Recidiva při adekvátním dávkování
- Přítomnost genetické změny týkající se lékového metabolismu (deficit nebo zmnožení genu)
- Těhotenství nebo kojení
- Děti a dospívající pacienti
- Starší pacient (> 65 let)
- Jedinci s mentálním postižením
- Pacienti s přidruženým onemocněním ovlivňujícím farmakokinetiku (jaterní nebo renální insuficience, kardiovaskulární onemocnění)
- Změny farmakokinetiky u pacientů s poruchou příjmu potravy (mentální anorexie, bulimie)
- Forenzní důvody
- Problémy vyskytující se po převedení z originálního přípravku na generikum (a naopak)
- Problémy vyskytující se po převedení z perorální na depotní injekční formu (a naopak)
- Nonlineární kinetika v rozmezí terapeutických dávek (např. fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin)

se objeví neočekávané vedlejší účinky. Není nutné měřit pouze údolní (minimální) hladiny, dávkovací schéma by však mělo být na žádance uvedeno kvůli interpretaci. Pro efektivní TDM je zásadním předpokladem dostupnost vhodných analytických metod, které produkují výsledky v přiměřené době (tzn. do 48 h), a doporučení klinického farmakologa. TDM by mělo být požadováno, jestliže je zřejmé, že výsledek poskytne odpověď na konkrétní otázku, přičemž pro vyřešení daného problému je jedno měření často nedostatečné. Například, série měření ve vhodných intervalech může být požadována k objasnění, zda nízká koncentrace je výsledkem špatné compliance, snížené biologické dostupnosti nebo abnormálně rychlé eliminace. Požadavek na TDM musí obsahovat řádně vyplněnou žádanku, která je nezbytná pro správné změření koncentrace léčiva a adekvátní interpretaci výsledků. Žádanka by měla obsahovat jméno pacienta, demografické údaje, diagnózu, ostatní užívané léky, důvod k vyšetření, název léku a jeho dávkování, formu léku, dobu poslední změny dávky a čas odběru krve. Interpretace výsledku a farmakologické doporučení by měly být součástí každé zprávy, plazmatická koncentrace však musí být interpretována ve vztahu ke klinickému stavu. Výsledek TDM je vodítkem ke správnému dávkování u jednotlivých pacientů. Je zcela nezbytné si uvědomit, že optimální TDM je interdisciplinární obor, který vyžaduje úzkou spolupráci analytika, klinického farmakologa a klinika (2, 9).

Využití TDM závisí na klinické situaci a konkrétním léčivu. V případě suspektní non-compliance nebo intoxikace je stanovení plazmatické koncentrace obecně uznávaným postupem u všech léčiv a všech skupin pacientů. Nicméně, v případě psychofarmak je názor na zavedení TDM do rutinní praxe stále nejednotný. Na základě empirických

zkušeností byly proto definovány 4 stupně doporučení pro TDM psychofarmak (9) (tabulka 1a, b). Monitorování hladin v léčbě psychických chorob zatím není do rutinní praxe zavedeno, přestože se subterapeutické nebo toxické plazmatické koncentrace psychofarmak mohou objevit i při standardním dávkování z důvodu interindividuální variability farmakokinetických vlastností jednotlivých pacientů. Terapeutické monitorování může být v klinické praxi využito k personalizované farmakoterapii, to jest k optimalizaci dávkování psychofarmak u každého jednotlivého pacienta. Napomáhá k maximalizaci účinnosti a prevenci toxicity, a to zejména u jedinců, kteří při standardním dávkování nereagují na léčbu nebo mají nežádoucí reakce. TDM je v současné době také nejpřesnější metodou sledování compliance. Nedostačující compliance u nemocných s psychickou poruchou je častější než u somaticky nemocných. Zvýšení compliance má za následek zlepšení prognózy, snížení počtu hospitalizací a z toho plynoucí snížení nákladů. Strategie zvyšující compliance tak v sobě nesou kromě snížení osobního utrpení a záteže rodiny také velký potenciál ekonomický (19). Využití TDM v psychiatrii proto zvyšuje účinek léčby a snižuje náklady, a to především tehdy, pokud je prováděno erudovaným klinickým farmakologem (20). V klinické praxi je však snaha stanovit optimální individuální dávku psychofarmaka často řízena strategií pokusu a omylu. Nedostatečné využití TDM v psychiatrii ukazuje potřebu zvyšování edukace psychiatrů a klinických farmakologů o úloze TDM psychofarmak (21).

Závěrem lze říci, že TDM je spolehlivou pomůckou sonalizované farmakoterapie, také v psychiatrii. Pokud je adekvátně používáno, může pomoci mnoha psychiatrickým pacientům v mnoha situacích (9, 13) (tabulka 2).

**Literatura**

1. Steimer W. Pharmacogenetics and psychoactive drug therapy: Ready for the patient? *Ther Drug Monit* 2010; 32: 381–386.
2. Grundmann M, Kacířová I. Significance of TDM, phenotyping and genotyping for the correct drug dosage. *Čas Lék čes* 2010; 149: 482–487.
3. APA Task Force. Tricyclic antidepressants – blood level measurements and clinical outcome: an APA Task Force Report. *Am J Psychiatry* 1985; 142: 155–162.
4. Glassman AH. Antidepressant plasma levels revisited. *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9(Suppl. 2): 25–30.
5. Simmons SA, Perry PJ, Rickert ED, Browne JL. Costbenefit analysis of prospective pharmacokinetic dosing of nortriptyline in depressed inpatients. *J Affect Disord* 1985; 8: 47–53.
6. Preskorn SH, Fast GA. Therapeutic drug monitoring for anti-depressants: efficacy, safety and cost-effectiveness. *J Clin Psychiatry* 1991; 52(Suppl. 6): 23–33.
7. Haji EO, Tadić A, Wagner S, et al. Association between citalopram serum levels and clinical improvement of patients with major depression. *J Clin Psychopharmacol* 2011; 31: 281–286.
8. Lundmark J, Bengtsson F, Nordin C, et al. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr Scand* 2000; 101: 354–359.
9. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44: 195–235.
10. Perry PJ. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics. Is it of potential clinical value? *CNS Drugs* 2000; 13: 167–171.
11. Mauri MC, Volonteri LS, Colasanti A, et al. Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics. A critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 359–388.
12. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 13–25.
13. Hiemke Ch. Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: does it hold its promises? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008; 258(Suppl. 1): 21–27.
14. Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. TDM "nouveau". *Ther Drug Monit* 2004; 26: 145–151.
15. Preskorn SH. Patients who do not respond to the "usual" dose: why Terry fell off the dose-response curve. *J Psychiatr Pract* 2009; 15: 460–466.
16. Baumann P, Ulrich S, Eckermann G, et al. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 2005; 7: 231–247.
17. Caccia S, Garattini S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic significance of antidepressant drug metabolites. *Pharmacol Res* 1992; 26: 317–329.
18. Rudorfer V, Potter WZ. The role of metabolites of antidepressants in the treatment of depression. *CNS Drugs* 1997; 7: 273–312.
19. Češková E. Compliance v psychiatrii. *Čas Lék čes* 2009; 148: 489–492.
20. Eilers R. Therapeutic Drug Monitoring for the Treatment of Psychiatric Disorders: Clinical Use and Cost Effectiveness. *Clinical Pharmacokinetics* 1995; 29: 442–450.
21. Mitchell PB. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49: 303–312.

Článek přijat redakcí: 6. 8. 2012  
Článek přijat k publikaci: 20. 9. 2012

**MUDr. Ivana Kacířová, Ph.D.**

Ústav klinické farmakologie  
Lékařská fakulta Ostravská univerzity  
Syllabova 19, 703 00 Ostrava  
ivana.kacirova@fno.cz

**9.5 Grundmann M., Uřinová R., Šilhán P., Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem-  
využití TDM, fenotypizace a genotypizace, Klin Farmakol Farm. 2012; 90-92**

Jedná se o kazuistiku popisující intoxikaci pacientky léčené pro těžkou depresivní poruchu s psychotickými příznaky. Pacientka užila neurčité množství venlafaxinu, mianserinu, klonazepamu a olanzapinu. Při příjmu byla změřena hladina venlafaxinu 2638 ng/ml, po snížení dávky na 75mg/den bylo dosaženo terapeutického rozmezí. Poměr O-desmethylvenlafaxin/venlafaxin mezi 0.005 a 0.016 naznačil, že se může jednat o pomalého metabolizátora. Genetickým vyšetřením byla zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 \*5/\*5 a potvrdilo, že se jedná o pomalého metabolizátora. V rutinní praxi zatím nejsou běžně stanovovány hladiny venlafaxinu a jeho metabolitů. Poměr metabolitu k jeho mateřské látce nám umožnil zachytit případnou odchylku v metabolismu léčiva, která pak následně může byla potvrzena stanovením genotypu příslušného enzymu. Terapeutické monitorování hladin tak přispívá k optimalizaci farmakoterapie také v případě psychofarmak.

# Intoxikace venlafaxinem – využití TDM, fenotypizace a genotypizace

Milan Grundmann<sup>1</sup>, Romana Uřínovská<sup>2</sup>, Petr Šilhán<sup>3</sup>, Ivana Kacířová<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava

<sup>2</sup>Oddělení klinické farmakologie, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>3</sup>Oddělení psychiatrické, Fakultní nemocnice Ostrava

**Úvod:** Antidepresivum venlafaxin patří mezi inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Primárně je metabolizován CYP2D6 na aktivní metabolit O-desmethylvenlafaxin a CYP3A4 na N-desmethylvenlafaxin. Pro poměr O-desmethylvenlafaxin/venlafaxin je uváděno u rychlých a intermediálních metabolizátorů rozmezí 0,3–5,2.

**Metoda:** Kazuistika popisuje případ intoxikace u pacientky (41 let) léčené v psychiatrické ambulanci pro periodickou depresivní poruchu a těžkou smíšenou poruchu osobnosti terapií: venlafaxin 150 mg/den, klonazepam 1 mg/den, mianserin 60 mg/den a olanzapin 20 mg/den. Pacientka doma užila neurčitě množství venlafaxinu, mianserinu, klonazepamu a olanzapinu. TDM použitých psychofarmak metodou LC-MS/MS bylo při příjmu i v průběhu hospitalizace použito ke stanovení fenotypu a pro srovnání s genotypem CYP2D6.

**Výsledky:** Při příjmu byla změřena hladina venlafaxinu 2 638 ng/ml, po snížení dávky na 75 mg/den bylo dosaženo terapeutického rozmezí. Poměr O-desmethylvenlafaxin/venlafaxin mezi 0,005 a 0,016 stanovil pacientku jako pomalého metabolizátora. Genetické vyšetření, při kterém byla zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 \*5/\*5, vysvětlilo tento fenotyp.

**Závěr:** V rutinní praxi zatím nejsou běžně stanovovány hladiny venlafaxinu a jeho metabolitů. Poměr metabolitu k jeho mateřské látce nám umožňuje zachytit případnou odchylku v metabolismu léčiva, která pak následně může být potvrzena stanovením genotypu příslušného enzymu. Terapeutické monitorování hladin tak přispívá k optimalizaci farmakoterapie také v případě psychofarmak.

**Klíčová slova:** venlafaxin, intoxikace, TDM, fenotyp, genotyp.

## Venlafaxine intoxication – importance of TDM, phenotyping and genotyping

**Introduction:** Antidepressive drug venlafaxine belongs to the serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. It is primary metabolized by CYP2D6 to its active metabolite O-desmethylvenlafaxine and by CYP3A4 to N-desmethylvenlafaxine. The range 0.3–5.2 for O-desmethylvenlafaxine/venlafaxine ratio was estimated for extensive and intermediate metabolizers.

**Method:** There is described intoxication of woman (41 years) treated by combination therapy venlafaxine 150 mg/day, mianserine 60 mg/day, clonazepam 1 mg/day and olanzapine 10 mg/day. Patient was administered at home an indefinite amount of these psychofarmacs. TDM of these substances was provided using LC-MS/MS method to estimate phenotype of venlafaxine and to compare with genotype.

**Results:** On admission toxic plasma level of venlafaxine was found (2 638 ng/mL) and after reduction of the dose to 75 mg/day plasma level was estimated in therapeutic range. The ratio O-desmethylvenlafaxine/venlafaxine was estimated between 0.005 and 0.016 showing poor metabolizer. Genetic examination detected homozygotes deletion of the gene CYP2D6 \*5/\*5 and explained phenotype.

**Conclusion:** The ratio of the metabolite to the parent substance (phenotype) allows us to detect any deviation in the metabolism of drugs which can be subsequently explained by determination of genotype. Therapeutic drug monitoring contributes to the optimization of pharmacotherapy in the case of psychotropic drugs.

**Key words:** venlafaxine, intoxication, TDM, phenotype, genotype.

Klin Farmakol Farm 2012; 26(2): 90–92

## Úvod

Venlafaxin (VEN), inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, patří mezi novější antidepresiva. Je indikován k léčbě a prevenci těžkých depresivních epizod a k léčbě generalizované úzkostné poruchy, sociální úzkostné poruchy a panické poruchy s/nebo bez agorafobie (1). Primárně je venlafaxin metabolizován CYP2D6 na aktivní metabolit O-desmethylvenlafaxin (ODV) a prostřednictvím CYP3A4 na neaktivní N-desmethylvenlafaxin (NDV) (2). Pro poměr ODV/VEN, určujících fenotyp pacienta, je u rychlých a intermediálních meta-

bolizátorů uváděno rozmezí 0,3–5,2 a pro poměr NDV/VEN 0,46–1,48 (3). Doporučené terapeutické referenční rozmezí součtu VEN+ODV se pohybuje mezi 100–400 ng/ml, jako nebezpečné hladiny jsou uváděny hodnoty 800 ng/ml a vyšší (3). VEN je však antidepresivum, u kterého byl nalezen vysoký index fatální toxicity, což jest poměr počtu úmrtí ve vztahu k jeho spotřebě (4).

## Metoda

Popis případu: Pacientka (41 let, hmotnost 72 kg, výška 160 cm, BMI 28,1) byla dlouhodobě léčena v psychiatrické ambulanci pro perio-

dickou depresivní poruchu a těžkou smíšenou poruchu osobnosti terapií: venlafaxin (Olvexya) 150 mg 1–0–0 tbl., klonazepam (Rivotril) 0,5 mg 1–0–1 tbl., mianserin (Miabene) 30 mg 1–0–1 tbl. a olanzapin (Zyprexa) 10 mg 0–0–1 tbl.

Dne 12. 10. 2011 byla přijata na interní oddělení pro podezření z intoxikace s krevním tlakem 110/70 mmHg a pulzovou frekvencí 98/min, stěžovala si na velkou únavnost, útlum, nespavost, nechutenství a pokles hmotnosti (za 3 měsíce zhubla 12 kg). Popisovala též zhoršení nálady trvající 3 měsíce. Uvedla, že před příjmem vzhledem k přetrvávající nespavosti

**Tabulka 1.** Laboratorní výsledky – biochemie séra

analyt	12. 10. 2011	24. 10. 2011	31. 10. 2011
natrium	137 mmol/l		
kaliium	3,7 mmol/l	4,2 mmol/l	
kreatinin	62 umol/l	74 umol/l	
bilirubin celkový		6,5 umol/l	4,8 umol/l
ALT	1,09 ukat/l	0,62 ukat/l	0,61 ukat/l
AST	1,48 ukat/l	0,55 ukat/l	0,48 ukat/l
ALP		1,39 ukat/l	1,33 ukat/l
GMT	9,7 ukat/l	4,09 ukat/l	2,99 ukat/l
glukóza	5,8 mmo/l	4,32 mmo/l	
celkový cholesterol		9,06 mmol/l	

**Tabulka 2.** Sérové koncentrace venlafaxinu (VEN) a jeho metabolitů O-desmethylvenlafaxin u (ODV) a N-desmethylvenlafaxin u (NDV); stanovení fenotypu

den odběru; dávka	čas odběru	VEN (ng/ml)	ODV (ng/ml)	ODV/VEN	NDV (ng/ml)	NDV/VEN
24. 10. 2011 (150 mg/d)	při příjmu	2638	20,6	0,008	731	0,28
28. 10. 2011 (150 mg/d)	před užitím	1106	7,6	0,007	299	0,27
	2 hod po užití	1228	6,7	0,005	301	0,25
	6 hod po užití	977	7,7	0,008	292	0,30
31. 10. 2011 (150 mg/d)	před užitím	1054	12,8	0,012	260	0,25
	2 hod po užití	767	12,6	0,016	241	0,31
	6 hod po užití	1026	11,7	0,009	238	0,23
8. 11. 2011 (75 mg/d)	před užitím	364	2,1	0,006	83	0,23
	6 hod po užití	434	2,4	0,006	73	0,17

**Tabulka 3.** Stanovení fenotypu pomocí sérové koncentrace modelové látky metoprololu

čas (hod)	pulz / min	krvni tlak (mmHg)	metoprolol (ng/ml)	hydroxymetoprolol (ng/ml)	hydroxymetoprolol/metoprolol
před	65	154/96	-	-	-
8:54	<b>Podání: metoprolol (Betaloc SR 200 mg ½ tbl).</b>				
1hod po	59	158/100	65,8	0	-
2hod po	50	148/98	77,6	0	-
3hod po	54	160/96	98,1	0	-

užila navíc 6 tbl. Rivotrilu a 4 tbl. Miabene, aby lépe spala. Pokus o suicidium odmítla. V průběhu hospitalizace byla vyšetřena psychiatrem, který zvýšil dávkování na Zyprexa 10 mg 1–0–1 tbl. Pacientka byla za 2 dny propuštěna se závěry: stav po akutní intoxikaci antidepresivy, těžká depresivní fáze s psychotickými příznaky, porucha osobnosti těžká smíšená, navíc kolonoskopicky zjištěny vnitřní hemoroidy 2. stupně s krvácením v anamnéze a klidné divertiky sigmatu. V laboratorním nálezu byly zvýšeny jaterní testy GMT až na 9,7 ukat/l. Pacientka byla propuštěna též proto, že měla být dne 24. 10. 2011 plánovaně hospitalizována na lůžkovém psychiatrickém oddělení pro nedostatečnou terapeutickou odpověď. Při přijetí na psychiatrické oddělení byla pacientka lucidní, orientovaná, odpovědi přiléhavé, v popředí depresivní nálada bez psycho-

tických příznaků. Krevní tlak (TK) 140/90 mmHg, pulz 68/min, fyzikálně vše v normě. Subjektivně si kromě dříve uvedených příznaků stěžovala na bolest hlavy.

Přijata s diagnózami:

- rekurentní depresivní porucha, středně těžká fáze
- těžká smíšená porucha osobnosti s rysy emočně nestabilními, vyhubými a závislými
- suspektní abúzus alkoholu
- stav po intoxikaci antidepresivy
- stav po hysterektomii s následnou ureteroplastikou

Po příjmu na psychiatrii byly provedeny laboratorní vyšetření, včetně stanovení hladiny venlafaxinu a jeho dvou metabolitů ODV a NDV, olanzapinu a klonazepamu. Dávka olanzapinu

byla snížena na polovinu, dávka klonazepamu byla zvýšena o 50 %, dávka venlafaxinu zůstala stejná. Navíc byl přidán Flavobion 1–1–1 tbl.

Hladiny venlafaxinu, ODV, NDV, olanzapinu a klonazepamu byly měřeny metodou LC-MS/MS (5). Fenotyp byl stanoven jednak z poměru ODV/VEN, jednak použitím modelové látky betablokátoru metoprololu, používaného pro zjištění aktivity CYP2D6 stanovením poměru alfa-hydroxymetoprolol/metoprolol metodou HPLC (6). Genotyp CYP2D6 byl stanoven jako rutinní vyšetření v laboratoři Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Ostrava metodou analýzy křívek tání na přístroji LightCycler ver. 1.5 (f. Roche).

## Výsledky

Z laboratorních nálezů jsou nápadně zvýšené hodnoty jaterních testů, zejména GMT s tendencí k normalizaci, a vysoká hodnota celkového cholesterolu (tabulka 1).

Při přijetí byla hladina venlafaxinu 2638 ng/ml, vysoce překračující doporučené rozmezí 100–400 ng/ml, fenotypicky byla pacientka zařazena mezi pomalé metabolizátory (PM), protože metabolitu bylo méně než 1 %. Za 4 dny při kontrolovaném podávání medikace klesla hladina více než o polovinu, ale byla neustále v potenciálně toxickém rozmezí. Proto bylo doporučeno snížení dávky venlafaxinu na 75 mg/den, tedy na polovinu. Kontrola za další 3 dny ukázala stejně vysoké hladiny VEN bez úpravy podávané dávky, znovu bylo doporučení snížení dávky na 75 mg/den. K tomu došlo 5. 11. 2011 a za další 3 dny byly již hladiny v normě a došlo k výraznému zlepšení subjektivních obtíží pacientky (tabulka 2). Status pacientky jako PM byl potvrzen i při podání modelové látky metoprololu, jehož metabolit alfa-hydroxymetoprolol vzniká působením CYP2D6, a po jednorázovém podání nebyl vůbec nalezen (tabulka 3).

Hladiny olanzapinu se při aplikaci obou dávek nalézaly v terapeutickém optimu, hladiny klonazepamu pod dolní hranici terapeutického rozmezí (tabulka 4).

**Genotyp:** V DNA pacientky byla zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 (alelická varianta \*5/\*5). Pacientka je pomalým metabolizátorem (PM).

## Průběh

U pacientky byly nalezeny vysoké koncentrace VEN zhruba 5x přesahující terapeutické rozmezí a 3x nebezpečnou koncentraci. Naopak koncentrace hlavního metabolitu zprostředkovaného metabolizací cytochromem P4502D6 byly téměř nulové, což potvrdilo i vyšetření mode-

**Tabulka 4.** Sérové koncentrace olanzapinu a klonazepamu za 12 hodin po užití (ng/ml)

	24. 10. 2011	28. 10. 2011	31. 10. 2011	8. 11. 2011
olanzapin (10 mg/den)	43,8*	31,3	24,6	20,5
klonazepam (1,5 mg/den)	9,1	7,0	10,1	-
*olanzapin 20 mg/den				

lovou látkou metoprololem. Klasifikace pacientky jako pomalého metabolizátoru CYP2D6 pomocí stanovení fenotypu bylo vysvětleno genetickým vyšetřením. Pacientce byla snížena dávka VEN na polovinu a za 14 dní se jeho hladina dostala do terapeutického rozmezí. Příznaky únavy, útlumu, bolestí hlavy a nespavosti vymizely, zlepšila se i nálada pacientky, došlo k částečné úpravě zvýšených jaterních testů. Jako vedlejší nálezy byla zjištěna hypercholesterolemie a hypertenze s doporučením dalšího řešení této problematiky.

## Diskuze

Venlafaxin patří mezi nová antidepresiva, která jsou metabolizována CYP2D6. Tento enzym metabolizuje přibližně 25 % klinicky užívaných léčiv, avšak vykazuje velký genetický polymorfismus. Stanovení třech nejčastěji se vyskytujících PM alel (CYP2D6\*3, \*4 a \*5) určí 95 % pomalých metabolizátorů, u kterých dochází k minimální metabolizaci na aktivní metabolit ODV, v našem případě byla v DNA pacientky zjištěna homozygotní delece genu CYP2D6 (alelická varianta \*5/\*5). Tento genotyp vysvětluje nálezy fenotypu – poměr ODV/VEN je menší než 1 % a u modelové látky metoprololu nebyl metabolit vůbec nalezen. Při takovéto konstelaci metabolické kapacity může dojít ke kumulaci mateřské látky v krvi a tím i k projevům intoxikace. Pacientka si stěžovala na únavu, útlum, nespavost, sníženou chuť k jídlu a pokles hmotnosti, což jsou časté nežádoucí účinky venlafaxinu, a na bolest hlavy, která se vyskytuje až ve 30 % případů (1). V laboratorních výsledcích byly nalezeny abnormální

funkční jaterní testy, zejména GMT a vysoká hladina cholesterolu. Zvýšené hodnoty GMT vedly k úvaze o abúzu alkoholu, ale budou pravděpodobně způsobeny dlouhodobě zvýšenou expozicí venlafaxinem. Pacientka nemluvila pravdu o zvýšeném užívání psychofarmak, kde přiznávala olanzapin a mianserin. Podle naměřených hladin při příjmu na psychiatrické oddělení musela užívat i výrazně vyšší dávky venlafaxinu, poněvadž při kontrolovaném podávání na oddělení se hladiny VEN snížily více než dvojnásobně a zůstaly týden obdobné. Při stanovování fenotypu pomocí modelové látky – betablokátoru metoprololu, byl zjištěn pokles tepové frekvence, ale navíc hypertenze ve všech sledovaných časech. Hypertenze bývá též častým nežádoucím projevem při terapii VEN. Při přijetí na interní oddělení byl naměřen TK 110/70 mmHg a pulzová frekvence 98/min., což mohlo být způsobeno zvýšenou koncentrací psychofarmak při akutní intoxikaci, bohužel bez stanovení hladin. Terapeutické monitorování hladin léčiv (TDM) je metodou, která pomocí stanovení hladin léčiv v krvi, interpretací a psaným doporučením klinickým farmakologem s úzkou spoluprací s ošetřujícím klinikem dovede zkrátit dobu hospitalizace, snížit na minimum nežádoucí účinky a snížit náklady na léčbu. U naší pacientky jsme diagnostikovali pomocí TDM, fenotypizace a genotypizace rizikového pacienta při terapii léčivy metabolizovanými CYP2D6. Jako PM je vystavena většímu riziku intoxikace a její hospitalizace mohla být o týden kratší při akceptaci doporučení snížení dávky VEN na polovinu. Současně by se již dříve zvýšila kvalita jejího života, poněvadž

většina nežádoucích účinků vymizela po snížení dávky na 75 mg/den při dosažení doporučeného terapeutického rozmezí. Diagnóza PM má význam pro pacientku i do budoucna, poněvadž při eventuální další léčbě je potřeba provádět TDM při použití jiných antidepresiv (amitriptylin, klomipramin, desipramin, fluoxetin, imipramin, maprotilin, nortriptilin, paroxetin), neuroleptika (haloperidol, perfenazin, risperidon, thioridazin, zyklopentixol), analgetika (kodein, tramadol), antiemetika (setrony), beta-blokátory (metoprolol, karvedilol), antiarytmika (propafenon) (7, 8).

## Literatura

1. www.sukl.cz.
2. Otton SV, Ball SE, Cheung SW, et al. Venlafaxine oxidation in vitro is catalyzed by CYP 2D6. Br J Clin Pharmacol 1996; 41: 149–156.
3. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, et al. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. Pharmacopsychiatry 2011; 44: 195–235.
4. Launiainen T, Rasanen I, Vuori E, Ojanperä I. Fatal venlafaxine poisonings are associated with a high prevalence of drug interactions. Int J Legal Med. 2011; 125(3): 349–358.
5. Urinovska R, Brozmanova H, Sistik P, Grundmann M. Determination of selected psychotropic drugs in human serum by liquid chromatographic-mass spectrometry. Ther Drug Monit 2011; 33: 528.
6. Peřinová I, Ďuricová J, Brozmanová H, Kacířová I, Grundmann M. Stanovení metoprololu a jeho metabolitu alfa-hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Česk slov Farm. 2008; 57: 254–259.
7. Ďuricová J, Grundmann M. CYP2D6 a jeho klinický význam. Klin Farmakol Farm 2007; 21: 133–136.
8. Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, et al. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. populations: Clinical implications. Oncologist 2006; 11: 126–135.

Článek přijat redakcí: 29. 6. 2012

Článek přijat k publikaci: 13. 7. 2012

**doc. MUDr. Milan Grundmann, CSc.**

Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta  
Ostravská univerzita v Ostravě  
Syllabova 19, 703 00 Ostrava – Zábřeh  
milan.grundmann@osu.cz



**9.6 Grundmann M., Kacirova I., Urinovska R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic. 2013, 157, Epub ahead of print**

Tento přehled shrnuje rozdělení, farmakokinetické parametry, metabolismus a význam terapeutické monitorování antidepresiv. Podrobně se věnuje selektivním inhibitorům zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) (citalopram, escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, sertralin), která jsou nejčastěji předepisovaná antidepresiva. Dále se zaměřuje na inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI) (venlafaxin a duloxetin) a atypická antidepresiva (mirtazapin a bupropion). Obecně je terapeutické monitorování doporučováno pro posouzení compliance, při změně současně užívané medikace, při podezření na intoxikaci nebo lékové interakce.

# Therapeutic monitoring of psychoactive drugs - antidepressants: A review

Milan Grundmann<sup>a</sup>, Ivana Kacirova<sup>a,b</sup>, Romana Urinovska<sup>b</sup>

**Background.** Major depression, is one of the most prevalent mental disorders in Europe and the USA. The dramatic rise in pharmacological antidepressants is mainly due to increase in use of selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors and other new generation antidepressants. In clinical practice, optimum individual doses are often guided by trial-and-error. This article reviews the available literature on therapeutic monitoring of antidepressant drugs.

**Methods.** A search using MEDLINE (english-language reports, 1983 - August 2012) with the key words for antidepressant drugs and therapeutic drug monitoring.

**Results.** There is a need for monitoring antidepressants due to wide interindividual pharmacokinetic variability. At the same drug dose, a more than 20-fold variation in steady state concentration of drug in the body may result: people differ in their ability to absorb, distribute, metabolise and excrete drugs for reasons of concurrent disease, age, gender, smoking and eating habits, concomitant medication and genetics.

**Conclusions.** Monitoring of antidepressant drugs enables us to individualise drug doses based on rational therapy, minimise side effects, reduce morbidity and mortality and cut the cost of health care. Phenotyping and genotyping could increase therapeutic drug monitoring further.

**Key words:** therapeutic drug monitoring, antidepressant drugs, therapeutic reference ranges

Received: September 21, 2012; Accepted with revision March 6, 2013; Available online: 21 March, 2013  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.020>

<sup>a</sup>Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava

Corresponding author: Milan Grundmann, e-mail: milan.grundmann@osu.cz

Major depression is one of the most prevalent mental disorders in Europe and the United States, with a 16.5% and 8.9% lifetime prevalence for European women and men and 16.2% and 6.6% for American women and men. This is the case after more than half a century of modern psychopharmacology, with billions of dollars spent on antidepressants annually world-wide. The dramatic rise in consumption of antidepressants in developed countries in the past two decades has been mainly due to increase in the use of selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors and other new generation antidepressants which are now the most commonly prescribed antidepressants in the world. However, we lack good evidence to guide our everyday decisions in conducting antidepressant treatment of patients with major depression<sup>1</sup>. There are several commonly used classes of antidepressants. These include selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs), atypical antidepressants (eg, bupropion and mirtazapin), and serotonin antagonists and reuptake inhibitors (SARIs). Older classes of antidepressants (tricyclic antidepressants - TCAs and monoamine oxidase inhibitors - MAOIs) are still used occasionally. Therapeutic drug monitoring (TDM) in the field of psychotropic drugs began with the tricyclic antidepressants in the 1960s (ref.<sup>2</sup>). Although there is sufficient evidence for the benefits of TDM in optimizing antidepressant therapy, its current use in routine care is far from optimal<sup>3</sup>. In clinical practice, the effort to determine the individual antidepressant drug

dose optimum is often guided by a trial-and-error dose titration strategy<sup>4</sup>.

## Tricyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors

With the tricyclic antidepressant drugs, TDM is a long-established tool for finding the individual dose optimum. TDM has been reported to increase not only efficacy and safety of TCAs, but also cost-effectiveness in the treatment of depression and is highly recommended for most tricyclic antidepressants. It reduces the risk of intoxication, and for many TCAs, a plasma concentration-clinical effectiveness relationship has been shown<sup>5-9</sup>. These older agents are limited by their greater risk of overdose, potential effects on cardiac conduction/arrhythmias (TCAs), and substantial restrictions on diet and medications (MAOIs). TCAs are also associated with orthostatic hypotension, sedation, and anticholinergic effects, and MAOIs commonly cause orthostasis as well<sup>10</sup>.

## Selective serotonin reuptake inhibitors

Serotonin (5-hydroxytryptamine) is an ancient chemical, evolving at least one billion years ago, and it is present in fungi, plants, and animals. It belongs to a class of biochemicals called monoamines, which also includes norepinephrine, and dopamine. Many adaptive processes evolved to be regulated by serotonin, including cell differentiation, temperature, platelet activation and the clotting process, digestion and gut movement, insulin, electrolyte balance, astrocytic activity, neuronal apoptosis, cerebral blood flow, emotion, attention, aggression, mood, repro-

ductive function, and mating behavior. Because serotonin regulates many adaptive processes, antidepressants based on serotonin reuptake inhibition could have many adverse health effects. Antidepressants can cause developmental problems, they have adverse effects on sexual and romantic life, and they increase the risk of hyponatremia, bleeding, stroke, and death in the elderly<sup>11</sup>. The SSRIs are the first-line and the most commonly prescribed antidepressants. All SSRIs share similar pharmacologic actions, including minimal anticholinergic, antihistaminic, and alpha 1-adrenergic blocking effects, and potent presynaptic inhibition of serotonin reuptake. They are generally well-tolerated and are not as dangerous in overdose as are the older agents<sup>10</sup>. The SSRIs are all lipophilic agents, which are well absorbed via the gut mucosa. Fluoxetine, paroxetine, and especially sertraline are highly bound to plasma proteins (95-98%), whereas the protein binding is less pronounced for citalopram and fluvoxamine ( $\leq 80\%$ ). The drugs are extensively distributed to tissues, with volumes of distributions in the range of 400-3000 L. All of the SSRIs are predominantly eliminated by cytochrome P450 catalyzed oxidation in the liver. Fluoxetine, paroxetine and fluvoxamine have all been shown to saturate their own metabolism resulting in nonlinear kinetics within therapeutic dosing ranges. Hence, higher doses of these drugs produce a disproportionate increase in their plasma concentrations. Consequently, it may be difficult to predict the dose necessary to achieve a certain plasma concentration based on the drug plasma concentrations obtained with another dose. The disproportionate increase in plasma concentrations is particularly important with respect to elderly patients. In contrast, citalopram and sertraline follow linear kinetics within their therapeutic relevant ranges<sup>12</sup>. To obtain a drug plasma concentration with any predictive value, one should be sure that a steady-state level of the drug has been achieved, i.e. the first blood sample should be drawn 4-5 elimination half-lives after

initiation of therapy. Citalopram, sertraline, paroxetine, and fluvoxamine are eliminated with half-lives of about 12-36 h, so after 7-14 days all patients are expected to be in a steady-state. The elimination half-life of fluoxetine is long: up to 6 days for fluoxetine and 16 days for the active metabolite norfluoxetine (Table 1). Thus, steady state levels of norfluoxetine will not be achieved until approximately 3 months after initiation of fluoxetine therapy<sup>12</sup>. The importance of therapeutic drug monitoring of SSRIs is the subject of controversial discussion. However, TDM offers information about drug interactions, insufficient therapeutic effect, side effects, compliance and overdose<sup>13</sup>. The basic characteristics of SSRIs and other newer classes of antidepressants are presented in Table 1.

**Citalopram:** This is administered as a racemic mixture, pharmacologically active is S-enantiomer. Its oral bioavailability is 80%, the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) is reached in 2-4 h and is  $< 80\%$  bound to plasma proteins. It is metabolized mainly through N-desmethylation in the liver to desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram and citalopram-N-oxid (pharmacologically active) primarily by cytochrome P450 (CYP) form 2C19 with additional contributions by CYP3A4 and CYP2D6. Polymorphism of CYP2C19 plays an important role in the N-demethylation of citalopram in vivo. Extensive and poor metabolizers of CYP2C19 caused a significant difference in the behaviour of citalopram<sup>14</sup>. The mean elimination half-life is 33-37 h, steady-state plasma concentrations is reached after 7-14 days of dosing. There is a highly linear correlation between citalopram plasma concentrations and citalopram doses, well above the usual dose range. Patients  $>65$  years had significantly higher dose-corrected citalopram plasma concentrations than younger patients<sup>15</sup>. Citalopram is widely used, because it does not exhibit pharmacokinetic interactions unlike fluoxetine, fluvoxamine, or paroxetine. For citalopram one observational study revealed that plas-

**Table 1.** Basic characteristic of antidepressant drugs<sup>9,12,48,54</sup>.

Drug	Bioavailability (%)	Protein binding (%)	$T_{max}$ (hours)	Half-life (hours)	Time to reach steady-state (days)
Bupropion (Hydroxybupropion)	87-100	84	3-5	8-26 (17-47)	8
Citalopram	80	$<80$	2-4	33-37	7-14
Duloxetine	32-80	96	6-10	8-17	5
Escitalopram	80	56	3-6	22-32	7-10
Fluoxetine (Norfluoxetine)	70	95	6-8	4-6 days (4-16 days)	(3 months)
Fluvoxamine	50	80	3-8	15-20	5-10
Mirtazapine	50	85	2	20-40	4-6
Paroxetine	30-60	95	3-5	12-44	4-14
Sertraline	$>44$	98	4-8	26-36	7
Trazodone	$>60$	89-95	1-4	distribution 3-6 elimination 5-9	2-3
Venlafaxine (O-desmethylvenlafaxine)	40-45	27	1-6	5 (11)	3

$T_{max}$  - time to reach maximum plasma concentration ( $C_{max}$ )

ma concentrations on day 7 of treatment were predictive for later non-response. Patients with citalopram plasma concentrations below 50 ng/mL had a significantly reduced effect on the Hamilton rating scale for depression<sup>15</sup>. Recent studies correlated plasma concentrations of SSRIs and occupancy of serotonin transporters (5-HTT) using positron emission tomography in healthy control subjects. Striatal 5-HTT occupancy correlated well with plasma concentrations of the SSRIs, and it was concluded that 80% occupancy is associated with maximal therapeutic effects after 4 weeks of SSRI administration. For citalopram, it was shown that at least 50 ng/mL is required to attain 80% 5-HTT occupancy. Despite therapeutic doses, a significant number of patients had serum concentrations less than 50 ng/mL, and these were associated with an unfavorable treatment outcome; therapeutic drug monitoring is therefore recommended to optimize dosing citalopram in the early phase of treatment<sup>16</sup>.

**Escitalopram:** It is a S-enantiomer of the racemic selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant citalopram. It is rapidly absorbed (oral bioavailability 80%), and reaches maximum plasma concentrations in approximately 3-6 h after administration. Escitalopram has low protein binding (56%) and is widely distributed throughout tissues. The elimination half-life of escitalopram is about 22-32 h, steady-state concentrations are achieved within 7-10 days of administration. Escitalopram is metabolized by the CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4. S-desmethylcitalopram (S-DCT), the principal metabolite, is present at approximately one-third the level of escitalopram; however, S-DCT is a weak inhibitor of serotonin reuptake and does not contribute appreciably to the therapeutic activity of escitalopram. The didesmethyl metabolite of escitalopram is typically present at or below quantifiable concentrations. Escitalopram and S-DCT exhibit linear and dose-proportional pharmacokinetics. Adolescents, elderly individuals and patients with hepatic impairment show no clinically relevant differences in pharmacokinetics compared with healthy young adults, implying that adjustment of the dosage is not necessary in these patient groups<sup>17</sup>. TDM of escitalopram is recommended for dose titration and for special indications or problem solving<sup>9</sup>.

**Fluoxetine:** This is administered as a racemate of R- and S-fluoxetine with almost equal affinity to the 5-HT reuptake carrier. It is well absorbed after oral intake, is highly protein bound (95%), and has a large volume of distribution (20-40 L/kg). The  $C_{max}$  is reached within 6-8 h. Fluoxetine is metabolized primarily via N-demethylation to the active metabolite norfluoxetine primarily by CYP2D6 with additional contributions from CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 and CYP2B6 (ref.<sup>9,18</sup>). The elimination half-life of fluoxetine is about 4-6 days, while that of its metabolite norfluoxetine about 4-16 days. Fluoxetine has a nonlinear pharmacokinetic profile. On the basis of the results of plasma concentration-clinical response relationship studies, there appears to be a therapeutic window for fluoxetine. Concentrations of fluoxetine plus nor-

fluoxetine above 500 ng/mL appear to be associated with a poorer clinical response than lower concentrations<sup>19</sup>.

**Fluvoxamine:** This is well absorbed after oral intake (oral absorption  $\geq 94\%$ ), first pass metabolism reduces the bioavailability to about 50%. The  $C_{max}$  is reached within 3-8 h, plasma protein binding is about 80%. Fluvoxamine undergoes complex hepatic metabolism, with main metabolic routes that include oxidative demethylation and oxidative deamination (CYP1A2 and CYP2D6) (ref.<sup>18</sup>). Fluvoxamine has an elimination half-life of approximately 15-20 h. It has been shown that the oral clearance decreases with increasing doses, suggesting that fluvoxamine exhibits nonlinear kinetics within the therapeutic dose interval. There is a therapeutic threshold for steady-state plasma concentrations of fluvoxamine and probably also for its major metabolite fluvoxamine acid<sup>20</sup>.

**Paroxetine:** This is well absorbed from the gastrointestinal tract. It undergoes a partially saturated first pass metabolism which reduces the bioavailability to about 30-60%. Maximal blood levels are reached 3 to 5 h after administration. Paroxetine is highly protein bound (95%) (ref.<sup>21</sup>). An elimination half-life is 12-44 h, steady-state levels are achieved after 4-14 days. Paroxetine exhibits nonlinear kinetics. It is eliminated after transformation in the liver into pharmacologically inactive metabolites. CYP2D6 (high affinity) and CYP3A4 (low affinity) are most likely to be the major contributors to paroxetine metabolism in humans. For some individuals, CYP1A2 could be of importance for paroxetine metabolism, whereas the importance of CYP2C19 and CYP3A5 is probably limited. Nonlinear paroxetine kinetics is more prominent in extensive metabolizers of CYP2D6 than in poor metabolizers of CYP2D6. Elderly subjects taking paroxetine have higher plasma concentrations and slower elimination than younger subjects<sup>22</sup>. Elimination is also reduced in severe renal and hepatic impairment<sup>23</sup>. Paroxetine is characterized by large interindividual pharmacokinetic variability and heterogeneous response patterns<sup>24</sup>. For paroxetine, a positive correlation was found between drug concentration in plasma and serotonin syndrome symptoms<sup>25</sup>.

**Sertraline:** The  $C_{max}$  of sertraline is reached within 4-8 h, plasma protein binding is about 98%. It undergoes extensive first-pass metabolism and has a linear pharmacokinetic profile. Several P450 enzymes have been shown to catalyze sertraline N-demethylation, with CYP2B6 contributing to the greatest extent, with lesser contributions from CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, and CYP2D6. For deamination, data support the role for CYP3A4 and CYP2C19. Purified human monoamine oxidases A and B also catalyzed sertraline deamination. Because it appears that there are multiple enzymes involved in initial metabolic pathways of sertraline, it would be difficult for any single agent to cause a meaningful drug interaction via inhibition of the metabolic clearance of sertraline<sup>26</sup>. The elimination half-life of sertraline is about 26-36 h and of its main metabolite N-desmethylsertraline between 62-104 h. Steady-state concentrations are achieved within 7

days of administration. Smokers had significantly lower concentration-to-dose mean ratios of serum sertraline and desmethylsertraline than nonsmokers and higher sertraline and desmethylsertraline concentration-to-dose mean ratios were found in elderly patients than in adults aged less than 65 years. A profound variability was found for the interindividual steady-state and trough serum levels of sertraline and desmethylsertraline, but intraindividual metabolizing stability over time was found. The results highlight sertraline TDM as a tool for individual dose optimization and evaluation of patient drug compliance as well as drug-drug interactions. Knowledge of the concentration of the desmethyl metabolite of sertraline is not required to relate clinical effect with drug concentration. However, in some cases the concentration of desmethylsertraline may be helpful to assess the degree of compliance. No correlation between serum drug concentrations and clinical effect was found for sertraline<sup>27-29</sup>. However, monitoring the sertraline plasma level, even though not strictly necessary from a clinical point of view, can be useful in optimizing treatment<sup>30</sup>.

#### Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors

Venlafaxine and duloxetine are the two most commonly used SNRIs. They block the reuptake of serotonin and norepinephrine. These agents are generally well-tolerated and safer than older agents in overdose.

**Venlafaxine:** It is metabolized primarily by the highly polymorphic cytochrome P450 enzyme CYP2D6 to yield a pharmacologically active metabolite, O-desmethylvenlafaxine (ODV), and to a lesser extent by CYP3A4, to yield N-desmethylvenlafaxine<sup>31</sup>. Venlafaxine (VEN) and ODV are mixed serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, venlafaxine is a moderate inhibitor of dopamine reuptake. Only 40-45% of the dose reaches the systemic circulation unchanged, because of extensive first-pass metabolism. Venlafaxine and its main metabolite ODV are 27% and 30% bound to plasma proteins, respectively. Maximal blood levels are reached 1-2 h (VEN) and 3 h (ODV) after administration of fast-released form and 6 h (VEN) and 9 h (ODV) after administration of slow-released form. The steady-state half lives of venlafaxine and its active metabolite ODV are 5 and 11 h, respectively. Steady-state plasma concentrations are reached after 3 days of dosing. The ratio of ODV/VEN is an effective means of phenotyping individuals according to their CYP2D6 metabolizer status<sup>32</sup>. Serum levels varied widely at each dose level. Sex, age and smoking should be considered for optimal dosing of patients with VEN. Women had higher dose-corrected serum levels of VEN and ODV than men, and patients older than 60 years showed higher levels of both compounds than younger ones. In smokers, mean serum levels of ODV is lower than in non-smokers<sup>33</sup>. A significant correlation was found between VEN plasma levels and its antidepressant efficacy<sup>34</sup>. By Gex-Fabry et al. earlier clinical response may occur with higher VEN+ODV plasma level<sup>35</sup>. A positive correlation was also found between VEN plasma concentration and adverse effects. Patients with ODV/VEN ratios below

0.3 had more side effects and reduced serum concentrations of sodium in comparison with other patients. A poor metabolizer of CYP2D6 increases the risk of VEN side effects<sup>36, 37</sup>.

**Duloxetine:** This achieves a maximum plasma concentration approximately 6-10 h after dosing. Duloxetine is highly protein bound (96%) and is widely distributed throughout tissues. Oral bioavailability is approximately 50% (32-80%). It is rapidly and extensively metabolized in the liver by CYP1A2 and CYP2D6, and its numerous metabolites, which are inactive, are mainly excreted in the urine. The mean elimination half-life of duloxetine is approximately 8-17 h (ref.<sup>38,39</sup>). Therapeutic drug monitoring of duloxetine and titration to steady-state serum concentrations above 58 ng/mL is useful for treatment optimization<sup>40</sup>.

#### Atypical antidepressants

Mirtazapine, a serotonin-receptor blocker that also has effects on norepinephrine via blockade of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors, and bupropion, an agent with effects on norepinephrine and dopamine, represent important alternatives to the SSRIs and SNRIs and, for treatment-resistant depression, are sometimes used in combination with them in more complex pharmacologic regimens. Bupropion is a potent inhibitor of CYP2D6. Mirtazapine causes significant blockade at histamine (H1) receptors and 5-HT<sub>2</sub> receptors, leading to sedation and increased appetit/weight gain.

**Mirtazapine:** This is a tetracyclic antidepressant, the first noradrenergic and specific serotonergic antidepressant (NaSSA). It is rapidly and well absorbed from the gastrointestinal tract after oral administration, and peak plasma concentrations are reached within 2 h. Mirtazapine binds to plasma proteins (85%) in a nonspecific and reversible way. The bioavailability is approximately 50%, mainly because of gut wall and hepatic first-pass metabolism. Mirtazapine shows linear pharmacokinetics, which is dependent on gender and age: females and the elderly show higher plasma concentrations than males and young adults. The elimination half-life of mirtazapine ranges from 20 to 40 h, which is in agreement with the time to reach steady-state (4 to 6 days). Biotransformation is mainly mediated by the CYP2D6 and CYP3A4, with a lesser extent of CYP1A2 and CYP2B6 (ref.<sup>9,18,41</sup>). Although no concentration-effect relationship could be established, it was found that with therapeutic dosages of mirtazapine (15 to 45 mg/day), plasma concentrations range on average from 5 to 100 ng/mL (ref.<sup>41</sup>). Wide interindividual variability of serum concentrations at each dose level of mirtazapine have been found. Patients with N-desmethyilmirtazapine/mirtazapine ratios less than 0.4 had significantly more side effects than those having higher ratios. Comedications were assessed for drug-drug interaction, and significantly lower N-desmethyilmirtazapine/mirtazapine ratios were found under concomitant medications of the antidepressant sertraline and the antipsychotic amisulpride<sup>42</sup>.

**Bupropion:** This is a dopamine-norepinephrine reuptake inhibitor. The bioavailability is minimally 87%, maximal blood levels are reached 3-5 h after administration, plasma protein binding is about 84%. Bupropion is extensively metabolized by the liver and has an elimination half-life 8-26 h. Hydroxybupropion, the primary active metabolite (the elimination half-life 17-47 h), is formed by cytochrome CYP2B6. At steady-state,  $C_{max}$  of hydroxybupropion is 4- to 7-fold higher, compared with this of the parent drug. Threohydrobupropion and erythrohydrobupropion (the elimination half-life 37 and 33 h, respectively), the other active metabolites of bupropion, are formed via nonmicrosomal pathways<sup>43</sup>. Bupropion and metabolites demonstrated linear pharmacokinetics and steady-state concentrations are achieved within 8 days of administration. Genetic polymorphisms in CYP2B6 may cause variability in bupropion pharmacokinetics. Bupropion may be a probe drug for CYP2B6 activity in humans<sup>44</sup>. A curvilinear relationship between antidepressant efficacy and trough plasma bupropion concentrations was found. The increase in plasma bupropion concentration from trough level to the 4 h postdose peak level was also positively related to antidepressant response<sup>45</sup>. Plasma levels of bupropion and metabolites, particularly hydroxybupropion, may also predict acute antidepressant response in depressed youths taking bupropion<sup>46</sup>.

#### Serotonin antagonists and reuptake inhibitors

Trazodone is a main antidepressant from the serotonin antagonists and reuptake inhibitors group.

**Trazodone:** Absorption of trazodone is rapid and complete after oral administration and the absolute bioavailability has been reported as >60%. It is 89-95% protein bound and achieves a maximum plasma concentration approximately 1-4 h after dosing. Trazodone is nearly completely metabolized hepatically by hydroxylation, dealkylation, and N-oxidation. 20% of a trazodone dose undergoes N-dealkylation via CYP3A4 to a pharmacologi-

cally active metabolite, m-chlorophenylpiperazine. The active metabolite is further metabolized via CYP2D6, and is therefore subject to CYP2D6 polymorphism. Trazodone shows linear pharmacokinetics and exhibits biphasic elimination with a mean distribution half-life of 3-6 h and an elimination half-life of 5-9 h (ref.<sup>47</sup>). A significant correlation was found between steady-state plasma trazodone levels and its antidepressant efficacy, but not between plasma drug levels and the incidence of side effects<sup>48,49</sup>.

The major reason to use TDM for the guidance of psychopharmacotherapy is the considerable interindividual variability in the pharmacokinetic response of the patient. To produce its characteristic effects, a drug must be present in appropriate concentrations at its sites of action. The latter is not only a function of the dose administered. At the very same dose of psychotropic drugs, a more than 20-fold interindividual variation in the medication's steady-state concentration in the body may result, as patients differ in their ability to absorb, distribute, metabolize and excrete drugs due to concurrent disease, age, gender, smoking or eating habits, concomitant medication or genetic peculiarities<sup>9,50</sup>. Considerable and clinically relevant knowledge has been acquired during the past 30 years on the important role of cytochrome P450 forms, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4/5, in the biotransformation of antidepressants (Table 2). The genetically determined polymorphism of CYP2D6 is of high clinical relevance for antidepressants, which are substrates of this form, including tricyclic antidepressants, some selective serotonin reuptake inhibitors (eg, paroxetine and fluoxetine), and "third-generation" antidepressants (eg, venlafaxine and mirtazapine). Clinically, a poor metabolizer (PM) status may represent a higher risk for adverse effects in patients treated with antidepressants known to be substrates of the deficient enzyme, while ultra-rapid metabolizers (UMs) undergo a higher risk for nonresponse, due to subtherapeutic plasma concentrations<sup>51</sup>. On the other hand, second-generation antidepressants

**Table 2.** Cytochrome P450 (CYP) forms involved in the metabolism of antidepressant drugs<sup>9,18,54</sup>.

Drug	CYP	Active metabolite
Bupropion	<b>2B6</b>	<b>hydroxybupropion</b> , threohydrobupropion, erythrohydrobupropion
Citalopram	<b>2C19</b> , 3A4, 2D6	desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram, citalopram-N-oxid
Duloxetine	<b>1A2</b> , 2D6	none
Escitalopram	<b>2C19</b> , 2D6, 3A4	desmethylcitalopram, didesmethylcitalopram
Fluoxetine	<b>2D6</b> , <b>2C9</b> , <b>2C19</b> , 3A4, 2B6	<b>norfluoxetine</b>
Fluvoxamine	<b>1A2</b> , <b>2D6</b>	fluvoxamine acid
Mirtazapine	<b>3A4</b> , <b>2D6</b> , 1A2, 2B6	desmethylmirtazapine
Paroxetine	<b>2D6</b> , 3A4, 1A2, 2C19, 3A5	none
Sertraline	<b>2B6</b> , <b>2C19</b> , 3A4, 2D6, 2C9	desmethylsertraline
Trazodone	<b>3A4</b> , 2D6	m-chlorophenylpiperazine
Venlafaxine	<b>2D6</b> , 3A4, 2C19	<b>O-desmethylvenlafaxine</b> , N-desmethylvenlafaxine

**Table 3.** Effect of the newer antidepressant drugs in inhibiting the activity of various cytochrome P450 (CYP) forms<sup>18, 52</sup>.

CYP	Bupropion	Citalopram	Duloxetine	Fluoxetine	Fluvoxamine	Paroxetine	Sertraline	Venlafaxine
1A2	-	-/+	-	-/+	+++	-/+	-/+	-
2C9	-	-	-	++	++	+	+	-
2C19	-	-/+	-	++	+++	+	+	-
2D6	++	+	++	+++	+	+++	++	+
3A4	-	-	-	++	++	-/+	-/+	-

Symbols: - = no effect; + = weak effect; ++ = moderate effect; +++ = strong effect

**Table 4.** Levels of recommendation for TDM in psychiatry by Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie<sup>9</sup>.

Level	Evidence	Recommendation	Clinical Consequences
<i>1: strongly recommended</i>	Reported drug concentrations are established and evaluated therapeutic reference ranges. Controlled clinical trials have shown beneficial effects of TDM, reports on decreased tolerability or intoxications.	TDM is strongly recommended for dose titration and for special indications.	At therapeutic plasma concentrations highest probability of response or remission; at "subtherapeutic" plasma concentrations: response rate similar to placebo under acute treatment and risk of relapse under chronic treatment; at "supratherapeutic" plasma concentrations: risk of intolerance or intoxication.
<i>2: recommended</i>	Reported drug concentrations were obtained from plasma concentrations at therapeutically effective doses and related to clinical effects; reports on decreased tolerability or intoxications at "supratherapeutic" plasma concentrations.	TDM is recommended for dose titration and for special indications or problem solving.	TDM will increase the probability of response in non-responders. At "subtherapeutic" plasma concentrations: risk of poor response; at "supratherapeutic" plasma concentrations: risk of intolerance or intoxication.
<i>3: useful</i>	Reported drug concentrations were calculated from plasma concentrations at effective doses obtained from pharmacokinetic studies. Plasma concentrations related to pharmacodynamic effects are either not yet available or based on retrospective analysis of TDM data, single case reports or non-systematic clinical experience.	TDM is useful for special indications or problem solving.	TDM can be used to control whether plasma concentrations are plausible for a given dose, or clinical improvement may be attained by dose increase in nonresponders who display too low plasma concentrations.
<i>4: potentially useful</i>	Plasma concentrations do not correlate with clinical effects due to unique pharmacology of the drug, e. g., irreversible blockade of an enzyme, or dosing can be easily guided by clinical symptoms, e. g., sleep induction by a hypnotic drug.	TDM is not recommended for dose titration but may be potentially useful for special indications or problem solving.	TDM should be restricted to special indications.

**Table 5.** Recommended therapeutic reference ranges, laboratory alert levels and levels of recommendation for TDM(ref.<sup>9</sup>).

Drugs + active metabolites	Level	Therapeutic reference range (ng/ml )	Laboratory alert level (ng/ml )
Bupropion + Hydroxybupropion	3	225-1500	2000
Citalopram	2	50-110	220
Duloxetine	2	30-120	240
Escitalopram	2	15-80	160
Fluoxetine + Norfluoxetine	2	120-500	1000
Fluvoxamine	2	60-230	500
Mirtazapine	2	30-80	160
Paroxetine	3	30-120	240
Sertraline	2	10-150	300
Trazodone	2	700-1000	1200
Venlafaxine + O-Desmethylvenlafaxine	2	100-400	800

**Table 6.** Ranges of metabolite-to-parent drug concentration ratios<sup>9</sup>.

Drug	Metabolite	Ratios of concentrations metabolite/parent drug (mean - sd - mean + sd)
Bupropion	hydroxybupropion	5-47 (24 h); 6-30 (12 h)
Citalopram	desmethylcitalopram	0.31-0.60
Duloxetine	-	-
Escitalopram	desmethylcitalopram	0.3-1.0
Fluoxetine	norfluoxetine	0.7-1.9
Fluvoxamine	fluvoxamine acid	0-1.2
Mirtazapine	desmethylmirtazapine	0.2-1.2
Paroxetine	-	-
Sertraline	desmethylsertraline	1.7-3.4
Trazodone	m-chlorophenylpiperazine	0.04-0.22
Venlafaxine	O-desmethylvenlafaxine	CYP2D6: EM/IM 0.3-5.2; PM ≤0.3; UM >5.2
	N-desmethylvenlafaxine	0.46-1.48

EM=extensive metabolizers, IM=intermediate metabolizers, PM=poor metabolizers, UM=ultra-rapid metabolizers

differ in their potential for pharmacokinetic drug interactions (Table 3). Fluoxetine and paroxetine are potent inhibitors of CYP2D6, fluvoxamine markedly inhibits CYP1A2 and CYP2C19. For this reason, clinically relevant interactions may be expected when these antidepressants are coadministered with substrates of the pertinent forms, particularly those with a narrow therapeutic index. Duloxetine and bupropion are moderate inhibitors of CYP2D6, and sertraline may cause significant inhibition of this form, but only at high doses. Citalopram, escitalopram, venlafaxine and mirtazapine are weak or negligible inhibitors of CYP forms in vitro and are less likely than other second-generation antidepressants to interact with co-administered medications<sup>18,52</sup>.

The TDM group of the Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) has published literature-based guidelines for optimal use of TDM in psychiatry and defined 4 levels

of recommendation, based on empirical evidence: level 1 - strongly recommended, level 2 - recommended, level 3 - useful, and level 4 - potentially useful. The reference ranges listed in generally those for the primary indication (Tables 4, 5). A number of drugs, however, are recommended for several indications (e.g., antidepressant drugs are also used for the treatment of anxiety) but little information is available on optimum plasma concentrations in these situations. So called the "laboratory alert levels" indicate drug concentrations above the recommended reference range that causes the laboratory to feedback immediately to the prescribing physician. The laboratory alert should lead to dose reduction when the patient exhibits signs of intolerance or toxicity. When the high drug concentration is well tolerated by the patient and if dose reduction bears the risk of symptom exacerbation, the dose should remain unchanged. For a number of psychoactive drugs, metabolites actively contribute to the



overall clinical effect of the parent compound. For this reason, TDM must include the quantification of active metabolites, e.g., in the case of fluoxetine (norfluoxetine). Analysis of pharmacologically inactive metabolites, however, may give useful information on the metabolic state of the patient or on his/her compliance. Table 6 shows the “normal” ratios of concentrations of metabolites to parent drugs. Calculated ranges contain 68% of the ratios expected under standard dosages, i. e., ratios within the range of the mean  $\pm$  1 SD assuming normal distribution. A ratio above or below the “normal ratio” can indicate problems of drug adherence or metabolic abnormalities due to a genetic variation or a drug-drug interaction with co-medications exhibiting enzyme inhibiting or inducing properties. In a patient who is genotyped as a poor or ultrarapid metabolizer the medication should not automatically be replaced by another as the dose can often be adapted, using clinical judgement and TDM. AGNP recommends regular monitoring of plasma concentrations under maintenance therapy, at least every 3-6 months, to prevent relapses and rehospitalizations. The frequency of TDM requests may be increased if patients are known to be non-adherent to the medication or in case of changes of co-medications or of smoking (CYP1A2 substrate such as duloxetine) that affect the pharmacokinetics of the drug. As a rule, trough concentrations are measured, but in some situations peak concentrations would show a better correlation with adverse effects. Blood should be collected after at least 4 drug elimination half-lives after the start of or a change in dosage. In clinical practice, the appropriate sampling time for most psychoactive drugs is one week after stable daily dosing and immediately before ingestion of the morning dose. For the treatment with antidepressant there is good evidence that clinical non-improvement at week 2 is highly predictive for later response and remission. Especially the absence of early improvement appears to be a highly reliable predictor of later non-response. For dose titration with antidepressant drugs is therefore recommend to include symptom rating by the treating physician at baseline and at week 2 in addition to drug concentration measurements<sup>9</sup>.

## CONCLUSION

In conclusion, TDM of antidepressant drugs is a method specific to clinical pharmacology for monitoring drugs using the measurement of drug serum concentrations followed by interpretation and good cooperation with clinician. It is able to help in personalized medicine in the area of dosing individualization because of rational therapy, minimalization of side effects, decrease in mortality and morbidity and reduction in cost of health care. Phenotyping and genotyping can increase therapeutic drug monitoring to a higher level<sup>13</sup>.

## ABBREVIATIONS

5-HT, 5-Hydroxytryptamine, Serotonin; 5-HTT, Serotonin transporter; AGNP, The TDM group of the Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie;

$C_{max}$ , Maximum plasma concentration; CYP, Cytochrome P450; EM, Extensive metabolizer; IM, Intermediate metabolizer; MAOIs, Monoamine oxidase inhibitors; NaSSA, Noradrenergic and specific serotonergic antidepressant; ODV, O-desmethylvenlafaxine; PM, poor metabolizer; SARIs, Serotonin antagonists and reuptake inhibitors; S-DCT, S-desmethylcitalopram; SNRIs, Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors; SSRIs, Selective serotonin reuptake inhibitors; TCAs, Tricyclic antidepressants; TDM, Therapeutic drug monitoring;  $T_{max}$ , Time to reach maximum plasma concentration; UM, Ultra-rapid metabolizer; VEN, Venlafaxine.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

**Author's conflict of interest disclosure:** The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## REFERENCES

1. Furukawa TA, Akechi T, Shimodera S, Yamada M, Miki K, Watanabe N, Inagaki M, Yonemoto N. Strategic use of new generation antidepressants for depression: SUN(^\_^)D study protocol. *Trials* 2011;12:116-35.
2. Reis M, Aamo T, Spigset O, Ahlner J. Serum concentrations of antidepressant drugs in a naturalistic setting: compilation based on a large therapeutic drug monitoring database. *Ther Drug Monit* 2009;31(1):42-56.
3. Mann K, Hiemke Ch, Schmidt LG, Bates DW. Appropriateness of Therapeutic Drug Monitoring for Antidepressants in Routine Psychiatric Inpatient Care. *Ther Drug Monit* 2006;28:83-8.
4. Lundmark J, Bengtsson F, Nordin C, Reis M, Walinder J. Therapeutic drug monitoring of selective serotonin reuptake inhibitors influences clinical dosing strategies and reduces drug costs in depressed elderly patients. *Acta Psychiatr Scand* 2000;101:354-9.
5. APA Task Force. Tricyclic antidepressants - blood level measurements and clinical outcome: an APA Task Force Report. *Am J Psychiatry* 1985;142:155-62.
6. Glassman AH. Antidepressant plasma levels revisited. *Int Clin Psychopharmacol* 1994;9(Suppl. 2):25-30.
7. Simmons SA, Perry PJ, Rickert ED, Browne JL. Cost-benefit analysis of prospective pharmacokinetic dosing of nortriptyline in depressed inpatients. *J Affect Disord* 1985; 8:47-53.
8. Preskorn SH, Fast GA. Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety and cost-effectiveness. *J Clin Psychiatry* 1991;52(Suppl. 6):23-33.
9. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgler R, Zernig G. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44:195-235.
10. Huffman JC, Alpert JE. An approach to the psychopharmacologic care of patients: antidepressants, antipsychotics, anxiolytics, mood stabilizers, and natural remedies. *Med Clin North Am* 2010;94:1141-60.

11. Andrews PW, Anderson Thomson J, Amstadter A, Neale MC. Primum non nocere: an evolutionary analysis of whether antidepressants do more harm than good. *Fron Psychol* 2012;3:1-19.
12. Rasmussen BB, Brøsen K. Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors? *Ther Drug Monit* 2000;22:143-54.
13. Prapotnik M, Waschglor R, König P, Moll W, Conca A. Therapeutic drug monitoring of trazodone: are there pharmacokinetic interactions involving citalopram and fluoxetine? *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42(2):120-4.
14. Yu BN, Chen GL, He N, Ouyang DS, Chen XP, Liu ZQ, Zhou HH. Pharmacokinetics of citalopram in relation to genetic polymorphism of CYP2C19. *Drug Metab Dispos* 2003;31:1255-9.
15. Le Bloc'h Y, Woggon B, Weissenrieder H, Brawand-Amey M, Spagnoli J, Eap CB, Baumann P. Routine therapeutic drug monitoring in patients treated with 10-360 mg/day citalopram. *Ther Drug Monit* 2003;25(5):600-8.
16. Haji EO, Tadić A, Wagner S, Dragicevic A, Müller MJ, Boland K, Rao ML, Fric M, Laux G, Hiemke Ch. Association between citalopram serum levels and clinical improvement of patients with major depression. *J Clin Psychopharmacol* 2011;31:281-6.
17. Rao N. The clinical pharmacokinetics of escitalopram. *Clin Pharmacokinet* 2007;46(4):281-90.
18. Spina E, Santoro V, D'Arrigo C. Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update. *Clin Ther* 2008;30(7):1206-27.
19. Altamura AC, Moro AR, Percudani M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet* 1994;26(3):201-14.
20. Gerstenberg G, Aoshima T, Fukasawa T, Yoshida K, Takahashi H, Higuchi H, Murata Y, Shimoyama R, Ohkubo T, Shimizu T, Otani K. Relationship between clinical effects of fluvoxamine and the steady-state plasma concentrations of fluvoxamine and its major metabolite fluvoxamine acid in Japanese depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;167(4):443-8.
21. Hiemke C. Paroxetine: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1994;62(Suppl.1):2-8.
22. Jornil J, Jensen KG, Larsen F, Linnet K. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of paroxetine and estimation of their importance for human paroxetine metabolism using a population-based simulator. *Drug Metab Dispos* 2010;38:376-85.
23. Bourin M, Chue P, Guillon Y. Paroxetine: a review. *CNS Drug Rev* 2001;7(1):25-47.
24. Gex-Fabry M, Eap CB, Oneda B, Gervasoni N, Aubry JM, Bondolfi G, Bertschy G. CYP2D6 and ABCB1 genetic variability: influence on paroxetine plasma level and therapeutic response. *Ther Drug Monit* 2008;30(4):474-82.
25. Hegerl U, Bottlender R, Gallinat J, Kuss HJ, Ackenheil M, Möller HJ. The serotonin syndrome scale: first results on validity. *Eur Arch Psy Clin N* 1998;248:96-103.
26. Obach RS, Cox LM, Tremaine LM. Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab Dispos* 2005;33(2):262-70.
27. Reis M, Aberg-Wistedt A, Agren H, Höglund P, Akerblad AC, Bengtsson F. Serum disposition of sertraline, N-desmethylsertraline and paroxetine: a pharmacokinetic evaluation of repeated drug concentration measurements during 6 months of treatment for major depression. *Hum Psychopharmacol* 2004;19(5):283-91.
28. Gupta RN, Dziurdzy SA. Therapeutic monitoring of sertraline. *Clin Chem* 1994;40:496-9.
29. Lundmark J, Reis M, Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of sertraline: variability factors as displayed in a clinical setting. *Ther Drug Monit* 2000;22(4):446-54.
30. Mauri MC, Fiorentini A, Cerveri G, Volonteri LS, Regispani F, Malvini L, Boscati L, Baido RL, Invernizzi G. Long-term efficacy and therapeutic drug monitoring of sertraline in major depression. *Hum Psychopharmacol* 2003;18(5):385-8.
31. Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R, Lackner K, Härtter S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 2006;31(5):493-502.
32. Nichols AI, Lobello K, Guico-Pabia CJ, Paul J, Preskorn SH. Venlafaxine metabolism as a marker of cytochrome P450 enzyme 2D6 metabolizer status. *J Clin Psychopharmacol* 2009; 29(4):383-6.
33. Unterecker S, Hiemke C, Greiner C, Haen E, Jabs B, Deckert J, Pfuhlmann B. The Effect of Age, Sex, Smoking and Co-Medication on Serum Levels of Venlafaxine and O-Desmethylvenlafaxine under Naturalistic Conditions. *Pharmacopsychiatry* 2012;45(6):229-35.
34. Charlier C, Pinto E, Ansseau M, Plomteux G. Venlafaxine: the relationship between dose, plasma concentration and clinical response in depressive patients. *J Psychopharmacol* 2002;16(4):369-72.
35. Gex-Fabry M, Balant-Gorgia AE, Balant LP, Rudaz S, Veuthey JL, Bertschy G. Time course of clinical response to venlafaxine: relevance of plasma level and chirality. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004; 59(12):883-91.
36. Grundmann M, Urinowska R, Silhan P, Kacirova I. Venlafaxine intoxication - importance of TDM, phenotyping and genotyping. *Klin Farmakol Farm* 2012;26(2):90-2.
37. Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R, Lackner K, Härtter S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 2006;31(5):493-502.
38. Carter NJ, McCormack PL. Duloxetine: a review of its use in the treatment of generalized anxiety disorder. *CNS Drugs*. 2009;23(6):523-41.
39. Knadler MP, Lobo E, Chappell J, Bergstrom R. Duloxetine: clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 2011;50(5):281-94.
40. Waldschmitt C, Vogel F, Pfuhlmann B, Hiemke C. Duloxetine serum concentrations and clinical effects. Data from a therapeutic drug monitoring (TDM) survey. *Pharmacopsychiatry* 2009;42(5):189-93.
41. Timmer CJ, Sitsen JM, Delbressine LP. Clinical pharmacokinetics of mirtazapine. *Clin Pharmacokinet* 2000 Jun;38(6):461-74.
42. Shams M, Hiemke Ch, Hartter S. Therapeutic Drug Monitoring of the Antidepressant Mirtazapine and Its N-Demethylated Metabolite in Human Serum. *Ther Drug Monit* 2004;26:78-84.
43. Jefferson JW, Pradko JF, Muir KT. Bupropion for major depressive disorder: Pharmacokinetic and formulation considerations. *Clin Ther* 2005;27(11):1685-95.
44. Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* 2000;28(10):1222-30.
45. Preskorn SH. Antidepressant response and plasma concentrations of bupropion. *J Clin Psychiatry* 1983;44(5 Pt 2):137-9.
46. Daviss WB, Perel JM, Brent DA, Axelson DA, Rudolph GR, Gilchrist R, Nuss S, Birmaher B. Acute antidepressant response and plasma levels of bupropion and metabolites in a pediatric-aged sample: an exploratory study. *Ther Drug Monit* 2006;28(2):190-8.
47. Karhu D, Gossen ER, Mostert A, Cronjé T, Fradette C. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of once-daily trazodone extended-release caplets in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2011;49(12):730-43.
48. Monteleone P, Gnocchi G. Evidence for a linear relationship between plasma trazodone levels and clinical response in depression in the elderly. *Clin Neuropharmacol* 1990;13(Suppl 1):84-9.
49. Mihara K, Yasui-Furukori N, Kondo T, Ishida M, Ono S, Ohkubo T, Osanai T, Sugawara K, Otani K, Kaneko S. Relationship between plasma concentrations of trazodone and its active metabolite, m-chlorophenylpiperazine, and its clinical effect in depressed patients. *Ther Drug Monit* 2002;24(4):563-6.
50. Hiemke Ch. Therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: does it hold its promises? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2008;258(Suppl 1):21-7.
51. Baumann P, Ulrich S, Eckermann G, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Müller-Oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G, Hiemke C; Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie - Therapeutic Drug Monitoring group. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 2005;7:231-47.
52. Mitchell PB. Therapeutic drug monitoring of psychotropic medications. *Br J Clin Pharmacol* 2000;49:303-12.
53. Grundmann M, Kacirova I. Significance of TDM, phenotyping and genotyping for the correct drug dosage. *Cas Lek Ces* 2010;149:482-7.
54. Tekes K, Hashemi F, Szegi P, Sotonyi P, Laufer R, Kalasz H. Prodrugs and active metabolites among antidepressive compounds. *Neuropsychopharmacol Hung* 2011;12(2):103-10.

## **9.7 Grundmann M., Kacirova I., Urinovska R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs (článek v přípravě do tisku)**

Článek shrnuje terapeutické monitorování antipsychotik, je zaměřen hlavně na antipsychotika 2. generace (amisulprid, aripiprazol, klozapin, olanzapin, quetiapin, risperidon, ziprasidon). U jednotlivých léků popisuje farmakokinetické parametry, cesty metabolismu a jejich význam pro terapeutické monitorování. TDM antipsychotik není příliš rozšířeno v rutinní praxi. O významu TDM u atypických antipsychotik se stále vedou diskuse, nicméně se objevuje stále více důkazů, že tato metoda může zlepšit účinnost, a to zejména u pacientů, kteří neodpovídají na terapeutické dávky nebo vykazují nežádoucí účinky. Monitorování hladin není nezbytně nutné u všech atypických antipsychotik, protože nejsou jednoznačné údaje podporující vztah mezi plazmatickou koncentrací a klinickým účinkem nebo nežádoucími účinky.

## Title: **Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs**

Authors: Milan Grundmann<sup>a</sup>, Ivana Kacirova<sup>a</sup>, Romana Urinovska<sup>b</sup>

Affiliations:

<sup>a</sup> *Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine University of Ostrava*

<sup>b</sup> *Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava*

### **Abstract**

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder often associated with cognitive impairment and affective, mainly depressive, symptoms. Antipsychotic medication is the primary intervention for the stabilization of acute psychotic episodes and the prevention of recurrences and relapses in patients with schizophrenia. Typical antipsychotic, the older class of antipsychotic agents, are currently used much less frequently than the newer atypical antipsychotics. These agents tend to be characterized by a low propensity to produce acute extrapyramidal symptoms and tardive dyskinesia, a weak potential to cause elevation of serum prolactin levels, and a broad spectrum of activity involving not only positive and negative symptoms, but also other symptom dimensions of schizophrenia. The plasma concentration of antipsychotic drug is a valid measure of the drug at its primary target structure in the brain. Therapeutic drug monitoring of antipsychotic drugs is the specific method of clinical pharmacology using measurement of drug serum concentrations followed by interpretation and good cooperation with clinician. It is able to help personalized medicine in dose adjustment according to the characteristics of the individual patient, in minimizing the risk of toxicity, in monitoring adherence and in cost-effectiveness in the treatment of psychiatric disorders.

**Key words:** therapeutic drug monitoring, antipsychotic drugs, therapeutic reference ranges

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder with one-year incidence rates of about 15/100,000 persons that affects about 26,3 million people worldwide, making schizophrenia and schizophrenia-related disorders frequently chronic illnesses <sup>1</sup>. It is a heterogeneous disorder characterized by positive and negative symptoms and often associated with cognitive impairment and affective, mainly depressive, symptoms. The course of schizophrenia is chronic, with relapses in psychotic episodes, disturbed cognitive functioning, poor quality of life and social decline. Antipsychotic medication is the primary intervention for the stabilization of acute psychotic episodes and the prevention of recurrences and relapses in patients with schizophrenia <sup>2</sup>. Since the discovery of chlorpromazine in the 1950s, antipsychotic drugs are effective treatments for psychotic symptoms and reduce hospitalization rates <sup>3</sup>.

**Typical antipsychotic:**

This older class of antipsychotic agents, which include haloperidol, fluphenazine, and perphenazine, work by blocking dopamine D2 receptors. Currently, these medications are used much less frequently than the newer atypical antipsychotics. They have fallen somewhat out of favor because of side effects (extrapyramidal symptoms, tardive dyskinesia, neuroleptic malignant syndrome). However, these medications are very effective in the treatment of psychosis, and large studies have found that they may be as effective as the atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. Furthermore, particularly the higher potency agents (eg, haloperidol) seem to have lesser metabolic side effects than some of the atypical antipsychotics <sup>4</sup>.

**Atypical antipsychotics:**

‘Newer’ or ‘atypical’ or ‘second generation’ antipsychotics include clozapine, risperidone, olanzapine, quetiapine, sertindole, ziprasidone, aripiprazole and amisulpride. These agents tend to be characterized by a low propensity to produce acute extrapyramidal symptoms and tardive dyskinesia, a weak potential to cause elevation of serum prolactin levels, and a broad spectrum of activity involving not only positive and negative symptoms, but also other symptom dimensions of schizophrenia (i.e. cognitive,

aggressive and depressive symptoms) <sup>4</sup>. On the other hand, treatment with some of these medications has been associated with substantial risk of metabolic effects (such as weight gain, hyperglycaemia and lipid dysregulation), cerebrovascular adverse events (in particular stroke), and cardiovascular adverse events (particularly prolongation of heart-rate corrected QT interval of the electrocardiogram) <sup>5-7</sup>. Metabolic side effects seem to be greatest with clozapine and olanzapine, intermediate with risperidone/paliperidone and quetiapine, and relatively minimal with ziprasidone and aripiprazole <sup>8</sup>.

Wanted and unwanted drug effects depend on concentrations of the drug at its target site. For antipsychotic drugs, the brain, which is the target organ, is not directly accessible to drug monitoring. After a given dose, resulting blood concentrations of antipsychotic drugs are highly variable among individuals. The resulting plasma concentration at a given dose can thus not be predicted by the dose. This is certainly a result of interindividual variabilities in drug metabolism by hepatic and extrahepatic enzymes. However, other factors, such as drug transporters involved in absorption, distribution, and eliminations are probably also relevant. The patients compliance with taking the drug in the prescribed dose and at the recommended times is another factor that contributes to the highly variable blood concentrations. Antipsychotic drugs exert most therapeutic actions by blockade of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors. It has been shown that plasma concentrations of antipsychotic drugs correlate well with receptor occupancy. In accordance with the high variability of drug concentrations in plasma under same doses it was found that receptor occupancy correlates better with plasma concentrations than with daily doses <sup>9</sup>. Optimal response was seen at 70–80 % receptor occupancy, and 80 % receptor occupancy was defined as the threshold for the occurrence of extrapyramidal side effects <sup>10,11</sup>. Therefore, the plasma concentration of antipsychotic drug is a valid measure of the drug at its primary target structure in the brain <sup>9</sup>. Therapeutic drug monitoring (TDM) for the atypical antipsychotics affords the opportunity to reduce toxicity and increase compliance. However, the clinical value of using plasma concentrations of antipsychotics to monitor patients with schizophrenia is a contentious issue. Excessively high concentrations may be associated with clinical deterioration of the patient because of antipsychotic toxicity. Of the typical antipsychotics reviewed, haloperidol, trifluoperazine and fluphenazine have demonstrated relatively consistent and significant correlations

between plasma concentration and therapeutic response. The benefits of TDM of the atypical antipsychotics clozapine and olanzapine, which include optimization of dosage regimens, assurance of compliance and avoidance or minimization of toxicity, are a small price to pay in contrast with the greater risk of the clinical alternatives of relapse and rehospitalization <sup>12</sup>. The rationale for using therapeutic drug monitoring in relation to atypical antipsychotics is still a matter of debate, but there is growing evidence that it can improve efficacy, especially when patients do not respond to therapeutic doses or when they develop adverse effects. Monitoring of plasma concentrations has contributed to our understanding of cases of non-response to pharmacological therapy by distinguishing 'pseudo' drug resistance (characterised by low plasma concentrations as a result of greater metabolic activity or poor compliance) and 'true' drug resistance (characterised by appropriate plasma concentrations in relation to the administered dose but poor receptor sensitivity). TDM is not strictly necessary for all of the atypical antipsychotic drugs, because there are no unequivocal data supporting a relationship between plasma drug concentrations and clinical outcomes or adverse effects, with the exception of the concentration-dependent proconvulsant effects of clozapine that make TDM highly recommended in order to avoid overdosing. Similarly, TDM is recommended in order to establish the optimal tolerability of olanzapine and risperidone. It must be remembered that optimal plasma concentration ranges for clozapine, risperidone and olanzapine are proposed by some investigators, but not all. Studies of quetiapine and amisuipride provide limited information, and there are no direct data for ziprasidone, aripiprazole and sertindole. The importance of TDM remains when it comes to identifying 'pseudo-pharmacoresistance' problems such as poor compliance, high individual levels of metabolism, excessive water consumption by patients, excessive smoking, drug abuse, and appearance of unpredictable adverse effects and possible drug interactions <sup>13</sup>.

At the usual clinical doses, atypical antipsychotics appear to not generally affect markedly the metabolism of other coadministered medications. However, these agents are subject to drug–drug interactions with other psychotropic agents or with medications used in the treatment of concomitant physical illnesses. Most pharmacokinetic interactions with newer antipsychotics occur at the metabolic level and usually involve changes in the activity of the major drug-metabolizing enzymes involved in their biotransformation, i.e.

the cytochrome P450 (CYP) monooxygenases and/or uridine diphosphate-glucuronosyltransferases (UGT). Most documented metabolic interactions involve antidepressant and anti-epileptic drugs (Table 1). Tobacco smoking is associated with induction of drug metabolizing enzymes, namely CYP1A2 and, possibly, UGTs. Smoking may influence the elimination of those antipsychotics, such as clozapine and olanzapine, whose metabolism is mainly dependent on CYP1A2 and UGTs. Different studies have shown that plasma concentrations of clozapine (and its metabolite norclozapine) and olanzapine are lower, at the same dose, in smokers as compared to non-smokers. Concerning clozapine, the inducing effect of smoking was more evident in men than in women. Smoking cessation, if not accompanied by a dosage decrease, may be associated with increased plasma concentrations of these antipsychotics, possibly resulting in dose-related toxic effects<sup>14, 15</sup>. Moreover, changes in the habitual caffeine intake alter the metabolism of clozapine in schizophrenic patients<sup>16</sup>.

**Clozapine:** after oral administration, the drug is rapidly absorbed. Only 27-50% of the dose reaches the systemic circulation unchanged, because of extensive first-pass metabolism. It is 95% bound to plasma proteins, primarily alpha1-acid glycoprotein. The maximum plasma concentrations ( $C_{max}$ ) is reached within 1-4 hours after dosing. The mean half-life ranges from 9 to 17 hours. Steady-state plasma concentrations are reached after 7-10 days of dosing. Clozapine is metabolized primarily by CYP1A2, with additional contributions by CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4. Glucuronidation by UGT1A1, 1A3 and 1A4 is an important pathway in its metabolism<sup>17-20</sup>. The main active metabolites of clozapine are norclozapine (CYP1A2) and clozapine-N-oxide (CYP3A4), which are found in plasma at concentrations that are usually 50-90% and 10-35%, respectively, of the concentrations of clozapine. It has also been reported recently that clozapine and clozapine-N-oxide can interconvert, and this reversible metabolic pathway could at least partly explain the variability of plasma clozapine concentrations among patients<sup>13</sup>. Plasma clozapine concentrations vary widely between individuals, so the oral dose is not a reliable indicator of plasma drug concentrations. This wide variability is the result of interindividual differences in bioavailability and the fact that clozapine is metabolised by the highly variable activity of CYP1A2. However, the serum determinations showed an acceptably low mean inpatient variability of 20%, which



means that serum clozapine determinations can be used to assess patient compliance. The high interindividual and low intraindividual variability of plasma clozapine concentrations confirm the usefulness of TDM. Both the antipsychotic efficacy and the adverse effects of clozapine are positively correlated with the concentration of the drug in plasma <sup>21</sup>. Norclozapine is not a useful predictor of therapeutic response <sup>22</sup>. Most researchers have found that a threshold plasma clozapine concentration of 350-420 ng/mL is associated with an increased probability of a good clinical response to the drug. Furthermore, in a follow up study of one sample found the concentration-response relationship to be consistent over a 2,5-year period. In addition, five of seven previous non-responders became responders when plasma clozapine concentrations were increased to above 350 ng/mL. There is also a relationship between serum clozapine concentrations and CNS adverse effects. For example, Olesen et al. <sup>23</sup> found a significant correlation between clozapine concentrations and EEG changes. Concentrations above 1000 ng/mL significantly increase the risk of confusion, delirium and generalized seizures <sup>23, 24</sup>. Clozapine-induced obsessive/compulsive symptoms have been reported by many authors and they were not uncommon side effects. The authors suggest that the emergence of these side effects may be related to higher plasma concentration of clozapine and clinicians should routinely check for and manage these side effects <sup>25</sup>. Inflammatory reactions may suddenly increase clozapine concentrations and lead to toxic delirium <sup>26</sup>. Plasma clozapine concentrations (and the probability of reaching a given threshold) may be influenced by some factors, such as age, sex and smoking <sup>13</sup>. Because of the degree of interindividual variability of the clozapine concentration to dose ratio, dosages of 900 to 1800 mg/day are necessary in 15% of patients to obtain clozapine concentrations of  $\geq 400$  ng/mL. These patients are most likely to be males who smoke cigarettes. Thus, patients requiring these higher dosages should probably be titrated more cautiously to avoid the adverse effects associated with higher dosages, such as seizures and confusion <sup>12</sup>. Changes in the habitual caffeine intake alter the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. Thus, patient intake of caffeine should be medically supervised, and the monitoring of clozapine and metabolite levels may be warranted <sup>16</sup>. Interindividual variability in CYP1A2 activity may potentially explain treatment resistance to clozapine in some patients. CYP1A2 phenotyping with a simple caffeine test may contribute to

individualization of clozapine dosage and differentiate between treatment noncompliance and high CYP1A2 activity<sup>27</sup>. TDM can potentially decrease the lag time to response by administering dosages to patients that produce a therapeutic clozapine concentration in plasma. Empirically determined regimens may require months to optimise clozapine treatment in patients with schizophrenia. Logically, however, TDM should shorten patient response time since patients with lower plasma clozapine concentrations consistently have significantly lower response rates and will eventually be titrated to higher dosages and plasma drug concentrations<sup>12</sup>. Reduction of relapse rates by TDM is highly cost-effective, as relapses can lead to hospitalization. In schizophrenic patients, it has been shown that fluctuations of clozapine plasma concentrations are predictive for relapses and rehospitalizations. In these patients, TDM may help reduce the risk of relapse or recurrence by increasing adherence to the medication. One day in the hospital is 4–16 times more expensive than a single drug concentration measurement in the laboratory<sup>28</sup>. Clozapine still represents the gold standard in the treatment of pharmacoresistant schizophrenia and optimal plasma levels for acute and maintenance clozapine treatment are well known. Literature experiences show that TMD in clinically defined patients subgroups such as pharmacoresistant schizophrenia is clinically advantageous<sup>29</sup>.

**Risperidone:** It is rapidly absorbed after oral administration, with the  $C_{max}$  being reached in approximately 1 hour. Its oral bioavailability is 70-85%. Risperidone is 89% bound to plasma proteins. It mainly undergoes 9-hydroxylation in the liver, which yields the active 9-hydroxyrisperidone (9-OH-RSP - paliperidone) metabolite; a step that is mainly catalysed by CYP2D6 and, to a lesser extent, CYP3A4. Alicyclic dehydroxylation and oxidative N-dealkylation are minor metabolic pathways. Genetic influences, such as the CYP2D6 status, play an important role in determining the variability of its pharmacokinetic parameters. The mean elimination half-life of risperidone is 3 hours in extensive metabolizers and 22 hours in poor metabolizers. Steady-state concentrations are reached within 4-6 days of treatment. The absolute oral bioavailability of paliperidone is 28%. It is 74% protein bound, primarily to albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. Peak plasma concentrations are reached approximately 24 hours after dosing. Paliperidone undergoes very limited hepatic metabolism, with approximately 60% of the unchanged drug eliminated renally and 11% eliminated unchanged in the feces. The terminal half-life

of paliperidone is about 23 hours with steady state concentration attained in 4–5 days<sup>13, 30, 31</sup>. The mean elimination half-life of the active moiety (risperidone + its main metabolite) is almost constant at about 22 hours in both groups. There are large intra- and interindividual variations in plasma concentrations of both risperidone and 9-OH-RSP. As the pharmacological properties of 9-OH-RSP are similar to those of risperidone, both are regarded as being able to contribute to the drug's overall antipsychotic effects in the treatment of schizophrenia, and thus represent the 'active moiety'. The 9-OH-RSP (paliperidone) is now marketed as an antipsychotic in its own right. The overall pharmacological effects of risperidone depend on the sum of the plasma concentrations of risperidone and its 9-OH-RSP metabolite (the total active moiety), so monitoring plasma concentrations of the parent compound (risperidone) alone can lead to erroneous interpretations<sup>13</sup>. Therapeutic drug monitoring of risperidone may be beneficial in certain circumstances, including assessing potential noncompliance and supporting compliance, ruling out therapeutic failure as a result of low drug concentrations, and identifying and managing drug interactions, adverse effects, and use in special populations<sup>32</sup>. Moreover, risperidone TDM should be particularly useful when medication is switched from the oral to the injectable depot form or vice versa<sup>13</sup>. In chronic schizophrenic patients experiencing an acute exacerbation of the disorder, plasma levels of risperidone and its active metabolite correlate with the occurrence of parkinsonian side effects<sup>33</sup>. Risperidone plasma concentration/dose ratio (C/D) accumulation peaks of 49% at 2 months (from baseline concentration) and 9-hydroxy-risperidone and total moiety C/D accumulation peaks of 66% and 55% above the 2-month level at 6 months were found. The risperidone conversion to 9-hydroxy-risperidone by CYP2D6 suggests CYP2D6 inhibition or DNA down-regulation in the first 2 months. The time course of the accumulations identified suggests that both CYP inhibition and DNA regulatory mechanisms may be involved in the metabolism of the drug. Therefore, long-term TDM can optimize treatment with risperidone<sup>34</sup>.

**Olanzapine:** approximately 85% of an oral olanzapine dose is absorbed, but as 40% is inactivated by first-pass hepatic metabolism and its oral bioavailability is 60%. The  $C_{max}$  is reached within 6 hours. The drug is 93% bound to plasma proteins, mainly albumin (90%) and alpha1-acid glycoprotein (77%). It has a mean elimination half-life of 33 hours

(range 21-54 hours) and steady-state concentrations are achieved within 5-7 days of administration. Olanzapine is metabolized primarily by direct glucuronidation and CYP1A2 and to a lesser extent by CYP2D6, CYP3A4 and flavin monooxygenase to its 10-N- and 4'-N- glucuronides, 4'-N-desmethyloanzapine, olanzapine-N-oxide, and 2-hydroxymethyloanzapine. The 10-N-glucuronide is the most abundant metabolite <sup>13</sup>. Glucuronidation by the UDP-glucuronosyltransferase family of enzymes (1A4 and 2B10) is the major mode of olanzapine metabolism, and polymorphisms in these enzymes could contribute to interindividual variability in olanzapine metabolism and therapeutic response <sup>35</sup>. The studies showed that mean plasma olanzapine concentrations vary widely, depending on factors such as the prescribed daily dose and the duration of treatment. Olanzapine showed a plasma concentration/dose ratio accumulation peak at 4 months of 31% above baseline, and a slower increase to 47% above baseline at 18 months with no clear plateau. The time course of the accumulations identified suggests that both CYP inhibition and DNA regulatory mechanisms may be involved in the metabolism of the drug. Therefore, long-term TDM can optimize treatment with both risperidone and olanzapine, and also antipsychotics in general <sup>34</sup>. Smokers and men show greater olanzapine clearance than women and nonsmokers. Given their lower olanzapine clearance, women have significantly higher mean plasma olanzapine concentrations, which become evident after the fifth week of treatment. The studies strongly indicate a relationship between clinical outcomes and plasma olanzapine concentrations <sup>13</sup>. A therapeutic range of between 20 and 80 ng/mL has been found <sup>28</sup>. The Positron Emission Tomography (PET) data available for olanzapine indicate that a threshold level of approximately 15-20 ng/mL should be targeted in order to get an antipsychotic response in the usual patient with schizophrenia. Levels above 50 ng/mL might be associated with a higher risk for extrapyramidal symptom <sup>36</sup>. Furthermore, given the large interpatient variability in plasma olanzapine concentrations at the same dosages, olanzapine TDM can be considered very useful in assessing therapeutic efficacy and controlling adverse events. Stopping smoking may be associated within a few days with an increase in side effects, such as extrapyramidal symptoms, unless the dose is adjusted <sup>13</sup>.

**Quetiapine:** It is rapidly absorbed following oral administration and 70% of the administered dose is absorbed. Median  $C_{max}$  is reached within 1-1,5 hours, the drug is

83% bound to plasma proteins and is eliminated with a elimination half-life of 5-8 hours. Steady-state concentrations are achieved within 2-3 days of administration. The primary route of elimination is hepatic metabolism. Quetiapine is predominantly metabolised by CYP3A4, which is the main isoenzyme involved in quetiapine sulfoxidation and dealkylation, and by CYP2D6 which is involved in the 7-hydroxylation of quetiapine (together with CYP3A4). Of the 11 metabolites formed as a result of the hepatic metabolism of quetiapine, only two (7-hydroxy-quetiapine and 7-hydroxy-N-desalkyl-quetiapine) are pharmacologically active and they circulate in plasma at rather low concentrations (12% of those of quetiapine). If this is the case, it is unlikely that they contribute to the pharmacological effects of the drug. The oral clearance of quetiapine seems to be lower (30-50%) in elderly patients (aged 63-85 years) receiving 300-750 mg/day than in younger patients on similar regimens. It should be noted that an age of >70 years has been found to be associated with a marked decline in the hepatic content of CYP3A4. Dose titration may therefore need to be slower in the elderly, and the daily dose lower than in younger patients. Although the data from Gefvert et al.<sup>37</sup> and Mauri et al.<sup>38</sup> argue in favour of the existence of a relationship between plasma quetiapine concentrations and clinical responses, they provide only some preliminary information about the meaning of plasma quetiapine concentrations. Other investigators have failed to identify an optimal therapeutic range for quetiapine<sup>39,40</sup>. The data from the available PET studies provide evidence for a therapeutic reference range of 100-500 ng/mL. Higher plasma concentrations might be tolerable by many patients, and their tolerability is limited by vegetative side-effects and sedation rather than extrapyramidal symptom<sup>36</sup>.

**Amisulpride:** It is rapidly absorbed after oral administration, its absolute bioavailability is about 50% and  $C_{max}$  is reached after 1-4 hours. Amisulpride has low protein binding (17%), the elimination half-life is 12-20 hours and the steady state is reached after 2-3 days. It undergoes minimal metabolism in the liver and produces only two main metabolites, both of which are inactive. Excretion occurs mainly via the kidneys, by glomerular filtration and it is therefore likely that active drug secretion occurs. In patients with renal impairment, its elimination half-life is unchanged, but systemic clearance is reduced by one-third, so dose adjustments are required. Age and sex have a significant effect on dose corrected amisulpride plasma concentrations, which are higher in older

patients and in women, possibly because of a sex difference in the drug's renal clearance. Co-medication with lithium and clozapine increases dose-corrected amisulpride plasma concentrations. As in the case of most antipsychotics, patients commonly show great interindividual variance in plasma amisulpride concentrations<sup>13</sup>. Amisulpride plasma concentration is closely correlated with dose, dopamine occupancy, response and extrapyramidal symptoms (EPS). The plasma concentration threshold for response appears to be approximately 200 ng/mL and EPS are more reliably predicted by plasma level above 320 ng/mL than by dose<sup>41</sup>. TDM of amisulpride seems very useful for clinical decision making<sup>42</sup>.

**Ziprasidone:** its oral bioavailability is 60% but the duration and extent of ziprasidone absorption may be as much as doubled in the presence of food, whereas its elimination half-life is shorter than under fasting conditions. Ziprasidone is highly bound to plasma proteins (>99%), primarily albumin and alpha1-acid glycoprotein. Its pharmacokinetics seem to be linear, the elimination half-life has been reported to be 8-10 hours. Steady-state concentrations are achieved within 2-3 days of administration. Ziprasidone is highly metabolised by CYP3A4 and aldehyde oxidase, with <5% of the administered dose being excreted in an unchanged form<sup>13, 15</sup>. Clinical improvement or side effects did not correlate significantly with doses or serum levels. However, great interindividual and intraindividual differences in ziprasidone concentrations were observed. TDM of ziprasidone may be used for individual dose adjustments and monitoring medication adherence<sup>43, 44</sup>. The available PET studies with ziprasidone suggest that an antipsychotic effect can be expected above a threshold level of approximately 50 ng/ml. Levels above 200-250 ng/mL might be associated with a higher incidence of extrapyramidal symptom<sup>36</sup>.

**Aripiprazole:** It is well absorbed, its oral bioavailability is 87% and  $C_{max}$  is reached after 3-5 hours of administration. It is extensively bound to plasma proteins (>99%), primarily to albumin. The elimination half-life is 47-68 hours, steady-state plasma concentrations being reached by day 14. A linear pharmacokinetic profile has been observed. Aripiprazole is metabolised in the liver via CYP3A4 and CYP2D6, primarily as a result of dehydrogenation, hydroxylation and N-dealkylation. At steady state, 40% of the plasma

aripiprazole concentration is represented by the major active metabolite dehydro-aripiprazole<sup>13</sup>.

The dose range for aripiprazole is well defined, and it reliably predicts plasma level, dopamine receptor occupancy, and clinical response. Plasma level variation appears to have minimal impact on clinical response, but it may predict some adverse effects. Therapeutic drug monitoring has limited value in the clinical use of aripiprazole, but it may be useful in assuring adherence and optimizing response in individuals<sup>45</sup>.

**Sertindole:** it is well absorbed when administered orally, its bioavailability is 75%. It is 99,5% bound to plasma proteins,  $C_{max}$  is reached after 8-12 hours. The mean elimination half-life is 85-99 hours and steady state are achieved after 15-20 days. The results of in vivo experiments suggest that the metabolism of sertindole is principally mediated by CYP3A4 and CYP2D6 and the known variability of these two isoenzymes probably contributes to the observed variability in the pharmacokinetics of sertindole. It is metabolised to two compounds, dehydro-sertindole (active) and nor-sertindole. Care is needed when calculating effective doses in patients with hepatic insufficiency. It would be useful to follow plasma sertindole concentrations in case of overdose, because of its long elimination half-life (3-5 days) and capacity to prolong the QT interval<sup>13</sup>. Concentration dependent increase of QT interval by blockade of potassium channels is also reported<sup>28</sup>. Basic characteristic and enzymes involved in the metabolism of atypical antipsychotic drugs are presented in Tables 2 and 3.

The TDM group of the Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) has published literature-based guidelines for optimal use of TDM in psychiatry and defined 4 levels of recommendation, based on empirical evidence: level 1 - strongly recommended, level 2 – recommended, level 3 – useful, and level 4 - potentially useful (Table 4 ). So called the “laboratory alert levels” indicate drug concentrations above the recommended reference range that causes the laboratory to feedback immediately to the prescribing physician. The laboratory alert should lead to dose reduction when the patient exhibits signs of intolerance or toxicity. When the high drug concentration is well tolerated by the patient and if dose reduction bears the risk of symptom exacerbation, the dose should remain unchanged. For a number of psychoactive drugs, metabolites actively contribute to the overall clinical effect of the parent

compound. For this reason, TDM must include the quantification of active metabolites, e. g., in the case of risperidone. The analysis of pharmacologically inactive metabolites, however, may give useful information on the metabolic state of the patient or on his/her compliance. Table 5 shows the “normal” ratios of concentrations of metabolites to parent drugs. Calculated ranges contain 68% of the ratios expected under standard dosages, i. e., ratios within the range of the mean  $\pm$  1 SD assuming normal distribution. A ratio above or below the “normal ratio” can indicate problems of drug adherence or metabolic abnormalities due to a genetic variation or a drug-drug interaction with co-medications exhibiting enzyme inhibiting or inducing properties. In a patient who is genotyped as a poor or ultrarapid metabolizer the medication should not automatically be replaced by another, but the dose can often be adapted, using clinical judgement and TDM. AGNP recommends regular monitoring of plasma concentrations under maintenance therapy, at least every 3-6 months, to prevent relapses and rehospitalizations. The frequency of TDM requests may be increased if patients are known to be non-adherent to the medication or in case of changes of co-medications or of smoking that affect the pharmacokinetics of the drug. As a rule, trough concentrations are measured, but in some situations peak concentrations would show a better correlation with adverse effects. Blood should be collected after at least 4 drug elimination half-lives after the start of or a change in dosage. In clinical practice, the appropriate sampling time for most psychoactive drugs is one week after stable daily dosing and immediately before ingestion of the morning dose. TDM of antipsychotics is also useful when medication is switched from the oral to the depot form, or vice versa. For the treatment with antipsychotic drugs, there is good evidence that clinical non-improvement at week 2 is highly predictive for later response and remission. Especially the absence of early improvement appears to be a highly reliable predictor of later non-response. For dose titration with antipsychotic drugs is therefore recommend to include symptom rating by the treating physician at baseline and at week 2 in addition to TDM <sup>28</sup>. Plasma concentration determinations for antipsychotic drugs need to be carried out regularly even in patients on stable doses over a period of many months. Timely plasma concentration determinations of antipsychotics could enhance the physicians ability to optimize drug dosage and make dosage reductions in a more scientific manner than is the current standard of practice <sup>34</sup>. TDM of antipsychotic



drugs is the specific method of clinical pharmacology for monitoring of the therapy using measurement of drug serum concentrations followed by interpretation and good cooperation with clinician. It is able to help in personalized medicine in area of dosing individualization because of rational therapy, minimalization of side effects, decrease of mortality and morbidity and reduction of cost of health care. Phenotyping and genotyping can increased therapeutic drug monitoring on higher level <sup>46</sup>.

In conclusion, TDM of antipsychotic drugs is a powerful tool that allows to tailor-made treatment to the specific needs of individual patients. It can help in monitoring adherence, in dose adjustment, in minimizing the risk of toxicity and in cost-effectiveness in the treatment of psychiatric disorders.

**Table 1.** Effect of various selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and antiepileptics on plasma concentrations of antipsychotics – only data from controlled studies are used <sup>15</sup>

<b>antipsychotic</b>	<b>SSRIs:</b>	<b>effect on plasma levels</b>	<b>antiepileptic:</b>	<b>effect on plasma levels</b>
<b>clozapine</b>	fluoxetine	increase (40–70%)	carbamazepine	decrease (50%)
	paroxetin	increase (20–40%)	valproic acid	no change/minimal increase
	fluvoxamine	increase (up to 5–10 times)	phenobarbital	decrease (30–40%)
<b>risperidone</b>	fluoxetine	increase (75%)	carbamazepine	decrease (50–70%)
	paroxetine	increase (40–50%)		
	fluvoxamine	minimal increase (10-20%)		
	sertraline	minimal increase		
<b>olanzapine</b>	fluoxetine	no change/minimal increase	carbamazepine	decrease (30–70%)
	fluvoxamine	increase (up to 100%)	lamotrigine	no change/minimal increase
<b>quetiapine</b>			carbamazepine	decrease (80%)
			valproic acid	increase (70–80%)
			phenytoin	decrease (80%)
<b>aripiprazole</b>			valproic acid	decrease (20–30%)
<b>ziprasidone</b>			carbamazepine	decrease (20–40%)

**Table 2.** Basic characteristic of antipsychotic drugs <sup>13, 15, 28</sup>

drug	bioavailability (%)	protein binding (%)	T <sub>max</sub> (hours)	half-life (hours)	time to reach steady state (days)
amisulpride	50	17	1-4	12-20	2-3
aripiprazole	87	>99	3-5	47-68	14
clozapine	27-50	95	1-4	9-17	7-10
olanzapine	60	93	6	21-54	5-10
paliperidone	28	74	24	23	4-5
quetiapine	70	83	1-1,5	5-8	2-3
risperidone	70-85	89	1	EM: 3; PM: 22	4-6
sertindole	75	>99	8-12	85-99	15-20
ziprasidone	60	>99	6-8	8-10	2-3

EM = extensive metabolizer, PM = poor metabolizer, T<sub>max</sub> = time to reach maximum plasma concentrations

**Table 3.** Enzymes involved in the metabolism of antipsychotic drugs <sup>13, 15, 28</sup>

drug	enzymes responsible for metabolism	active metabolite
amisulpride	excretion via the kidney	
aripiprazole	CYP3A4, CYP2D6	dehydroaripiprazole
clozapine	CYP: 1A2, 2C19, 3A4, 2D6 UGT: 1A1, 1A3, 1A4	norclozapine, clozapine-N-oxide
olanzapine	CYP: 1A2, 2D6, 3A4 UGT: 1A4, 2B10 flavin monooxygenase	
quetiapine	CYP3A4, CYP2D6	
risperidone	CYP2D6, CYP3A4	9-hydroxy-risperidone
sertindole	CYP3A4, CYP2D6	dehydrosertindole
ziprasidone	CYP3A4, aldehyde oxidase	

CYP = cytochrome P450, UGT = uridine diphosphate-glucuronosyltransferase

**Table 4.** Recommended therapeutic reference ranges, laboratory alert levels and levels of recommendation for therapeutic drug monitoring<sup>28</sup>

<b>drug</b>	<b>level</b>	<b>therapeutic reference range (ng/mL )</b>	<b>laboratory alert level (ng/mL )</b>
amisulpride	1	100-320	640
aripiprazole	2	150-500	1000
clozapine	1	350-600	1000
olanzapine	1	20-80	150
paliperidone (9-hydroxyrisperidone)	2	20-60	120
quetiapine	2	100-500	1000
risperidone + 9-hydroxyrisperidone	2	20-60	120
sertindole	2	50-100	200
ziprasidone	2	50-200	400

**Table 5.** Ranges of metabolite-to-parent drug concentration ratios <sup>28</sup>

drug	metabolite	ratios of concentrations metabolite/parent drug (mean - SD - mean + SD)
aripiprazole	dehydroaripiprazole	0,3-0,5; PM of CYP2D6: 0,2
clozapine	norclozapine	non smokers: 0,5-0,6; smokers: 0,4-0,7
olanzapine	N-demethylolanzapine	non smokers: 0,1-0,3; smokers: 0,2-0,4
quetiapine	norquetiapine	0,1-3,8
risperidone	9-hydroxy-risperidone	CYP2D6: EM/IM 1,5-10,0; PM≤1
risperidone depot	9-hydroxy-risperidone	EM: 1,2-4,3
sertindole	dehydrosertindole	1,1-2,7; PM of CYP2D6: 1,0

EM = extensive metabolizer, IM = intermediate metabolizer, PM = poor metabolizer, CYP = cytochrome P450

### **Abbreviations**

9-OH-RSP - 9-hydroxyrisperidone

AGNP - The TDM group of the Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie

C/D - concentration/dose ratio

C<sub>max</sub> - maximum plasma concentration

CYP - cytochrome P450

EM - extensive metabolizer

EPS - extra-pyramidal symptom

IM - intermediate metabolizer

PET - Positron Emission Tomography

PM - poor metabolizer

SSRIs - selective serotonin reuptake inhibitors

TDM - therapeutic drug monitoring

T<sub>max</sub> - time to reach maximum plasma concentrations

UGT - uridine diphosphate-glucuronosyltransferase

### **Financial support**

Authors certify non-financial support.

### **Potential reviewers**

prof. MUDr. Eva Češková, CSc.

Masarykova univerzita

Lékařská fakulta

Psychiatrická klinika

Jihlavská 340/20

625 00 Brno

eceskova@fnbrno.cz, eceska@med.muni.cz

prof. MUDr. Milan Kriška, DrSc.

Ústav farmakológie a klinickej farmakológie  
Lekárska fakulta Univerzity Komenského  
Sasinkova 4  
811 08 Bratislava  
[milan.kriska@fmed.uniba.sk](mailto:milan.kriska@fmed.uniba.sk)

prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.  
Ústav farmakologie  
Lékařská fakulta Univerzity Palackého  
Hněvotínská 3  
775 15 Olomouc  
[anzen@tunw.upol.cz](mailto:anzen@tunw.upol.cz)

**CONFLICT OF INTEREST STATEMENT:**

Authors certify that the article has not been published previously in whole or part, except in abstract form. Authors advise that there are not any actual or potential (especially within 3 years of beginning the work submitted) financial or other conflict of interest related to the submitted manuscript (ownership, equity position, stock options, consulting fees, patent rights, and corporate affiliations) associated with any drug, product, process, or commercial laboratory mentioned in the submitted material. Authors acknowledge that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and accept responsibility for the data presented.



## References:

1. World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 update. [Accessed February 16, 2012]. Available from: [www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html).
2. Muscatello MR, Bruno A, Pandolfo G, Micò U, Settineri S, Zoccali R. Emerging treatments in the management of schizophrenia - focus on sertindole. *Drug Des Devel Ther* 2010;4:187-1.
3. Kane JM, Correll CU. Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2010;71(9):1115-4.
4. Stahl S. *Essential Psychopharmacology of Antipsychotics and Mood Stabilizers*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2002.
5. Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs* 2005;19(Suppl 1):1-93.
6. Herrmann N, Lanctot KL. Do atypical antipsychotics cause stroke? *CNS Drugs* 2005;19:91-3.
7. Luft B, Taylor D. A review of atypical antipsychotic drugs versus conventional medication in schizophrenia. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:1739-8.
8. Huffman JC, Alpert JE. An approach to the psychopharmacologic care of patients: antidepressants, antipsychotics, anxiolytics, mood stabilizers, and natural remedies. *Med Clin North Am* 2010;94:1141-60.
9. Hiemke CH, Dragicevic A, Gründer G, Hättter S, Sachse J, Vernaleken I, Müller MJ. Therapeutic monitoring of new antipsychotic drugs. *Ther Drug Monit* 2004;26(2):156-60.
10. Farde L, Nordström AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49:538-4.
11. Nyberg S, Nordström AL, Halldin C, Farde L. Positron emission tomography studies on D2 dopamine receptor occupancy and plasma antipsychotic drug levels in man. *Int Clin Psychopharmacol* 1995;10(Suppl 3):81-5.

12. Perry PJ. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotics. Is it of potential clinical value? *CNS Drugs* 2000;13:167-1.
13. Mauri MC, Volonteri LS, Colasanti A, Fiorentini A, De Gaspari IF, Bareggi SR. Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics. A critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:359-8.
14. Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G. Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 2008;9(5):410-8.
15. Spina E, de Leon J. Metabolic Drug Interactions with Newer Antipsychotics: A Comparative Review. *Basic Clin Pharmacol* 2007;100:4–22.
16. Carrillo JA, Herraiz AG, Ramos SI, Benítez J. Effects of caffeine withdrawal from the diet on the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1998;18(4):311-6.
17. Erickson-Ridout KK, Sun D, Lazarus P. Glucuronidation of the second-generation antipsychotic clozapine and its active metabolite N-desmethylclozapine. Potential importance of the UGT1A1 A(TA)7TAA and UGT1A4 L48V polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22(8):561-6.
18. Leon J. Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry. *Int J Neuropsychoph* 2003;6: 57–2.
19. Liston HL, Markowitz JS, DeVane CL. Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *J Clin Psychopharm* 2001;21(5):500-5.
20. Khan AY, Preskorn SH. Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiatr Pract* 2005;11(5):289-1.
21. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Scordo MG, Ancione M, Madia AG, Ventimiglia A, Perucca E. Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology* 2000;148:83–9.

22. Perry PJ, Miller DD, Arndt SV, Cadoret RJ. Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 1991;148:231-5.
23. Olesen OV, Thomsen K, Jensen PN, Wulff CH, Rasmussen NA, Refshammer C, Sørensen J, Bysted M, Christensen J, Rosenberg R. Clozapine serum levels and side effects during steady state treatment of schizophrenic patients: a cross-sectional study. *Psychopharmacology* 1995;117:371-8.
24. Freeman DJ, Oyewumi LK. Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy? *Clin Pharmacokinet* 1997;32:93-100.
25. Lin SK, Su SF, Pan CH. Higher plasma drug concentration in clozapine-treated schizophrenic patients with side effects of obsessive/compulsive symptoms. *Ther Drug Monit* 2006;28(3):303-7.
26. van der Molen-Eijgenraam M, Blanken-Meijs JT, Heeringa M, van Grootheest AC. Delirium due to increase in clozapine level during an inflammatory reaction. *Ned Tijdschr Geneesk* 2001;145(9):427-30.
27. Ozdemir V, Kalow W, Posner P, Collins EJ, Kennedy JL, Tang BK, Albers LJ, Reist C, Roy R, Walkes W, Afra P. CYP1A2 activity as measured by a caffeine test predicts clozapine and active metabolite steady-state concentration in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21(4):398-7.
28. C. Hiemke, P. Baumann, N. Bergemann, A. Conca, O. Dietmaier, K. Egberts, M. Fric, M. Gerlach, C. Greiner, G. Gründer, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, E. Jaquenoud Sirot, H. Kirchherr, G. Laux, U. C. Lutz, T. Messer, M. J. Müller, B. Pfuhlmann, B. Rambeck, P. Riederer, B. Schoppek, J. Stingl, M. Uhr, S. Ulrich, R. Waschgl, G. Zernig. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011;44:195-5.
29. Češková E. Zlepší monitorování krevních hladin adherenci a efekt léčby u schizofrenie? *Psychiatr praxi* 2011;12(4):166-8.
30. Citrome L. Oral paliperidone extended-release: chemistry, pharmacodynamics, pharmacokinetics and metabolism, clinical efficacy, safety and tolerability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(7):873-8.

31. Janicak PG, Winans EA. Paliperidone ER: a review of the clinical trial data. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007;3(6):869–7.
32. Seto K, Dumontet J, Ensom MH. Risperidone in schizophrenia: is there a role for therapeutic drug monitoring? *Ther Drug Monit* 2011;33(3):275-3.
33. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Salemi M, Scordo MG, Ancione M, Madia AG, Perucca E. Relationship between plasma risperidone and 9-hydroxyrisperidone concentrations and clinical response in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology* 2001;153:238–3.
34. Darby JK, Pasta DJ, Wilson MG, Herbert J. Long-term therapeutic drug monitoring of risperidone and olanzapine identifies altered steady-state pharmacokinetics: a clinical, two-group, naturalistic study. *Clin Drug Investig* 2008;28(9):553-4.
35. Erickson-Ridout KK, Zhu J, Lazarus P. Olanzapine metabolism and the significance of UGT1A448V and UGT2B1067Y variants. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(9): 539-1.
36. Gründer G, Hiemke C, Paulzen M, Veselinovic T, Vernaleken I. Therapeutic plasma concentrations of antidepressants and antipsychotics: lessons from PET imaging. *Pharmacopsychiatry* 2011;44(6):236-8.
37. Gefvert O, Bergström M, Långström B, Lundberg T, Lindström L, Yates R. Time course of central nervous dopamine-D2 and 5-HT2 receptor blockade and plasma drug concentration after discontinuation of quetiapine (Seroquet) in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology* 1998;135:119-6.
38. Mauri MC, Fiorentini A, Volonteri LS. Quetiapine in acute psychosis and personality disorders during hospitalization: assessment of a therapeutic range. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14(S3):283-4.
39. Fabre JR, Arvanitis L, Pultz J, Jones VM, Malick JB, Slotnick VB. ICI 204.636. a novel atypical antipsychotic: early indication of safety and efficacy in patients with chronic and subchronic schizophrenia. *Clin Ther* 1995; 17:366-8.
40. Small JG, Hirsch SRM, Arvanitis LA, Miller BG, Link CG. Quetiapine in patients with schizophrenia: a high- and low-dose double blind comparison with placebo. *Arch Gen Psych* 1997; 54: 549-7.

41. Sparshatt A., Taylor D, Patel MX, Kapur S. Amisulpride - dose, plasma concentration, occupancy and response: implications for therapeutic drug monitoring. *Acta Psychiatr Scand* 2009;120:416-8.
42. Müller MJ, Regenbogen B, Härtter S, Eich FX, Hiemke C. Therapeutic drug monitoring for optimizing amisulpride therapy in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2007;41(8):673-9.
43. Vogel F, Gansmüller R, Leiblein T, Dietmaier O, Wassmuth H, Gründer G, Hiemke C. The use of ziprasidone in clinical practice: analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects from data of a drug monitoring survey. *Eur Psychiatry* 2009;24(3):143-8.
44. Chermá MD, Reis M, Hägg S, Ahlner J, Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of ziprasidone in a clinical treatment setting. *Ther Drug Monit* 2008;30(6):682-8.
45. Sparshatt A, Taylor D, Patel MX, Kapur S. A systematic review of aripiprazole-dose, plasma concentration, receptor occupancy, and response: implications for therapeutic drug monitoring. *J Clin Psychiatry* 2010;71:1447-6.
46. Grundmann M, Kacirova I. Significance of TDM, phenotyping and genotyping for the correct drug dosage. *Cas Lek Ces* 2010;149:482-7.

**Cover letter**

October 10, 2012

To Whom It May Concern:

Let me send to you a manuscript of our paper with the title: **Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antipsychotic drugs.**

Antipsychotic medication is the primary intervention for the stabilization of acute psychotic episodes and the prevention of recurrences and relapses in patients with a severe psychiatric disorder schizophrenia. Therapeutic drug monitoring of antipsychotic drugs is the specific method of clinical pharmacology using measurement of drug serum concentrations followed by interpretation and good cooperation with clinician. It is able to help personalized medicine in dose adjustment according to the characteristics of the individual patient, in minimizing the risk of toxicity, in monitoring adherence and in cost-effectiveness in the treatment of psychiatric disorders. Although there is sufficient evidence of the benefits of therapeutic drug monitoring for optimizing antipsychotic therapy, its current use in routine care is far from optimal. The article completes new TDM and pharmacokinetic information about antipsychotic drugs and would like to help to introduce TDM in the routine personalized pharmacotherapy.

Sincerely,

Milan Grundmann, MD, PhD (corresponding author)

Department of Clinical Pharmacology

Faculty of Medicine University of Ostrava

Syllabova 19

703 00 Ostrava

Czech Republic

telephone number: +420 59 737 4389

fax number: +420 59 737 4393

e-mail address: [milan.grundmann@osu.cz](mailto:milan.grundmann@osu.cz)

Co-authors:

Ivana Kacirova, MD, PhD

Romana Urinovska, Mgr.

## **10. PUBLIKOVANÉ PRÁCE**



### I. Původní vědecké publikace in extenso v časopisech s IF

Uřinová R., Brozmannová H., Šišťák P., Šilhán P., Kacířová I., Lemr K., Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, J.Chromatogr. B, 907 (2012) 101-107, IF 2,888

### II. Původní vědecké publikace in extenso v recenzovaných vědeckých časopisech

Grundmann M., Uřinová R., Šilhán P., Kacířová I. Intoxikace venlafaxinem- využití TDM, fenotypizace a genotypizace, Klin Farmakol Farm, 2012; 90-92

### III. Přehledné vědecké publikace v časopisech s IF

Grundmann M., Kacířová I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic, 2013, 157, Epub ahead of print, IF 0,702

### IV. Přehledné práce v recenzovaných vědeckých časopisech

1. Uřinová R., Turjap M., Brozmannová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, Čes. Slov. Farm., 2010;59, 103-111
2. Kacířová I., Grundmann M., Uřinová R. Obecné zásady terapeutického monitorování hladin psychofarmak, Klin Farmakol Farm, 2012; 26(3):131-134
3. Klapková E., Uřinová R., Průša R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, Klin. Biochem. Metab., 2011; 1, p. 5–8.

### V. publikovaná abstrakta (pouze 1. autor)

1. Uřinová R., Brozmannová H., Grundmann M. První zkušenosti s analýzou psychofarmak metodou LC/MS. FONS Symposium klinické biochemie, 20.-21.9.2010, Pardubice, ISBN 978-80-903879-8-0
2. Uřinová R., Brozmannová H., Grundmann M. První zkušenosti s analýzou psychofarmak metodou LC/MS. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010, sborník abstraktů, ISBN 978-80-7368-715-1
3. Uřinová R., Brozmannová H., Šišťák P., Grundmann M. Determination of selected psychotropic drugs in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry. 5.

česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-7.5.2011, Ostrava, Klin Farmakol Farm, 2011;25 (suppl. 25):11; ISBN 978-80-87327-60-9

V. přednášky/postery přednesené na veřejných odborných fórech (pouze 1. autor)

1. Uřinová R., Brozmannová H., Grundmann M. První zkušenosti s analýzou psychofarmak metodou LC/MS. FONS Symposium klinické biochemie, 20.-21.9.2010, Pardubice, ISBN 978-80-903879-8-0

2. Uřinová R., Brozmannová H., Grundmann M. První zkušenosti s analýzou psychofarmak metodou LC/MS. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010, sborník abstraktů, ISBN 978-80-7368-715-1

3. Uřinová R., Brozmannová H., Šišťák P., Grundmann M. Determination of selected psychotropic drugs in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry. 5. česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-7.5.2011, Ostrava, Klin Farmakol Farm, 2011;25 (suppl. 25):11; ISBN 978-80-87327-60-9

4. Uřinová R., Šilhán P., Kacířová I., Grundmann M., Intoxikace venlafaxinem – kazuistika. 15. konference klinické farmakologie, 27.-30.6.2012, Štířín, sborník abstrakt, str. 22, ISSN 1805-4889

**Ostatní publikace**

I. Původní vědecké publikace in extenso v časopisech s IF

1. Kotaska K., Uřinová R., Klapková E., Prusa R., Rob L., Binder T. Re-Evaluation of Cord Blood Arterial and Venous Reference Ranges for pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, According to Spontaneous or Cesarean Delivery, J. Clin Lab. Analysis, 2010; 300–304

2. Klapková E., Kukacká J., Kotaska K., Suchanská I., Uřinová R., Prusa R., The Influence of 7-OH Methotrexate Metabolite on Clinical Relevance of Methotrexate Determination, Clin. Lab. 2011;57:599-606