

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí v analýze psychofarmak

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:	Mgr. Pavel Šišťík
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí disertační práce:	prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2018

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární parametry a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a vstřícnost během mého postgraduálního studia.

Rád bych také poděkoval všem svým kolegům na oddělení klinické farmakologie ve Fakultní nemocnici v Ostravě. Především RNDr. Haně Brozmanové, CSc. a Mgr. Romaně Uřinové Ph. D., které mi pomáhaly s realizací experimentů a řešením nejrůznějších analytických problémů. Nesmím zapomenout také na jejich ochotu a vstřícnost, které si moc vážím. Dále bych rád poděkoval primárce oddělení klinické farmakologie doc. MUDr. Ivaně Kacířové, Ph. D. za ochotu a vstřícnost během mého postgraduálního studia a za cenné rady týkající se farmakologického hodnocení pacientů.

Rád bych také poděkoval RNDr. Barboře Papouškové Ph. D., která mi pomáhala s návrhem a vyhodnocením experimentů zaměřeným na metabolity agomelatinu.

Děkuji RNDr. Marii Staňkové, Ph. D. z Ústavu soudního lékařství, oddělení klinické toxikologie za cenné rady a pomoc v oblasti úpravy biologického materiálu pro metabolomickou analýzu.

Chtěl bych také poděkovat prof. Ing. Janu Vackovi, Ph. D. a Mgr. Martině Zatloukalové Ph. D. za spolupráci a za kultivaci vzorků lidských hepatocytů pro analýzu metabolitů agomelatinu.

Nakonec bych rád poděkoval své rodině a blízkým za jejich podporu a nesmírnou obětavost.

SOUHRN

Dizertační práce se zabývá vývojem metod pro stanovení vybraných psychoaktivních látek v séru. Teoretická část dizertační práce je věnována terapeutickému monitorování, farmakologickým vlastnostem vybraných psychofarmak a metabolismu agomelatinu. Dále je pro tyto látky popsána problematika úpravy biologické matrice, jejich stabilita a analýza pomocí separačních technik se zaměřením na chromatografické metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Požadavky pro analýzu konkrétních psychofarmak vycházejí z potřeb terapeutického monitorování těchto látek na oddělení klinické farmakologie při Fakultní nemocnici v Ostravě. Pro nastavení vhodného dávkování léčiva, které zajistí koncentraci psychofarmaka v krvi zaručující požadovaný účinek a minimalizující riziko nežádoucích účinků, je třeba stanovovat jejich obsah v biologickém systému.

Vyvinuty a zavedeny do klinické praxe byly metody pro stanovení 12 psychofarmak a jednoho metabolitu v séru. Dnes jsou využívány pro potřeby terapeutického monitorování na oddělení klinické farmakologie ve Fakultní nemocnici v Ostravě. V návaznosti na dříve již vyvinutou metodu byly doplněny možnosti analýz, které jsou nabízeny oddělením a klinikám Fakultní nemocnice Ostrava a také ostatním centrům a ambulancím nacházející se nejen v ostravské spádové oblasti. V současnosti se na oddělení klinické farmakologie stanovuje kolem čtyřiceti psychoaktivních látek.

Z časového hlediska je proces úpravy vzorku, zejména v klinické laboratoři, velmi kritický. Cílem bylo použít minimálního objemu biologické matrice a současně jednoduchou a časově nenáročnou metodu úpravy vzorku. Pro analýzu bylo použito 200 μ l séra a jako postup úpravy vzorku byla zvolena metoda srážení proteinů. Pro detekci byly zvažovány a porovnávány dvě ionizační techniky, a to elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku. Pro všechna psychofarmaka: agomelatin, amisulprid, aripiprazol, dehydroaripiprazol, asenapin, haloperidol, flufenazin, flupentixol, iloperidon, melperon, vilazodon, ziprasidon a zotepin byla vybrána ionizace elektrosprejem. Limity detekce a kvantifikace byly pro všechny látky hluboko pod jejich terapeutickým rozmezím. Velkou výhodou bylo, že pro většinu analytů byly dodrženy podmínky úpravy vzorku, typ kolony a gradient mobilní fáze již na pracovišti používané. Pro analýzu haloperidolu bylo změněno složení mobilní fáze z důvodu nízké odezvy za stávajících podmínek. Výsledné metody byly validovány podle FDA kritérií a použity pro analýzu patientských vzorků v klinické laboratoři.

Další část práce byla zaměřena na identifikaci metabolitů agomelatinu v lidských hepatocytech. Po inkubaci dárcovských hepatocytů byla analýza provedena s využitím hmotnostních spektrometrů s vysokou rozlišovací schopností. Pro separaci byly testovány různé kolony. Výsledky analýz potvrdily dříve publikované metabolity. Nejlepší podmínky analýzy byly použity pro identifikaci metabolitů agomelatinu v patientských vzorcích krve a moči. Pro úpravu vzorků moči byly testovány čtyři postupy. Dříve publikované práce uvádějí čtyři hydroxy metabolity agomelatinu v jaterních mikrozomech. V námi analyzovaných patientských vzorcích moče bylo detekováno sedm hydroxy metabolitů agomelatinu. Vyvinutý postup bude využit pro analýzu dalších metabolitů agomelatinu.

SUMMARY

This dissertation thesis is focused on the development of methods for the determination of selected psychoactive drugs in human serum. The theoretical part of the dissertation describes the therapeutic drug monitoring, pharmacological properties of selected psychotropic drugs and the metabolism of agomelatine. The following text describes the problems of sample preparation from biological matrices, the stability of psychotropic drugs and their analysis by separation techniques focusing on chromatographic methods in combination with mass spectrometry detection. The requirements for the analysis of specific psychopharmaceuticals are based on the requirement of the Department of Clinical Pharmacology at the University Hospital Ostrava. In order to maximize the therapeutic effect and minimize the risk of adverse effects of the particular drug it is necessary to achieve the appropriate serum concentrations. Serum concentrations of the drug often correlate better with the therapeutic effect than the dose itself and therefore it is very useful to measure them.

The developed methods were used in clinical practice for the quantification of 12 psychotropic drugs and one metabolite in human serum. These methods are used for therapeutic monitoring purposes of the Department of Clinical Pharmacology at the University Hospital Ostrava. The previously developed method has been supplemented with new psychotropic drugs and the portfolio of established psychotropic drugs has been expanded. These analyses are offered by the departments and clinics at the Faculty Hospital in Ostrava as well as by other centers and outpatient clinics located not only in the Ostrava area. At present, around forty psychotropic drugs are quantified at the Department of Clinical Pharmacology.

Sample preparation step is a critical part of the analysis, because it is very time consuming. The aim was to use a minimum volume of the biological matrix for the analysis and to use a less time-consuming, simpler sample preparation method. 200 μ l of human serum was used for the analysis and the protein precipitation step was chosen as the sample preparation procedure. Two ionization techniques were tested and compared for the detection - electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mode. For all psychotropic drugs: agomelatine, amisulpride, aripiprazole, dehydroaripiprazole, asenapine, haloperidol, fluphenazine, flupentixol, iloperidone, melperon, vilazodone, ziprasidone and zotepine, electrospray ionization was chosen. The limits of detection and the limits of quantification were under the therapeutic range for all selected drugs. The great advantage of the methods

was that for most of the analytes, the sample preparation step, the type of the column and the gradient of elution was the same as in previously developed method. The composition of the mobile phase was changed for haloperidol because it had low response under the current conditions. The new developed methods were validated according to the FDA criteria and used for the analysis of patient samples in a clinical laboratory.

Another part of the doctoral thesis focused on the identification of metabolites of agomelatine in human hepatocytes. After the incubation of donor hepatocytes with agomelatine, the analysis was performed by high-resolution mass spectrometry. Various types of columns were tested for the chromatographic separation. The results of the analysis confirmed the presence of previously published metabolites. The analysis that gave the best results was used for the identification of agomelatine metabolites in patient blood and urine samples. We tested 4 sample preparation methods for urine samples. The previously published papers report four hydroxy metabolites of agomelatine in liver microsomes. In the patient samples we detected seven hydroxy metabolites of agomelatine. The developed procedure will be used for the analysis of additional metabolites of agomelatine.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	TERAPEUTICKÉ MONITOROVÁNÍ HLADIN LÉČIV	2
2.2	FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI PSYCHOFARMAK.....	3
2.3	METABOLISMUS XENOBIOTIK.....	11
2.3.1	<i>Metabolismus agomelatinu</i>	12
2.4	ANALÝZA PSYCHOFARMAK.....	15
2.4.1	<i>Úprava biologických vzorků</i>	15
2.5	STABILITA VYBRANÝCH PSYCHOFARMAK V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH	19
2.6	SEPARAČNÍ TECHNIKY A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V ANALÝZE PSYCHOFARMAK.....	22
2.6.1	<i>Chromatografie</i>	22
2.6.2	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	25
2.7	DISKUZE K TEORETICKÉ ČÁSTI	29
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	44
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1	STANOVENÍ VYBRANÝCH PSYCHOFARMAK PRO ÚČELY JEJICH TERAPEUTICKÉHO MONITOROVÁNÍ	45
4.1.1	<i>Současné stanovení deseti psychofarmak pro klinickou praxi</i>	45
4.1.2	<i>Stanovení haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu v séru</i>	53
4.2	IDENTIFIKACE METABOLITŮ AGOMELATINU.....	58
4.2.1	<i>Po inkubace lidských hepatocytů agomelatinem</i>	58
4.2.2	<i>Z patientských vzorků krve a moči</i>	62
4.2.3	<i>Úprava vzorků krve</i>	64
4.3	UHPLC/ESI-QQTOF MS.....	64
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	65
5.1	SOUČASNÉ STANOVENÍ DESETI PSYCHOFARMAK PRO KLINICKOU PRAXI.....	65
5.2	STANOVENÍ HALOPERIDOLU, FLUFENAZINU A FLUPENTIXOLU V SÉRU.....	72
5.3	IDENTIFIKACE METABOLITŮ AGOMELATINU ZE VZORKŮ LIDSKÝCH HEPATOCYTŮ.....	81
5.4	IDENTIFIKACE METABOLITŮ AGOMELATINU Z PACIENTSKÝCH VZORKŮ KRVE A MOČI	91
6	ZÁVĚR	101
	POUŽITÁ LITERATURA	102
	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	110
	ŽIVOTOPIS	113
	PŘÍLOHA A: PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY	I

1 ÚVOD

Vývoj a výroba nových léků a léčiv by se v dnešní době neobešla bez velmi citlivých analytických metod, které je dokáží identifikovat a kvantifikovat v nejrůznějších matricích. V této oblasti jednoznačně dominují separační metody a jejich spojení s nejrůznějšími typy detektorů. Jedním z nich je hmotnostní spektrometr, který díky své citlivosti a selektivitě umožňuje velmi rychlou analýzu širokého spektra látek.

Dizertační práce je zaměřena na vývoj nových metod pro stanovení vybraných psychofarmak v séru pro potřeby jejich terapeutického monitorování na oddělení klinické farmakologie při Fakultní nemocnici v Ostravě. Snahou bylo navázat na dříve již vyvinutou metodu, doplnit ji o nové látky a nabídnout ji oddělením a klinikám Fakultní nemocnice a také ostatním centrům a ambulancím nacházejícím se nejen ve spádové oblasti.

Záměrem bylo analyzovat minimální množství biologické matrice a současně použít jednoduchou a časově nenáročnou metodu úpravy vzorku. Výsledkem je validace metody a její použití v rutinní analýze patientských vzorků ve FN Ostrava.

Další část dizertační práce se zabývá identifikací metabolitů agomelatinu nejprve získaných kultivací s lidskými hepatocyty. Testovány byly různé experimentální podmínky a vyvinutá metoda byla následně použita pro identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích krve a séra pacientů.

Navržené postupy dokládají význam separačních metod a hmotnostní spektrometrie pro klinickou praxi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Podstatná část rešerše byla publikována formou přehledového článku [1].

2.1 Terapeutické monitorování hladin léčiv

Terapeutické monitorování hladin léčiv (therapeutic drug monitoring, TDM) je metoda klinické farmakologie sledující hladinu léčiv v biologické matrici (séru, plazmě a plné krvi) za účelem udržení takové koncentrace účinné látky v krevním oběhu, která je příznivá pro její žádaný účinek [2]. Podmínkou je úzký vztah mezi koncentrací léčiva v krvi a jeho farmakologickým účinkem. Proces terapeutického monitorování léčiva začíná stanovením jeho koncentrace v biologickém materiálu. Následuje farmakokinetická analýza s interpretací výsledků farmaceutem nebo farmakologem. Závěrem je doporučení dávky a dávkovacího intervalu, jeho aplikace a návrh na kontrolu, pokud je nezbytná. Každý jedinec vstřebává, metabolizuje a vylučuje léky s rozdílnou intenzitou v závislosti na pohlaví, věku, zdravotním stavu, genetické výbavě a vlivech jiných léčiv, která může užívat [2].

Předpoklady pro TDM jsou [3]:

- vztah mezi koncentrací léčiva a jeho klinickým efektem je těsnější než mezi dávkou a účinkem,
- účinek léčiva je obtížně klinicky měřitelný,
- léčivo má úzké terapeutické rozmezí (množství, které má zajistit efektivní účinek, se příliš neliší od množství, které může být neúčinné, nebo od množství, které může vyvolat vedlejší účinky nebo toxicitu)
- farmakokinetika nultého řádu,
- toxikologické důvody.

Využití TDM z hlediska pacienta je vhodné v těchto případech:

- kontrola užívání léku,
- změny při fyziologických stavech (dětství, stáří a těhotenství),
- změny při chorobných stavech (onemocnění ledvin, jater, srdeční selhávání, horečka),
- lékové interakce,
- nastavení vhodné dávky.

TDM se využívá pro kontrolu farmakoterapie u lékových skupin, jako jsou antibiotika (vankomycin, gentamycin, amikacin), bronchodilatancia (teofylin), antiepileptika (fenobarbital, fenytoin, kyselina valproová, klonazepam), cytostatika (metotrexat, busulfan),

kardiaka (amiodaron, digoxin), imunosupresiva (cyklosporin A, takrolimus, mykofenolát) a psychofarmaka (lithium, diazepam, antidepresiva, antipsychotika). Pokud jsou i metabolity léčiv účinné, měly by se také stanovovat [4].

2.2 Farmakologické vlastnosti psychofarmak

Léčivo se v krvi může vyskytovat ve volné formě (nevázané) a ve formě vázané na plazmatické proteiny. Stanovení volné frakce léčiva není nutné, pokud terapeutický účinek lépe odráží sledování celkové koncentrace léčiva. K tomu dochází pouze v případě, že nevázaná plazmatická frakce léčiva je stejná u všech pacientů. Pokud je však vazba léčiva na bílkoviny závislá na jeho koncentraci nebo se volná frakce léčiva u některých pacientů významně liší, je třeba to při TDM zohlednit. Tento případ může nastat např. při změně vazebné kapacity a/nebo afinity plazmatických proteinů k léčivům v důsledku určitých fyziologických nebo patofyziologických stavů nebo v důsledku vytěsnění z vazby na protein jiným léčivem. Stanovení volné formy léčiva může poskytnout lepší informace v případě, že je znám terapeutický / referenční rozsah volné frakce. Léčiva, která jsou významně vázána na plazmatické proteiny, budou s vysokou pravděpodobností vykazovat velké rozdíly v koncentracích volných frakcí u různých pacientů a jsou proto vhodnými kandidáty pro analýzu těchto frakcí. Výsledky monitorování léčiv by měly být vždy pečlivě vyhodnoceny zkušeným klinickým farmakologem nebo farmaceutem. Frakci volnou a vázanou lze oddělit dialýzou, ultrafiltrací nebo ultracentrifugací. Charakter vazby léčiva na protein je významný pro jeho farmakokinetiku i možnost vytěsnění z této vazby jiným léčivem [5].

V následující části jsou stručně uvedeny receptorové profily a farmakologické vlastnosti antidepresiv a antipsychotik, které jsou předmětem našeho zájmu.

Agomelatin (AGO) je jedno z nových antidepresiv s unikátním receptorovým profilem a představuje tak de facto novou skupinu antidepresiv. Agomelatin působí jako agonista na melatonergních MT₁ a MT₂ receptorech, což se projevuje resynchronizací cirkadiálních rytmů a zkracováním spánkové latence bez narušení architektury spánku. Současně působí jako antagonist na 5-HT_{2C} receptorech. To má za následek zvýšené uvolňování noradrenalinu a dopaminu specificky z neuronů frontálního kortexu, přičemž nejsou ovlivněny extracelulární koncentrace serotoninu ani zpětné vychytávání monoaminů [6].

Amisulprid (AMS) je atypické antipsychotikum benzamidové řady. Jeho vlastnosti naznačují, že by mohl působit jako parciální agonista na D₂ receptorech, přičemž na spektru D₂ aktivity má blízko k plnému antagonismu. Teoreticky při nižších dávkách blokuje presynaptické D₂ receptory a při vyšších dávkách postsynaptické D₂ receptory. Parciální agonismus může teoreticky snižovat uvolňování dopaminu ze synapsí při hyperaktivitě dopaminergního systému a naopak zvýšit uvolňování dopaminu, pokud jsou jeho koncentrace nízké [7]. Na rozdíl od jiných atypických antipsychotik nemá významnější afinitu k 5-HT_{2A} a 5-HT_{1A} receptorům. Antagonismus na 5-HT₇ a 5-HT_{2B} může přispívat k jeho účinkům [8].

Aripiprazol (ARP) atypické antipsychotikum patřící k derivátům fenylpiperazinu působí také jako stabilizátor nálady. ARP je parciálním agonistou na dopaminergních D₂ a D₃ a serotonergním 5-HT_{1A} receptoru, což jej odlišuje od mnoha ostatních atypických antipsychotik, D₂/5-HT_{2A} antagonistů, které jsou čistými antagonisty („silent antagonists“) na D₂ receptorech. ARP teoreticky snižuje uvolňování dopaminu ze synapsí při hyperaktivitě dopaminergního systému (a působí tak na pozitivní symptomy schizofrenie) a naopak zvyšuje uvolňování dopaminu, pokud jsou jeho koncentrace nízké (zlepšuje negativní, kognitivní a afektivní symptomatiku). Blokádou 5-HT_{2A} receptorů může v některých mozkových regionech přispívat k facilitaci dopaminergní transmise a redukovat tak extra pyramidové nežádoucí účinky (NÚ) a zřejmě i zlepšovat kognitivní a afektivní symptomy. Blokádou na 5-HT_{2C} a 5-HT₇ receptorech a parciální agonismus na 5-HT_{1A} receptorech může přispívat k antidepressivnímu působení léčiva. ARP postrádá významnější afinitu k muskarinovým M₁ a histaminovým H₁ receptorům. Hlavní metabolit dehydroaripiprazol (DARP) je psychofarmakologicky aktivní [9].

Asenapin (ASE) moderní atypické antipsychotikum a stabilizátor nálady s vlastnostmi smíšeného D₂/5-HT_{2A} antagonisty se řadí k dibenzooxepinovým derivátům. Blokádou D₂ receptorů odpovídá za redukci pozitivních symptomů a stabilizaci afektivních symptomů. Blokádou 5-HT_{2A} v některých mozkových regionech přispívá k facilitaci dopaminergní transmise a redukcí extrapyramidových NÚ a zřejmě i ke zlepšení kognitivní a afektivní symptomatiky onemocnění. Chemická podobnost s mirtazapinem znamená sdílení některých farmakologických vlastností. Antagonismus na 5-HT_{2C}, 5-HT_{1B/D}, 5-HT₇ a α₂-adrenergických receptorech a parciální agonismus na 5-HT_{1A} receptorech může přispívat k antidepressivní

aktivitě asenapinu [6]. Na rozdíl od všech ostatních antipsychotik je asenapin podáván sublingválně, kvůli velmi špatné biologické dostupnosti po perorálním podání.

Iloperidon (ILO) tento piperidiny-benzisoxazolový derivát je atypické antipsychotikum a stabilizátor nálady. ILO má jeden z nejjednodušších receptorových profilů mezi atypickými antipsychotiky, který je blízký „čistým“ $D_2/5\text{-HT}_{2A}$ antagonistům. Hlavním odlišením je potentní blokáda α_1 -adrenergních receptorů, která zřejmě přispívá k nízkému riziku extrapyramidových NÚ, ale i zvýšenému riziku ortostatické hypotenze. Určitá α_2 , $5\text{-HT}_{1B/D}$ a 5-HT_7 antagonistická aktivita a 5-HT_{1A} parciálně agonistická aktivita naznačuje antidepresivní potenciál léčiva [9].

Melperon (MLP) je burytofenonový derivát s velmi dlouhou historií. Jeho první použití se datuje do šedesátých let 20. století. Léčivo sdílí mnoho vlastností s klozapinem, zejména vysoký poměr vazebné afinity $5\text{-HT}_2/D_2$. Riziko extrapyramidového syndromu (extrapyramidal syndrome, EPS) je u melperonu nízké, stejně jako riziko rozvoje hyperprolaktinémie. Je potentním antagonistou na α_1 -adrenergních receptorech a má nízkou afinitu k M_1 -muskarinovým a H_1 -histaminovým receptorům [10, 11]. V některých zemích je využíván k léčbě abstinenčních příznaků při alkoholismu a stavů zmatenosti, úzkosti, agitovanosti, napětí, nočního neklidu a poruch spánku, zvláště u starších pacientů [12].

Vilazodon (VILA) svými receptorovými vlastnostmi definuje novou skupinu antidepresiv označovanou jako SPARI (serotonin partial agonist/reuptake inhibitor). Inhibuje zpětné vychytávání serotoninu neurony CNS s minimálním/žádným vlivem na zpětné vychytávání noradrenalinu a dopaminu. VILA působí současně jako parciální agonista na 5-HT_{1A} receptorech. Jeho efekt ústí ve facilitaci serotonergní transmise na synapsi a přispívá tak k antidepresivnímu efektu. Na postsynaptických 5-HT_{1A} receptorech může být tato aktivita teoreticky odpovědná za redukci sexuálních NÚ (uvolnění dopaminu v určitých regionech mozku). Riziko rozvoje serotoninového syndromu je zanedbatelné [8]. V ČR zatím není registrován.

Ziprasidon (ZIP) je benzyliothiazolylpiperazinový derivát řazený k atypickým antipsychotikům a stabilizátorům nálady se smíšenou $5\text{-HT}_{2A}/D_2$ antagonistickou aktivitou. Vykazuje určitou afinitu k množství receptorů, což přispívá k celkovému charakteru účinku.

Konkrétně aktivita na 5-HT_{2C} a 5-HT_{1A} receptorech může příznivě ovlivňovat kognitivní a afektivní symptomy. Interakce s 5-HT_{1D} a 5-HT₇ receptory, se serotoninovým a noradrenalinovým transportérem (zejména ve vyšších dávkách) může příznivě ovlivnit afektivní symptomy u některých pacientů [9]. Na rozdíl od mnohých dalších antipsychotik je zde pouze malé riziko zvýšení tělesné hmotnosti.

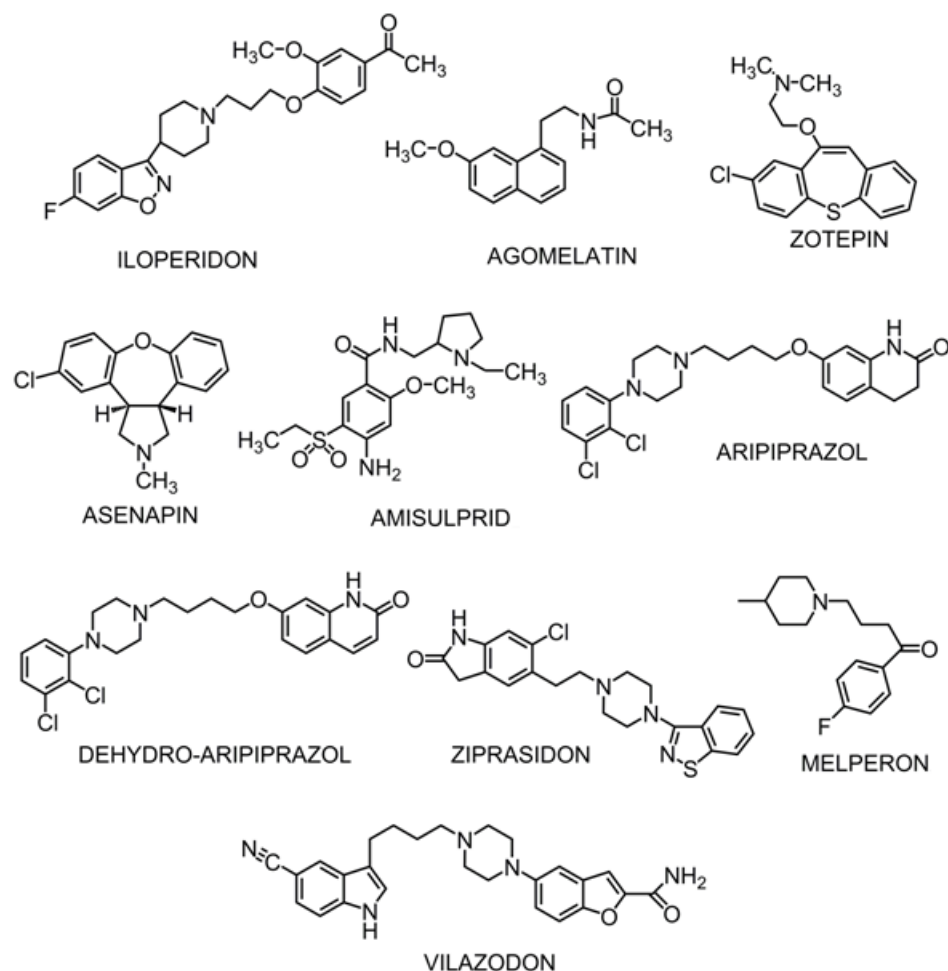
Zotepin (ZTP) je atypické antipsychotikum strukturně sice blízké klozapinu, ale s některými odlišnými farmakologickými a klinickými charakteristikami. Vedle antagonismu na 5-HT₂/D₂ receptorech specificky inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, s čímž může souviset jeho antidepressivní působení a příznivý vliv na kognitivní příznaky schizofrenie. Antagonismus na 5-HT_{2C} a 5-HT₇ receptorech naznačuje možnost příznivého vlivu na afektivní symptomy. Interakce s mnoha dalšími cílovými strukturami dotváří jeho farmakologický profil a profil NÚ. Metabolit norzotepin je psychofarmakologicky aktivní [8].

Haloperidol (HLP) je prototypem klasického butyrofenonového antipsychotika a před příchodem atypických antipsychotik byl jednou z nejpreferovanějších látek. Blokuje postsynaptické D₂ receptory, příznivě ovlivňuje pozitivní příznaky schizofrenie a zřejmě i kombativního, výbušného a hyperaktivního chování [13]. V nigrostriatálních drahách tato blokáda tlumí tiky a další projevy Tourettova syndromu. Klasické NÚ konvenčních antipsychotik jsou přičítány D₂ blokáde ve striatu, hypofýze (elevace prolaktinu) a excesivní blokáde (zejména ve vyšších dávkách) v mezolimbických a mezokortikálních dopaminergních drahách (zhoršení negativních a kognitivních symptomů). α_1 adrenergní blokáda může působit závratě, sedaci, sklony k hypotenzii [8]. Sedativní účinky haloperidolu jsou menší oproti mnohým konvenčním antipsychotikům, zejména fenothiazinů, extrapyramidové NÚ mohou být výraznější [14].

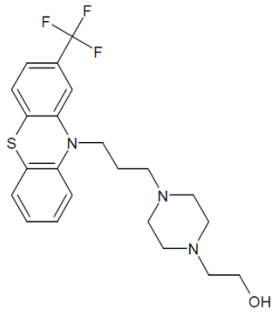
Flufenazin (FLF) je klasickým antipsychotikem fenothiazinové řady. Pozitivní příznaky schizofrenie jsou redukovány prostřednictvím D₂ blokády v mesolimbických dopaminergních drahách [8]. Léčivo také vykazuje významnou afinitu k 5-HT_{2A} receptorům. Nežádoucí účinky jsou vyvolávány stejnými receptorovými mechanismy jako u všech dalších klasických antipsychotik. Relativně vyšší může být výskyt EPS, akathisie a elevace prolaktinu, relativně menší pak anticholinergní NÚ, sedace, hypotenze [14]. V ČR je dostupný ve formě dekanoátu v depotní injekci, nicméně nástup účinku je relativně rychlý [15].

Flupentixol (FLP) je řazen mezi klasická antipsychotika thioxantenové řady. Jeho hlavní účinky i některé nežádoucí projevy jsou zprostředkovány, jako u dalších klasických antipsychotik, blokadou D₂ receptorů v mesolimbických, mezokortikálních, nigrostriatálních a tuberoinfundibulárních dopaminergních drahách [8]. Relativně vyšší může být výskyt EPS, méně potom sedace či hypotenze [14]. V nízkých dávkách může zlepšit projevy anxiety a deprese [16].

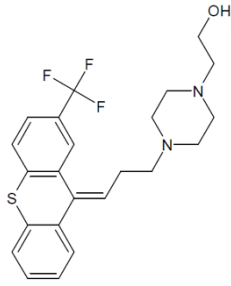
Obr. 1: Struktury antidepresiv a antipsychotik. Převzato z citace [1] a upraveno.



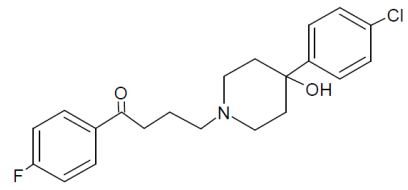
Obr. 1 - pokračování: Struktury flufenazinu, flupentixolu a haloperidolu



Flufenazin



Flupentixol



Haloperidol

Tab. 1: Farmakokinetické a TDM parametry vybraných psychofarmak [2, 14, 17-19]. Převzato z citace [1] a upraveno.

léčivo	vazba na proteiny (%)	biotransformace/transport	exkrece	biologický poločas $t_{1/2}$ (h)	terap. referenční rozmezí (ng/ml)	kritická koncentrace („laboratory alert level“)
agomelatin	95	v játrech převážně CYP1A2 a minoritně CYP2C19 a CYP3A4 na inakt. MTB, mohutný a variabilní FPE	močí (80 % jako MTB)	1-2	7 – 300 (1 – 2 h po 50 mg)	600
amisulprid	16	pouze v malém rozsahu, 2 inakt. MTB	> 90 % v nezměněné podobě močí	12 - 20	100 – 320	640
aripiprazol	> 99	V játrech via CYP2D6 a CYP3A4, MTB DARI aktivní (dosahuje ~ 40 - 45 % AUC mat. léčiva), substrát Pgp	výkaly (55%, ~18% v nezm. podobě); močí (25%, < 1% v nezm. podobě)	ARP: 75 (CYP 2D6 PM: 164), DARP: 94 (PO) 30 – 47 dnů (IM prod. uvolň.)	100 – 350 (ARP) 150 – 500 (ARP+DARP)	1000
asenapin	95	v játrech CYP1A2 a UGT1A4	močí (~50%), výkaly (~40%)	13 - 39	1 - 5	10
haloperidol	92	v játrech; z 50 – 60 % UGT, dále zejména CYP2D6 a CYP3A4, substrát Pgp	močí 30 % (1 % v nezm. podobě)	12 - 36	1 - 10	15
flufenazin	> 90	extenzivně v játrech zejména CYP2D6, substrát Pgp	močí i stolicí	16 (PO), ~14 dnů (dekanoát)	1 - 10	15
flupentixol	98 - 99	v játrech zejména CYP2D6, MTB inaktivní; významný FPE po PO podání	převážně výkaly, močí pouze 10 % (jako MTB)	20 - 40	0,5 – 5 (cis-isomer)	15
iloperidon	~ 97 (ILO), ~ 92 (akt. MTB)	v játrech CYP2D6 a CYP3A4; akt MTB: P88 a P95	močí (58% EMs, 45% PMs); výkaly (20% EMs, 22% PMs)	18 - 33	5 – 10 (ILO)	20
melperon	~ 32	v játrech na inaktivní metabolity	převážně močí (pouze malé množství v nezm. podobě)	4 - 6	30 - 100	200

Tab. 1 - pokračování: Farmakokinetické a TDM parametry vybraných psychofarmak [2, 14, 17-19]. Převzato z citace [1] a upraveno.

léčivo	vazba na proteiny (%)	biotransformace/transport	exkrece	biologický poločas $t_{1/2}$ (h)	terap. referenční rozmezí (ng/ml)	kritická koncentrace („laboratory alert level“)
vilazodon	~ 96 - 99	extenzivně v játrech převážně CYP3A4 a minoritně CYP2C19 a CYP2D6, substrát Pgp	močí (1% v nezm. podobě); výkaly (2% v nezm. podobě)	~ 25	28 - 63	-
ziprasidon	> 99	extenzivně v játrech, primárně non-CYP metabolickými cestami (aldehydoxidáza), minoritně CYP3A4 a CYP1A2 (< 1/3)	močí (~66%; < 4% v nezm. podobě); výkaly (~20%; < 1% v nezm. podobě)	6	50 – 200	400
zotepin	97	převážně CYP3A4, dále CYP1A2 a CYP2D6; akt. MTB norzotepin (dosahuje ~30 % AUC mat. léčiva), významný FPE	močí (~40%), výkaly (~60%), převážně jako inaktivní metabolity	13 - 16	10 – 150 (ZTP)	300

2.3 Metabolismus xenobiotik

Metabolismus xenobiotik má především za úkol odstranit z organismu látky, které jsou pro něj potenciálně škodlivé. V první fázi se zvyšuje polarita látky vnesením nebo odkrytím funkčních skupin pomocí oxidace, redukce nebo hydrolýzy. Změna struktury spojená s těmito ději může mít za následek také změnu účinku látky. Metabolity první fáze mohou být neúčinné, stejně účinné anebo více účinné než výchozí látka. V druhé fázi metabolismu dochází k vazbě vytvořených funkčních skupin z první fáze s funkčními skupinami endogenních polárních molekul (konjugace s glukuronovou kyselinou, glutationem, acetylací apod.). Výsledkem konjugačních reakcí druhé fáze je vytvoření polárního a snadno eliminovatelného produktu. Vzniklé konjugáty většinou nemají farmakologicky pozorovatelný účinek. V malém počtu případů však mohou vést konjugační reakce ke vzniku účinnějšího metabolitu a podílet se na toxických dějích. Někdy se do metabolismu xenobiotik zapojují proteiny s transportní funkcí, jejichž úkolem je přenášet metabolity z buňky ven do extracelulárního prostoru. Tyto transportéry jsou exprimovány v různých tkáních. Pro děje, kterých se zúčastňují, se používá název "metabolismus třetí fáze". Vzniklé metabolity jsou z těla nejčastěji vylučovány močí nebo žlučí [20]. Na metabolismu cizorodých látek se v organismu podílí celá řada různých enzymů, mezi nejdůležitější enzymové systémy patří cytochromy P450, flavinové monooxygenasa, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, peroxidasa, UDP-glukuronosyltransferasa, sulfotransferasa, N-acetyltransferasa a další [20].

Při studiu metabolismu jsou často používány zvířecí modely, především z etických důvodů se nestuduje přímo u lidí na úrovni organismu (nebo orgánů), ale lze využít lidské hepatocyty, lidské mikrosomální jaterní frakce (HLM), popř. rekombinantní lidské formy CYP. V takových případech však není zachován systém biochemicko-fyziologických vazeb.

Obecně z hlediska účinku léčiv je třeba znát jeho metabolity a jejich účinek na organismus, což platí i pro psychofarmaka. Před samotnou analýzou metabolitů je důležitá příprava vzorků a správný výběr analytické techniky. Odběr, příprava i skladování vzorků mají velký vliv na konečné složení, stabilitu vzorku a dosažené výsledky. V přípravě vzorků hraje důležitý krok zastavení všech biochemických dějů v buňce a inhibice enzymatických procesů, aby nedocházelo ke změnám hladin metabolitů [21]. Zastavení metabolismu se provádí pomocí tepelných změn (zmrazení v kapalném dusíku) nebo pomocí změny pH. Následuje zakoncentrování analytu a odstranění rušivých složek např. extrakcí. Samotná

analýza vzorku se dnes patrně nejčastěji provádí spojením chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce [21].

2.3.1 Metabolismus agomelatinu

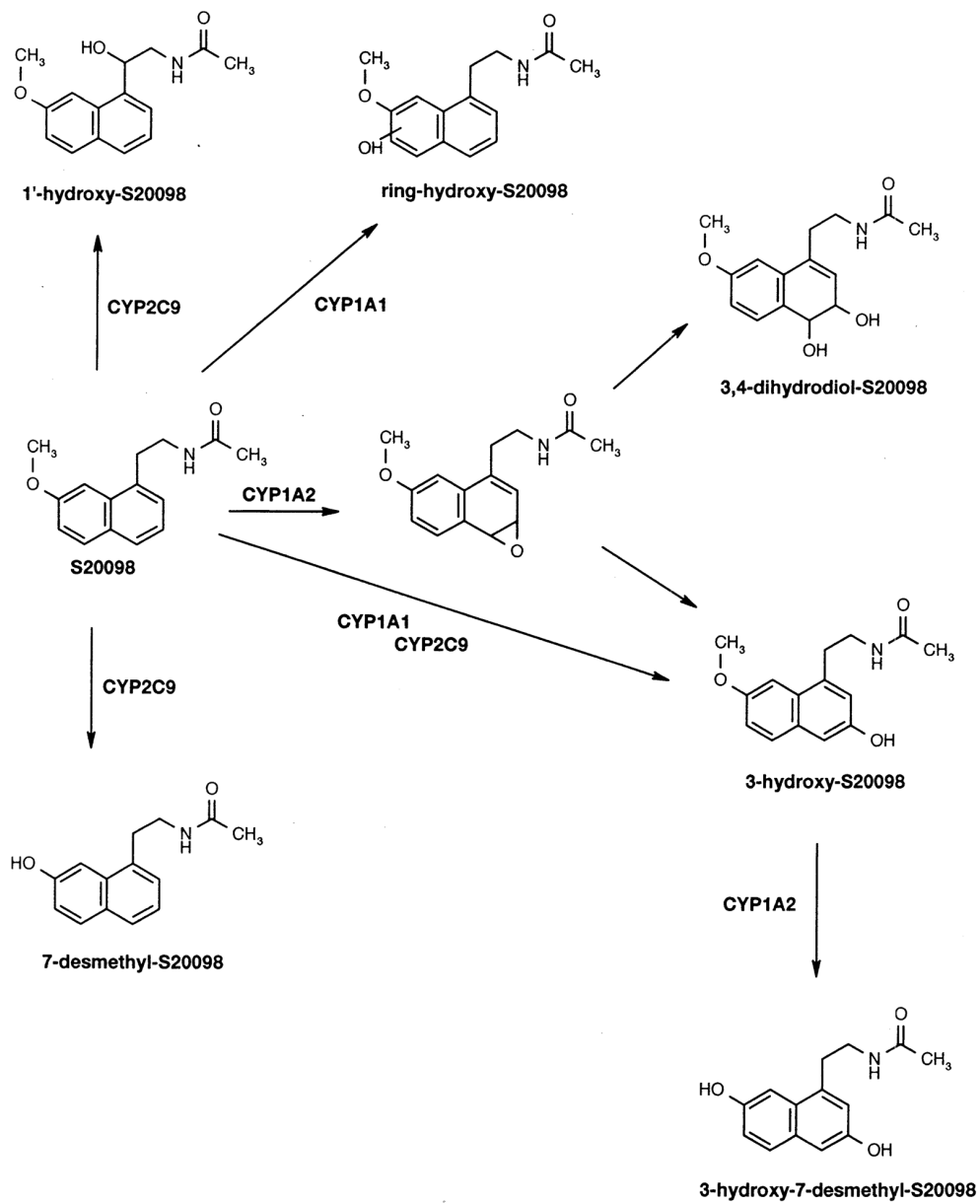
Po *peros.* podání se vstřebává až 80 % agomelatinu, maximální koncentrace v plazmě je dosaženo po 45-90 minutách. Biologická dostupnost je relativně nízká (< 5 %), na plazmatické bílkoviny se váže 95 % účinné látky. Agomelatin je metabolizován v játrech cytochromovým systémem CYP1A2. Hlavní metabolity jsou hydroxylovaný a demetylovaný agomelatin, jsou neúčinné, rychle se konjugují a vylučují močí. Poločas eliminace agomelatinu je 1 až 2 hodiny, močí se vyloučí 80 % agomelatinu, z velké části ve formě metabolitů [22].

Agomelatin je metabolizován zejména prostřednictvím cytochromu P450, izoenzymu 1A2 (CYP1A2) (90 %) a CYP2C9/19 (10 %). Léčiva, která interagují s těmito izoenzymy, mohou snížit nebo zvýšit biologickou dostupnost agomelatinu [23].

Byly publikovány dvě práce věnované identifikaci a kvantifikaci metabolitů agomelatinu. Liu a kolektiv [24] se zabývali identifikací metabolitů agomelatinu v lidských jaterních mikrozomech a v myších játrech, moči a výkalech. Metodou ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem kvadrupól-analyzátor doby letu (ultra performance liquid chromatography-quadropole-time of flight, UHPLC-QTOF) identifikovali celkem 38 metabolitů (tabulka 2), včetně tří aduktů AGO_NAc, sedmi aduktů AGO_GSH a dvou hydrazonů (M37 a M38). Studie popsala nové cesty bioaktivace AGO u myši a HLM. Tyto poznatky by mohly být využity pro další porozumění mechanismu nežádoucích účinků a možných lékových interakcí spojených s AGO.

Další studie agomelatinu [25] zkoumala, zda je možné předpovědět individuální variaci hladin léčiva v plazmě pomocí farmakokinetického modelování založeného výlučně na metabolických jaterních parametrech *in vitro*. Metabolity byly analyzovány pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie) s radiometrickou detekcí.

Obr. 2: Procesy biotransformace navržené pro agomelatin (S20098). Převzato z citace [25].



Tab. 2: Přehled metabolitů agomelatinu zjištěných v myších vzorcích (játra, moč, výkaly) a v lidských jaterních mikrozomech (HLM). Převzato z citace [24].

RT (min)	naměřená m/z	vypočítaná m/z	Chyba	Sumarní vzorec	metabolit	ID	vzorek
8.32	244.1335	244.1338	1.2	C ₁₅ H ₁₈ NO ₂	Agomelatine	AGM	HLM, moč, výkaly
6.83	260.1285	260.1287	0.8	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	O + AGM	M1	HLM, moč, výkaly
7.35	260.1286	260.1287	0.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	O + AGM	M2	HLM
7.69	260.1288	260.1287	0.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	O + AGM	M3	HLM
7.77	260.1283	260.1287	1.5	C ₁₅ H ₁₈ NO ₃	O + AGM	M4	HLM
7.17	230.1185	230.1181	1.7	C ₁₄ H ₁₆ NO ₂	AGM (-CH ₃)	M5	HLM
5.65	246.1126	246.1130	1.6	C ₁₄ H ₁₆ NO ₃	O + AGM (-CH ₃)	M6	HLM, výkaly
5.60	276.1232	276.1236	1.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M7	HLM
5.77	276.1233	276.1236	1.1	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M8	HLM
6.20	276.1232	276.1236	1.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M9	HLM, moč
6.36	276.1234	276.1236	0.7	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M10	HLM
6.48	276.1237	276.1236	0.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M11	HLM
6.58	276.1233	276.1236	1.1	C ₁₅ H ₁₈ NO ₄	2O + AGM	M12	HLM
4.41	300.1213	300.1212	0.4	C ₁₅ H ₁₉ NNaO ₄	2O + 2H + AGM + Na	M13	HLM
5.12	300.1214	300.1212	0.7	C ₁₅ H ₁₉ NNaO ₄	2O + 2H + AGM + Na	M14	HLM, moč, výkaly
4.71	262.1076	262.1079	1.2	C ₁₄ H ₁₆ NO ₄	2O + AGM (-CH ₃)	M15	HLM
4.93	262.1078	262.1079	0.4	C ₁₄ H ₁₆ NO ₄	2O + AGM (-CH ₃)	M16	HLM
5.18	262.1077	262.1079	0.8	C ₁₄ H ₁₆ NO ₄	2O + AGM (-CH ₃)	M17	HLM
6.19	274.1081	274.1079	0.8	C ₁₅ H ₁₆ NO ₄	3O + AGM (-H ₂ O)	M18	HLM
7.17	242.1184	242.1181	1.2	C ₁₅ H ₁₆ NO ₂	AGM (-2H)	M19	HLM
5.43	436.1598	436.1608	2.3	C ₂₀ H ₂₄ NO ₈	O + AGM + glu	M20	moč
5.69	436.1605	436.1608	0.7	C ₂₁ H ₂₆ NO ₉	O + AGM + glu	M21	moč
5.87	406.1497	406.1502	1.2	C ₂₀ H ₂₄ NO ₈	AGM + Glu (-CH ₃)	M22	moč
5.95	340.0852	340.0855	0.9	C ₁₅ H ₁₈ NO ₆ S	O + AGM + SO ₃ H	M23	moč
5.89	310.0744	310.0749	1.6	C ₁₄ H ₁₆ NO ₅ S	AGM + SO ₃ H (-CH ₃)	M24	moč
5.69	298.0753	298.0749	1.4	C ₁₃ H ₁₆ NO ₅ S	O + AGM + SO ₃ H (-CH ₃ CO)	M25	moč
5.50	466.1709	466.1713	0.9	C ₂₂ H ₂₈ NO ₁₀	2O + AGM + CH ₃ + glu	M26	moč
5.20	405.1474	405.1484	2.5	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₅ S	AGM_NAc_1	M27	moč, výkaly
5.40	405.1477	405.1484	1.8	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₅ S	AGM_NAc_2	M28	moč, výkaly
7.01	405.1478	405.1484	1.5	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₅ S	AGM_NAc_3	M29	moč, výkaly
4.25	581.1909	581.1917	1.4	C ₂₅ H ₃₃ N ₄ O ₁₀ S	AGM_GSH_1	M30	HLM
4.45	581.1906	581.1917	1.9	C ₂₅ H ₃₃ N ₄ O ₁₀ S	AGM_GSH_2	M31	HLM
4.55	551.1804	551.1812	1.5	C ₂₄ H ₃₁ N ₄ O ₉ S	AGM_GSH_3	M32	HLM
4.91	551.1800	551.1812	2.2	C ₂₄ H ₃₁ N ₄ O ₉ S	AGM_GSH_4	M33	HLM
5.34	551.1806	551.1812	1.1	C ₂₄ H ₃₁ N ₄ O ₉ S	AGM_GSH_5	M34	HLM
5.00	549.2013	549.2019	1.1	C ₂₅ H ₃₃ N ₄ O ₈ S	AGM_GSH_6	M35	Myší játra
6.31	549.2016	549.2019	0.6	C ₂₅ H ₃₃ N ₄ O ₈ S	AGM_GSH_7	M36	Myší játra
6.34	274.1169	274.1192	8.4	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₃	AGM_hydrazone_1	M37	HLM
5.37	260.1015	260.1035	7.7	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₃	AGM_hydrazone_2	M38	HLM

AGM, agomelatine; GSH, glutathion; NAc, N-acetyl cysteine; Glu, glukuronová kys.; -CH₃, demethylace; O+, monohydroxylace; 2O+, dihydroxylace; 3O+, trihydroxylace; -2H, dehydrogenace; +Na, sodný adukt

2.4 Analýza psychofarmak

2.4.1 Úprava biologických vzorků

Biologické vzorky představují složitý materiál, kde analyty jsou doprovázeny řadou složek matrice (lipidy, bílkoviny aj.). Pro analýzu psychofarmak v biologické matrici je většinou nutná předchozí úprava vzorku, která zahrnuje izolaci a/nebo prekoncentraci analytů, přičemž snahou je dosáhnout maximálního výtěžku s minimální přítomností interferujících látek [26].

Mezi rychlé metody úpravy vzorku patří srážení bílkovin (protein precipitation, PPT) a postup jednoduchého naředění biologické matrice. Ty však mohou způsobit naředění analytů a nemusí eliminovat matricový efekt [27].

Velmi často jsou využívány pro úpravu biologických vzorků extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE), extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) anebo jejich kombinace. Tyto postupy jsou však pracnější a časově náročnější. Proces přípravy vzorku zabírá 50-75% z celkové doby analýzy, která zahrnuje zpracování vzorku i vlastní analýzu. Většina technických inovací se v posledních letech spíše soustředila právě na samotnou analýzu, na část separační a detekční [28]. Z tohoto důvodu je nezbytný vývoj rychlých a spolehlivých metod úpravy vzorků. Ideální metoda přípravy vzorků by měla být rychlá, jednoduchá a zajišťovat stabilitu analytů během celého analytického procesu [29].

Přehled postupů zpracování biologických vzorků a chromatografických metod publikovaných pro vybraná antidepresiva a antipsychotika jsou uvedena v Tabulkách 3-13. Autoři využili různé extrakční techniky pro stanovení antidepresiv a antipsychotik z plné krve, plazmy a moči. Extrakce krve byla buď provedena přímo z plné krve [30] [31] [32] [33] nebo pomocí metody suché krevní kapky (dried blood spot, DBS) [34] [35]. Plazma byla přímo analyzována po vysrážení proteinů [36-39] nebo po SPE extrakci [40-46] či po LLE extrakci [32, 43, 47-58]. Analýza psychofarmak ze séra byla provedena po PPT metodě [59],[60, 61] nebo SPE extrakci [62] nebo po LLE extrakci [30].

Terapeutické monitorování psychofarmak se obvykle provádí analýzou plazmy, séra nebo plné krve. Moč je méně využívána, neboť obsah léčiva je vysoce závislý na množství vytvářené moči a jejím pH. Moč se využívá častěji v toxikologii [63]. Jako alternativu lze pro terapeutické monitorování nejrůznějších léků použít sliny. Jednou z hlavních výhod slin je jejich neinvazivní a bezbolestný odběr ve srovnání s častěji preferovanými invazivními odběry. Avšak jejich pH, perorální kontaminace, stimulovaný a nestimulovaný odběr slin

může ovlivnit přechod léčiva z plazmy do slin, jeho koncentraci a obsah doprovodných látek. Před stanovením léků ze slin musí být vždy ověřena korelace mezi koncentrací léku v plazmě a slinách. Vlasy, jako další možná matrice, se používají ve forenzních a toxikologických vědách, protože jsou stabilní a snadno se s nimi manipuluje. Analýzou vlasů lze odhalit zneužívání nejrůznějších léků a drog v konkrétním časovém úseku [64]. Plazma je nejběžnější matricí pro analýzu psychofarmak (používá se ve 41 metodách z 49 metod uvedených v tabulkách 3-13), následuje sérum, plná krev a moč.

V klinické praxi je TDM založeno na odběru venózních vzorků. Alternativou by se mohla stát analýza suché krevní kapky (dried blood spot, DBS). Odběr DBS se považuje za časově méně náročný a bolestivý. U DBS vzorků se odebírá menší objem krve a je menší biologické riziko během transportu, což je způsobeno snadným „domácím“ odběrem a také jednodušším a levnějším transportem běžnými poštovními službami [34]. Patteet a kolektiv použili DBS pro kvantifikaci patnácti antipsychotik a sedmi metabolitů pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS) [35].

Bez ohledu na použitý materiál je počet sledovaných analytů ovlivněn metodou přípravy vzorku. Většina publikovaných metod se soustředila na analýzu jednoho [36, 40-42, 47-54, 59, 65-68] nebo méně jak sedmi psychofarmak [43, 44, 55-58, 60, 69-71]. U některých aplikací se psychotropní látky analyzují v kombinaci s jinými léčivy [31, 45]. Několik článků se také zaměřuje na stanovení většího počtu psychofarmak společně s jejich metabolity [30, 32, 33, 37, 38, 46, 61, 62, 72]. Stanovení těchto metabolitů v biologických matricích může být výhodné i z klinického pohledu (lepší dávkování psychofarmak).

Díky lepší analytické instrumentaci (zlepšení citlivosti) se v posledních několika letech snížil objem biologických vzorků (hlavně krve a moči) pro stanovení antidepresiv a antipsychotik.

2.4.1.1 Srážení proteinů (PPT metoda)

Srážení bílkovin umožňuje uvolnění léčiva z vazby na protein (vázané frakce) a stanovení tzv. celkové koncentrace léčiva (tj. volné a vázané frakce). Bílkoviny můžeme srážet pomocí solí (síran amonný, chlorid sodný), iontů kovů (např. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}), neiontových polymerů (např. polyethylenglykol), organických rozpouštědel (např. acetonitril, methanol, aceton), kyseliny tannové, heparinu, dextran sulfátů, kationtovými polyelektrolyty

(např. protaminy), mastnými kyselinami s krátkým řetězcem (např. kyselina kaprylová) a pomocí trichloroctové a wolframové kyseliny [28]. Použití vyšší teploty, kyselého nebo alkalického pH a organických rozpouštědel může vést k denaturaci bílkovin. Pro srážení bílkovin v případě antidepresiv se používá acetonitril. Rovněž byl použit pro srážení bílkovin při stanovení amisulpridu, asenapinu, iloperidonu a dalších psychotropních látek v lidské plazmě [38] a plazmě krys [73]. Poměr plazmy a srážecího rozpouštědla 1:3 (v/v) vedlo u 9 psychofarmak a jejich metabolitů k extrakčním výtěžkům v rozmezí 65 až 96% s výjimkou asenapinu (extrakční výtěžek v rozmezí 46-50%) s relativní směrodatnou odchylkou (relative standard deviation, RSD) nižší jak 10% [38].

Okyselený acetonitril byl použit u vzorků mozkové tkáně [72]. Směs organických rozpouštědel (např. methanol:acetonitril v poměru 1:9 (v/v)) byla aplikována při stanovení ziprasidonu a dalších antidepresiv [37, 61]. Pro stanovení antidepresiv, antipsychotik a imunosupresiv se pro zvýšení účinku srážecí směsi přidává síran zinečnatý [74].

Vysrážení proteinů chrání HPLC kolonu před ucpáním, iontový zdroj hmotnostního spektrometru před kontaminací a snižuje negativní vliv matrice (potlačování ionizace) [29]. Vysrážené proteiny jsou z extraktu odstraněny centrifugací a/nebo filtrací. V některých případech je tento krok jediným postupem úpravy vzorku před vlastní analýzou. Běžné je také použití PPT a následné LLE nebo SPE.

Obecně bývá metoda PPT použita k analýze všech skupin antipsychotik a antidepresiv s extrakčními výtěžky vyššími než 90% [61].

2.4.1.2 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) se využívá k převedení analytů obsažených v kapalné biologické matrici (plazma, moč) do extrakčního rozpouštědla. Podmínkou je, aby obě kapalné fáze byly nemísitelné [75]. Extrakce látek a tedy i psychofarmak z vodné fáze závisí hlavně na rozpustnosti analytů v organickém rozpouštědle (je dána především polaritou analytů) a na pH vodné fáze (závisí na protolytických formách analytů). K eliminaci vlivu možných interferujících látek je často prováděna zpětná extrakce. Může však být použita i druhá extrakce s jiným typem organického rozpouštědla a/nebo změnou pH vodné fáze [29]. Použitím LLE snižujeme riziko potlačení ionizace analytů při detekci hmotnostní spektrometrií, rušící složky matrice (jako soli, proteiny, fosfolipidy) nejsou převedeny do extrakčního rozpouštědla nemísitelného s vodou. Nevýhodou LLE je

časová náročnost jednotlivých extrakčních kroků, možný vznik emulzí a zdravotní rizika vyplývající z použití některých organických rozpouštědel [76].

Ačkoliv jednoduché LLE metody nemusí vždy poskytovat vysoké extrakční výtěžky, umožňují dosáhnout dobré preciznosti a přesnosti měření [51]. Tato technika není vhodná pro extrakci směsi látek, které se liší svými fyz.-chem. vlastnostmi. Proto se provádí vícestupňová extrakce nejprve do kyselého a pak do bazického prostředí, nebo naopak. Extrakce kyselých nebo alkalických analytů by mělo být prováděno při pH o 2 jednotky vyšší nebo nižší než je hodnota pK_a příslušných látek [29].

V tabulkách č. 3-13 jsou uvedena použitá rozpouštědla a extrakční výtěžky (pokud byly autory uvedeny) pro vybraná antidepresiva a antipsychotika. Nejčastěji autoři provádějí úpravu pH pomocí alkalického činidla s následnou extrakcí pomocí různých rozpouštědel a nebo jejich kombinací z důvodu zlepšení přenosu analytů do organické fáze [69, 70]. Zhang zjistil, že přidáním 0,5 M Na_2HPO_4 ke vzorku před LLE isopropyletherem účinně neutralizuje psychofarmaka a zlepšuje jejich přenos z plazmy do organické vrstvy [70]. Autoři však zjistili, že vzorky mozkové tkáně vyžadují dvojnásobné množství tohoto základního fosfátového roztoku, aby bylo dosaženo srovnatelných výsledků jako ve vzorcích plazmy [69]. Použitelnost LLE byla prokázána v práci Patila a kolegů, kteří vyvinuli a validovali metodu pro stanovení agomelatinu. Během vývoje metody autoři zjistili, že extrakční výtěžky za použití ethyl-acetátu vykazuje lepší výsledky ve srovnání s metodou PPT používající acetonitril a methanol [52].

2.4.1.3 Extrakce na tuhé fázi

Výhodou extrakce tuhou fází (solid phase extraction, SPE) ve srovnání s LLE je účinnější oddělení analytů, snížení spotřeby organických rozpouštědel, snadnější sběr celé frakce analytů, zakoncentrování vzorku a snadnější automatizace. Na druhou stranu metody používající LLE poskytují stejné výsledky i za delší časové období z důvodu ne příliš odlišných různých šarží daného rozpouštědla, u SPE sorbentů mohou být odlišnosti významnější. Výsledky SPE jsou více ovlivněny strukturou analytů, a proto je metoda méně vhodná pro screening antidepresiv, které nejsou strukturně podobné. V takových aplikacích může být vhodnější extrakce kapalina-kapalina [29].

V Tabulkách č. 3-13 je uveden přehled SPE metod společně s extrakčními výtěžky (pokud je autoři uvedli) vybraných antidepresiv a antipsychotik. Šest prací používá SPE pro

úpravu vzorku při analýze psychofarmak z plazmy [40-43, 45, 46, 52], jedna metoda ze séra [62], jedna metoda z mozkové tkáň [72] a jedna metoda z lidské moče [44]. SPE sorbenty mohou využívat různých retenčních mechanismů. Nežádoucí adsorpce některých psychofarmak (např. ziprasidonu) na povrch plastových SPE kolonek anebo na chemicky neupravených skleněných materiálech mohou představovat vážný problém. Úpravou skleněné zkumavky pomocí 10% (v/v) hexamethyldisilazanem v ethylacetátu lze výrazně snížit tuto nežádoucí adsorpci [65].

2.5 Stabilita vybraných psychofarmak v biologických vzorcích

Nestabilita léčiv v biologických vzorcích může vážně ovlivnit spolehlivost naměřených výsledků bez ohledu na použitou analytickou instrumentaci. Stabilita léčiv by měla být testována během vývoje nové bioanalytické metody. Údaje o stabilitě obvykle bývají součástí validace metody a obsahují informace týkající se různých podmínek skladování biologického vzorku i extraktu. Někdy však mohou být údaje za delší časové období nedostatečné nebo zcela chybné. Stabilita léku v plazmě závisí na povaze biologického vzorku (zvířecí, lidský), čase, teplotě a pH [77].

Degradaci léčiv lze obvykle častěji pozorovat v biologické matici než v zásobních roztocích s čistým organickým rozpouštědlem nebo v „čistém“ extraktu po úpravě vzorku. Nestabilita v biologických vzorcích nastává především kvůli enzymatické aktivitě. Snížením teploty dochází nejen ke snížení aktivity enzymů, ale také k omezení spontánních chemických procesů. Dlouhodobé skladování plazmy je možné ve zmrazeném stavu [77].

Volbou vhodného pH lze snížit enzymatické i neenzymatické reakce. Bylo prokázáno, že přidáním malého množství vhodných pufrů (jako je fosfátový, citrátový a uhličitanový) k biologickému vzorku pro udržení optimálního pH lze zabránit degradaci léků. Úpravu pH je třeba pečlivě zvažovat, aby nedošlo ke srážení a degradaci složek obsažených v plazmě [77, 78]. Bylo pozorováno, že přidání antioxidantů pozitivně ovlivňuje stabilizaci některých analytů [77]. Fisher a kol. [79] úspěšně použili kyselinu askorbovou pro stabilizaci olanzapinu u patientských vzorků. Stabilita léků je důležitým parametrem pro transport vzorků do laboratoře z jiných nemocnic nebo laboratoří. Naše zkušenosti a experimenty jiných autorů [30, 33, 40, 52, 54, 61, 68, 79, 80] ukázaly, že stabilita vzorků plazmy studovaných antidepresiv byla dostatečná po dobu delší než 24 hodin, což je dostatečný čas pro doručení a analýzu vzorků v klinických laboratořích.

Podle doporučení FDA je analyt považován za stabilní v případě, pokud je relativní změna jeho koncentrace nižší než 15 % [81]. Za účelem zjištění stability léčiv v biologické matrici se často provádí analýza sady zakoupených externích vzorků ("kontrolních vzorků") a to na začátku stabilitní studie a po určité době skladování [80]. Stabilitní testy se provádějí na dvou nebo třech úrovních koncentrace: "LOW", "MEDIUM" a "HIGH" (při nízké terapeutické koncentraci, terapeutické koncentraci a vysoké koncentraci příslušného léčiva). Stabilita léčiv v biologických vzorcích se sleduje jako dlouhodobá stabilita v matrici vzorku, stabilita při opakovaném zamrazování a rozmrazování, stabilita za laboratorních podmínek a stabilita v připravených vzorcích (extraktech) za experimentálních podmínek analýzy [80].

Stabilita ziprasidonu (ZIP) byla testována ve vzorcích plné krve [80], lidském séru [62] a plazmě [49] [40]. ZIP zůstal stabilní ve vzorcích plné krve [80], pokud byly vzorky uchovávány při teplotě 4 °C, -20 °C a -60 °C po dobu 9 týdnů. Významná degradace byla pozorována při skladování při 20 °C, kdy ztráta po 20 týdnech skladování byla téměř 100% [80]. Externí plazmatické kontrolní vzorky [40] (2, 30 a 360 ng/ml) byly stabilní, pokud byly uskladněny po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C a při pokojové teplotě. ZIP byl stabilní v autosampleru, dále byl stabilní po třech cyklech zmrazení/rozmrazení a po uskladnění při -40 °C po dobu 30 dní [40]. Koncentrační změny dlouhodobě uskladněných kontrolních vzorků (4, 40, 200 ng/ml) analyzovaných po 6 měsících byly nižší než 12% [49].

Stabilitní vlastnosti agomelatinu (AGO) jsou dobře popsány v práci Patila a kol. [52], ve které byly hodnoceny vzorky lidské plazmy. Agomelatin vykazoval dostatečnou stabilitu v autosampleru (24 hodin, 10 °C), ve stolici (12 hodin při pokojové teplotě), v suchém extraktu (24 hodin, po třech cyklech rozmrazení/zmrazení a nakonec v dlouhodobém testu (90 dní, -20 °C).

Stabilita amisulpridu (AMS) byla testována ve vzorcích lidské plazmy [38, 48, 79], hemolyzované plné krvi [38, 79], slinách [79] a v lidském a telecím séru [79]. Amisulprid byl stabilní v lidské plazmě v testovaných koncentracích (15, 75 a 250 µg/l) během 3 cyklů zmrazení a rozmrazení, při laboratorní teplotě po dobu 5 dnů, při -20 °C po dobu 1 roku [79]. AMS (v testovaných koncentracích 15, 75, 250 µg/l) byl stabilní v hemolyzované plné krvi po 3 cyklech zmrazení a rozmrazení při laboratorní teplotě 2 dny a 1 týden při 2-8 °C, v perorální tekutině po 3 cyklech zamrazování a rozmrazení, 2 dny při laboratorní teplotě, 1 týden při 2-8 °C a 2 měsíce při -20° C. V lidském a telecím séru byla stabilita studována za podmínek uskladnění vzorků po dobu 5 dnů při laboratorní teplotě. AMS byl v těchto

matricích stabilní po dobu 4 týdnů [79]. Gschwend a kol. [48] prokázali dostatečnou stabilitu AMS v plazmě (podmínky uchovávání: $<-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 6 dní a $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 6 dnů).

Stabilita aripiprazolu (ARP) a jeho metabolitu dehydro-aripiprazolu (DARP) byla zkoumána ve vzorcích lidské plazmy [79] [46, 55, 82], hemolyzované plné krvi [79], orální tekutině a v lidském a telecím séru [79]. Například v lidské plazmě byly ARP a DARP v testovaných koncentracích 15, 75, 250 $\mu\text{g/l}$ stabilní během 3 cyklů zmrazení a rozmrazení, při pokojové teplotě po dobu 5 dnů a při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 roku. Po 2 letech při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se koncentrace DARP na vysoké koncentrační úrovni snížila o cca o 15%. V lidském a telecím séru byl ARP stabilní po dobu 5 dnů během uskladnění při laboratorní teplotě (stejně koncentrace jako výše). Koncentrace DARP v telecím séru se 5. den snížila o 22 % a o 19 % v lidském séru. Po uchování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 9 měsíců se koncentrace ARP v telecím séru snížila přibližně o 18 %, zatím co u DARP o 15 %. V lidském séru poklesly koncentrace ARP a DARP o 40 a 31 %. Methanolové zásobní roztoky ARP a DARP vykázaly pokles o 78 % a 75% při skladování v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 měsíců [79].

Stabilizační experimenty asenapinu (ASE) byly prováděny ve vzorcích lidské plazmy [43] [32] a v lidské moči [44]. Stabilita v lidské plazmě [43] byla testována na dvou koncentračních úrovních (0,075 ng/ml a 15 ng/ml). ASE byl stabilní po čtyřech cyklech zmrazení a rozmrazení a 24 hodin při laboratorní teplotě. Zásobní roztoky v ethanolu, pokud byly skladovány pod $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, byly stabilní asi 6 měsíců [43].

Iloperidon (ILO) byl testován na stabilitu ve vzorcích lidské plazmy [38, 57] a v lidském séru [30]. Iloperidon byl stabilní (30, 300, 8000 pg/ml) v lidské plazmě během 3 cyklů zmrazení a rozmrazení, 6 hodin při pokojové teplotě a 34 dnů při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zpracované vzorky uchovávané v autosampleru při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly po dobu 12 hodin stabilní [57]. ILO (1,5 a 35 ng/ml) v lidském séru byl stabilní během 4 cyklů zmrazení a rozmrazení, při laboratorní teplotě (3 hodiny). Po uchování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 měsíců vykazoval iloperidon u nízké koncentrace pokles 13,9%, u vyšší koncentrace pokles nebyl zaznamenán [30].

U haloperidolu nebyly pozorovány žádné problémy se stabilitou u vzorků krve po 10 týdnech za jakýchkoli podmínek skladování (při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Haloperidol je se používá jako kontrolní látka, protože je také běžně detekován v případech, kdy je vzorek odeslán na toxikologický screening. Ztráty kolem 25% byly pozorovány po 20 týdnech skladování vzorků krve při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přes 15% po 20 týdnech skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při ostatních zmíněných teplotách skladování se koncentrace haloperidolu v krvi neměnila, a to ani po 20 týdnech skladování [80]. Haloperidol je také velmi stabilní v lidském séru [30].

Stabilita flupentixolu (na 3 koncentračních hladinách: 26,1; 261 a 2091 pg/ml) byla testována ve vzorcích lidské plazmy za různých podmínek stabilitních experimentů: stabilita za laboratorní teploty, v autosampleru, dlouhodobá skladovací stabilita, cykly zmrazení/rozmrazení. Ztráta nepřesahovala více jak 9% u všech experimentů [83]

Flufenazin byl stabilní ve vzorcích krve po 10 týdnech za všech testovaných podmínek skladování (při 20 °C, 4 °C, -20 °C a -60 °C) [80]. Stabilitní studie pro zotepin a vilazodon v lidských vzorcích nebyly doposud publikovány.

Stabilita se pro různá sledovaná léčiva může významně měnit. Při vývoji analytické metody je třeba jí věnovat dostatečnou pozornost a při přenosu metody do praxe jasně definovat podmínky skladování vzorků a standardů.

2.6 Separační techniky a hmotnostní spektrometrie v analýze psychofarmak

2.6.1 Chromatografie

Chromatografie v kombinaci s vhodnými detekčními technikami (dnes především s hmotnostní spektrometrií) je v současnosti nejpoužívanější analytická separační metoda. V jednom kroku může rozdělit směs více látek ve vzorku a jednotlivé složky identifikovat nebo kvantifikovat. Z chromatografických metod se pro analýzu psychofarmak v biologických vzorcích v posledních letech nejčastěji používá plynová chromatografie (gas chromatography, GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

2.6.1.1 Plynová chromatografie

Spojením plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí vznikla velmi citlivá technika. Její omezení spočívá v nemožnosti přímé analýzy léků, které jsou netěkavé, polární nebo tepelně labilní. V takovém případě je možným řešením derivatizace před samotnou GC-MS analýzou.

Plynová chromatografie byla použita pro stanovení aminové třídy antidepresiv. Vzhledem k tomu, že aminy jsou často silně zadržovány na GC kolonách a vykazují asymetrické píky, byla pro jejich stanovení použita derivatizace za použití ethylester kyseliny chlormravenčí [84]. Šest tricyklických antidepresiv bylo stanoveno pomocí GC s dusíko-fosforový detektor (nitrogen phosphorous detector, NPD) detekcí za použití promazinu jako

vnitřního standardu, vzorky byly upraveny SPE [63]. Zotepin byl analyzován v lidském séru nebo plazmě pomocí plynové chromatografie. Vzorky byly upraveny LLE se třemi extrakčními kroky s následnou analýzou GC-NPD [85].

Huang a kol. [86] použili metodu GC-MS pro analýzu ARP a jeho metabolitu v lidské plazmě, kdy 0,5 ml plazmy bylo zpracováno SPE kolonky a následovala derivatizace. Většina klinických laboratoří však dnes používá pro stanovení psychofarmak kapalinovou chromatografii.

2.6.1.2 Kapalinová chromatografie

HPLC je velmi univerzální metoda analýzy. Má širokou škálu aplikací. Pomocí kapalinové chromatografie lze analyzovat ionty, polární a nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i analyty o vysoké molekulové hmotnosti. V oblasti biologické analýzy se běžně používá kapalinová chromatografie ve spojení s ultrafialovou (UV), fluorescenční (FL) a MS detekcí. Někdy je vhodná derivatizace, kdy je do molekuly zaváděn chromofor nebo fluorofor, což dovolí aplikaci příslušného detektoru.

I když běžné a dobře zavedené metody kapalinové chromatografie (LC) pro analýzu psychofarmak používají konvenční stacionární fáze s částicemi 3-5 μm , poslední dekáda je spojena s příchodem stacionárních částic s průměrem pod 2 μm (UHPLC). Kromě nejčastěji používaného režimu obrácených fází (RP), poskytuje vhodnou selektivitu hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). Podrobný seznam použitých kolon lze nalézt v Tabulkách č. 3-13. Pro separace na obrácených fázích se běžně používá binární gradient. Jako vodná složka mobilní fáze se používá roztok kyseliny (například octové, mravenčí). Acetonitril a methanol (často s mravenčanem nebo octanem amonným rozpuštěným v těchto rozpouštědlech) představují téměř výlučně silné eluční složky.

V některých případech ion párový efekt účinně zvyšuje retenci, jak demonstruje ve své práci D. Filijovic a kol. na analýze aripiprazolu a jeho nečistot. V této práci byl použit pentansulfonát sodný jako ion-párovací činidlo [87]. Ziprasidon a dalších 12 analytů bylo stanoveno v lidském séru pomocí C8 kolony (2,0 x 50 mm, 1,8 μm), kdy chromatografická separace trvala 4 minuty při použití gradientové eluce. Dasandi [50] a Lei [40] použili pro analýzu ziprasidonu reverzní UHPLC kolonu. Velmi rychlou analýzu provedl Patel [42], který pro analýzu aripiprazolu v lidské plazmě použil BEH C18 kolonu s vynikající mechanickou stabilitou (částice s přemostěnou hybridní strukturou ethyl-siloxan /oxid křemičitý). Čas LC-MS/MS analýzy v izokratickém módu byl v tomto případě pouze 1,2 min. Stojí za zmínku, že tato kolona umožňuje práci v širokém rozsahu pH (od 1 do 12) [26].

Viette [45] analyzoval současně aripiprazol, amisulprid a dalších 95 analytů v lidské plazmě. Pro analýzu aripiprazolu byla vyvinuta řada LC metod [41, 67, 71, 88]. Patel použil UHPLC-MS/MS pro stanovení aripiprazolu ve vzorcích lidské plazmy s použitím SPE [42]. Tato metoda byla citlivá, finančně nenáročná a spolehlivá pro bioekvivalenční studie s časem chromatografické separace menším než dvě minuty. Třicet metod aplikovalo HPLC kolony, zatímco jedenáct metod použilo kolony se sub-2 μ m částicemi pro analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik z krve, moči a tkáně (viz Tabulky č. 3-13). Velmi rychlé separace quetiapinu, perospironu, aripiprazolu a quetiapin sulfoxidu bylo dosaženo za použití UHPLC na obrácených fázích v čase menším než 3 minuty. Limit detekce byl nižší než 0,005 μ g/l. Stojí za zmínku, že bylo dosaženo vysoké účinnosti separace - šířky píků byly asi 2,5 s. Hmotnostní spektrometr (trojitý kvadrupól) umožnil velmi rychlý sběr dat bez porušení symetrie píků [71]. Moreno a kol. [89] publikovali velmi užitečné informace o využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem (UHPLC/DAD) pro analýzu široké škály sloučenin, včetně antidepresiv, benzodiazepinů, antipsychotik, antiepileptik a antiparkinsonik.

Za použití monolitických kolon byly vyvinuty jednoduché, rychlé a spolehlivé metody analýzy psychotropních látek. Vecchione a kol. [37] publikovali LC-MS/MS metodu pro stanovení 18 psychotropních léků, včetně ARP a ZIP, ve vzorcích plazmy s použitím monolitické kolony s obrácenými fázemi na bázi oxidu křemičitého. Celkový čas separace byl menší než 5,5 min. I přesto, že ne u všech látek, které byly předmětem zájmu, bylo dosaženo dobré chromatografické separace, preciznost a přesnost nově vyvinuté LC/MS metody byly dostatečné pro terapeutické sledování těchto látek. Podobně za použití monolitické kolony analyzoval Kirchherr s kolegy čtyřicet osm antidepresiv a antipsychotik v lidském séru [61].

Pro separaci psychofarmak byly použity také kolony plněné povrchově pórovitými částicemi, např. pro screening agomelatinu a dalších 132 nesteroidních protizánětlivých léků, barbiturátů, antikonvulzí, antidiabetik, svalových relaxancií, diuretik a superwarfarinových rodenticidních látek [31].

Vedle nejběžněji používaných reverzních kolon, byl pro analýzu psychofarmak použit také režim separace HILIC. HILIC mód obecně nabízí ve srovnání s režimem RP lepší retenci polárních analytů [90]. Aripiprazol byl použit jako interní standard při analýze antagonisty sigma receptoru CM156. Separace probíhala v režimu HILIC s MS detekcí a dobou chromatografické separace 4 minuty. Limit detekce byl 2 μ g/l [67].

Ascalone s kolegy [91] vyvinuli metodu pro stanovení enantiomerů AMS založenou na SPE plazmy a HPLC analýze na chirální stacionární fázi (karbamát amylózy na silikagelu). Bylo dosaženo limitu kvantifikace (LOQ) v lidské plazmě 2,5 µg/l pro oba enantiomery S - (-) - a R-(+) -amisulprid. Další podrobnosti jsou uvedeny v Tabulce č. 3-13.

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

2.6.2.1 Spojení se separačními technikami

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je jedna z nejpoužívanějších metod analýzy v bioanalytických aplikacích. Při analýze antidepresiv a antipsychotik byly použity různé typy přístrojů (jednoduchý kvadrupól, trojitý kvadrupól, iontová past, TOF analyzátor, Orbitrap, FT-ICR, sektorové přístroje a hybridní analyzátory), přičemž trojitý kvadrupól jednoznačně dominují [92].

Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) vytvořily pravidla pro provádění validací v bioanalytických metodách, včetně kritérií týkajících se parametrů specifických pro MS [81].

Trojité kvadrupól pracující v režimu monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring, SRM) je nejvíce používaným analyzátozem v bioanalýze antidepresiv a antipsychotik (Tabulky č. 3-13).

Pro kvantifikaci vybraných antidepresiv a antipsychotik se častěji používá ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním režimu než chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). APCI byla aplikována pouze ve dvou metodách [32, 49] (Tabulky č. 3-13). ESI a APCI byly porovnávány během vývoje metody pro stanovení pěti antidepresiv a čtyř atypických antipsychotik a jejich hlavní metabolitů v lidském séru [74]. Metoda využívající ESI byla použita pro validaci, protože poskytovala lepší odezvu ve srovnání s APCI u všech léčiv v režimu pozitivních iontů.

Stanovení více léčiv v jediné analýze je výhodnější pro klinickou praxi terapeutického monitorování léčiv (TDM), nežli zavádět pro každou látku zvláštní metodu analýzy. Většina publikovaných metod pro stanovení antidepresiv a antipsychotik umožňuje pouze stanovení jedné látky [36, 40-42, 47-49, 51-54, 59, 65-68], někdy i s jejich metabolity [43, 44, 55, 57, 60]. Metody pro kvantifikaci více psychotropních léků [30-33, 37, 38, 45, 46, 61, 62, 69-72] zahrnují novější antidepresiva a antipsychotika, která jsou doporučována pro TDM

psychofarmak. Právě při sledování většího počtu léčiv může hmotnostní spektrometrie svoji selektivitou nahradit úplnou separací látek. I přesto, že by hmotnostní spektrometrii bylo možné použít samostatně, pro stanovení psychofarmak se používá ve spojení s kapalinovou chromatografií (méně často s plynovou chromatografií, viz výše).

Pro analýzu lurasidonu v krevní plazmě, žluči a moči byl použit jako analyzátor jednoduchý kvadrupól s ESI ionizací. Odezva detektoru byla specifická a lineární v koncentračním rozmezí 5-5000 ng/ml [66]. Podobný přístup byl použit pro TDM několika psychotropních léků a jejich metabolitů. Režim selektivního monitorování iontu (selected ion monitoring, SIM) umožnil pokrytí terapeutického rozsahu pro všechny studované psychotropní léky [46].

Nejlépeších výsledků z hlediska kvantifikace psychotropních léků bylo dosaženo s trojitým kvadrupólem. Při jeho použití s elektrosprejem v pozitivním módu (Z-sprej iontový zdroj) byl například limit detekce pro ziprasidon 0,1 ng/ml v plazmě s přidavkem analytu. Tato metoda byla validována s linearitou odezvy v rozmezí koncentrací 0,5 - 200 ng/ml a vykazovala vysokou propustnost vzorků [47]. Stejný iontový zdroj použil Zhang a kol., kteří pro ziprasidon dosáhli LLOQ 0,2 ng/ml pro plazmu a 0,83 ng/g pro mozkové tkáně s lineární odezvou v rozmezí 0,5 až 200 ng/ml [65]. Podobných výsledků bylo dosaženo u ziprasidonu za použitím trojitého kvadrupólu. Optimalizovaná metoda poskytla limit kvantifikace 0,25 ng/ml a lineární odezvu v rozsahu 0,25 až 500 ng/ml [49]. Poněkud vyšší hodnota LLOQ 0,7 ng/ml byla dosažena Leiem [40]. Ve všech metodách byl čas chromatografické separace menší než 3 minuty. To představuje významné zlepšení ve srovnání s běžnými metodami HPLC/UV-VIS s obecně mnohem delšími časy (> 15 min), což je způsobeno především mnohem vyšší selektivitou poskytovanou hmotnostním spektrometrem. Trojitý kvadrupól byl dále použit pro kvantifikaci ranolazinu v lidské plazmě [36], analýzu diltiazemu (LLOQ 0,48 ng/ml pro diltiazem a 0,24 ng/ml pro jeho metabolity) nebo pro stanovení agomelatinu z lidské plazmy (LLOQ 0,05 ng/ml) [52, 53].

Rovněž analýza amisulpridu v plazmě byla provedena za použití trojitého kvadrupólu s ESI. Vzorek byl upraven pomocí extrakce kapalina-kapalina za použití směsi diisopropylether a dichlormethan (1: 1, v/v). Za podmínek analýzy bylo dosaženo limitu detekce 0,13 ng/ml [48]. Stejný typ analyzátoru se uplatnil při analýze aripiprazolu v plazmě (LOQ 0,5 ng/ml) a v mozkové tkáni (LOQ 1,5 ng/g) [41]. V jiných studiích bylo dosaženo ještě nižších hodnot LLOQ, tj. 0,1 ng/ml [42] a 0,05 ng/ml [55].

Vynikající výsledky publikovali Jia a kol. [57], kteří dosáhli hodnoty LLOQ 10 pg/ml pro iloperidon v lidské plazmě (trojitý kvadrupól, technologie Q-TRAP).

Vysoká skenovací rychlost trojitých kvadrupólů (režim selektivního monitorování reakce, selected reaction monitoring, SRM), umožnila současnou analýzu 48 antidepresiv a antipsychotik s celkovým rozsahem terapeutických hladin: 0,5-2000 ng/ml [61]. Podobně stanovení 13 sloučenin publikoval Hasselstrom [62]. Pro analýzu 18 psychofarmak (17 bazických a 1 kyselého) bylo použito programování SRM (načasování během chromatografické analýzy) s přepínáním polarit v průběhu měření [37]. Při této metodě byly naměřeny LLOQ 0,15 ng/ml pro všechny základní psychofarmaka a 15 ng/ml pro kyselinu valproovou (kyselé psychofarmakum).

Podobný přístup aplikovali Sampedra a kol. [72] při simultánním stanovení 17 antipsychotických léků v lidské mozkové tkáni, kdy sledovali SRM přechody pro jednotlivé látky pouze ve vymezených časových oknech pro zajištění dostatečného počtu datových bodů na chromatografický pík.

Ansermont a kol. vyvinuli citlivou a selektivní metodu pro stanovení deseti psychotropních léků v lidské plazmě za použití elektrospreje s trojitým kvadrupólem. Hodnoty LLOQ se pohybovaly v rozmezí 0,5-1 ng/ml u všech testovaných psychotropních léků [38]. Práce publikovaná Steuerem a kolegy [33] porovnávala dva LC/MS systémy, kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostním spektrometrem Q-TRAP a mikrokapalinovou chromatografií spojenou s lineární iontovou pastí pro analýzu 40 antidepresiv a neuroleptik. Obě metody poskytovaly srovnatelné LOD, LOQ a kalibrační modely. Ačkoli výhodou mikro systému je nízká spotřeba mobilní fáze, krátká doba analýzy a lepší separace, stabilnější retenční časy a více datových bodů na pík dosahoval konvenční LC/MS systém. takové systémy jsou prozatím upřednostňovány.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku, jako mnohem méně častý ionizační mód, byla použita pro analýzu amisulpridu, aripiprazolu, dehydro-aripiprazolu, klozapinu, norklozapinu, olanzapinu, quetiapinu, risperidonu, 9-hydroxyrisperidonu a sulpiridu v plazmě, slinách a plné krvi. Hodnoty LLOQ byly plně dostačující a pohybovaly se v rozmezí 1 až 5 ng/ml [32].

Správná volba vnitřního standardu výrazně ovlivňuje správnost stanovení. Pro analýzu psychofarmak se obvykle používají chemická analoga s pravděpodobně podobnými analytickými vlastnostmi (ISch) [93] nebo analyty značené stabilními izotopy (ISil). Ty se staly populárnějšími v posledních desetiletích, ale jejich hlavní nevýhodou je mnohdy vysoká

cena nebo obchodní nedostupnost. Autority FDA a EMEA je však doporučují při validacích bioanalytických metod [81] [94]. Hodnoty preciznosti při použití ISch jsou obvykle v rozmezí 0,8 – 17 %. Publikované hodnoty preciznosti s použitím ISil se pohybuje v rozmezí 0,5 - 11,5 %. Porovnáním hodnot pro stanovení aripiprazolu, jako nejčastěji publikovaného psychotropního léku, se pro ISch pohybuje preciznost v rozmezí 1,1-12,4 % a pro Isil je 0,5- 8 %. Obě srovnání vykazují mírně lepší preciznost pro izotopově značené standardy. Ve studiích, které se týkaly analýzy více analytů včetně jejich metabolitů, byly však zaznamenány mnohem vyšší hodnoty (4,4-60,6 %) bez ohledu na to, zda byl použit chemický analog nebo značená sloučenina, např. [33].

2.6.2.2 Potenciál ambientních ionizačních technik

LC-MS a LC-MS/MS techniky poskytují vysokou specifičnost, přesnost a preciznost, ale často vyžadují vhodnou někdy časově náročnou před úpravu vzorků. Zajímavou alternativou jsou ambientní ionizační techniky hmotnostní spektrometrie, které dovolují rychlou analýzu bez úpravy vzorků. Přesněji úprava (např. extrakce) je součástí ionizačního procesu. Od roku 2004 bylo popsáno více než 40 typů ambientních metod [95] lišících se především ionizačním režimem, ale jen málo z nich je komerčně využívaných. Ionizace desorpčním elektrosprejem (DESI) a přímá analýza v reálném čase (DART) představují běžněji používané ambientní hmotnostně spektrometrické techniky umožňující analýzu v několika málo sekundách [96]. DESI a DART lze použít pro analýzu jak pevných (např. tkání), tak kapalných vzorků. Jejich hlavní nevýhodou je riziko snížení či naopak zvýšení výtěžku ionizace vlivem složek matrice. Odezva látky ve vzorku se může výrazně lišit o odezvy roztoku standardu vzorku [97]. Navíc DESI-MS zahrnuje řadu geometrických a povrchových parametrů, které jsou rozhodující pro udržení optimálního a reprodukovatelného signálu [97]. Podobně absolutní množství iontů produkovaných metodou DART závisí na umístění vzorku v proudu plynu [98]. V oblasti analýzy léčiv například Rosting a spolupracovníci [99] vyvinuli metodu DESI-MS/MS pro kvantifikaci léčiv v biologických tekutinách (moč, sliny, plná krev). Yao a kol. [100] vyvinuli strategii pro detekci léků vázaných na proteiny. Ačkoli ambientní techniky představují významný přístup k analýze biologického materiálu, nebyly prozatím použity pro analýzu antidepresiv a antipsychotik. Jejich současnost slabinou z pohledu TDM je problematická kvantifikace. Zásadním je v této souvislosti využití izotopově značených standardů.

2.6.2.3 Matricový efekt

Vliv matrice je třeba zvažovat nejen u ambientních technik, ale důležité je jeho zhodnocení obecně při kvantitativní analýze biologických vzorků pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií [74]. Pro zhodnocení matricového efektu se používají tři běžné metody: (1) nadávkování matrice bez sledované látky na kolonu a zavádění roztoku standardu do toku mobilní fáze za kolonou, (2) přidavek standardu po úpravě vzorku před analytickou koncovkou a (3) porovnání směrnice kalibračních křivek pro roztoky standardu v rozpouštědle a pro jeho známá množství v biologickém materiálu [50, 101, 102].

Problém s vlivem matrice může komplikovat variabilita biologické matrice (např. kontrolní krev získaná od různých pacientů/subjektů) nebo rozdíly mezi analyty a strukturně odlišnými vnitřními standardy. Použití izotopově značených vnitřních standardů v současnosti nabízí nejvhodnější řešení pro zohlednění matricových efektů [78]. Chin a kol. [103] popisují matricové efekty běžně používaných antikoagulantů a lipémii. Přítomnost heparinu sodného a K₃EDTA může komplikovat stanovení, a proto by mělo být odebrané sérum bez těchto přísad. Matricový efekt může být také způsoben exogenními látkami, jako jsou polymery obsažené v různých odběrových systémech. Matricové efekty související s ionizačními technikami hmotnostní spektrometrie jsou podrobně popsány v review Eeckhautena a kol. [104] a Taylora [105].

2.7 Diskuze k teoretické části

Z klinického hlediska mají léky, které jsou předmětem tohoto přehledu, některé z "požadovaných vlastností" pro TDM. Existuje široká interindividuální variabilita ve farmakokinetice těchto léčiv. To může být způsobeno faktory jako je pohlaví, věk, váha, funkce jater a ledvin, dieta, komorbidita a genetický polymorfismus cytochromu P450. Přítomnost vnějších faktorů může dále přispět k celkové farmakokinetické variabilitě. Například prevalence kouření je výrazně vyšší u psychiatrických pacientů (zejména u těch, kteří trpí schizofrenií) ve srovnání s celkovou populací [106]. Kouření indukuje metabolickou aktivitu CYP1A2, takže může být významně ovlivněna eliminace substrátů tohoto enzymu stejně jako klinická odpověď. Většina studovaných léčiv (s výjimkou amisulpridu a

ziprasidonu) je metabolizována enzymy cytochromu P450 a může proto být předmětem významných farmakokinetických interakcí [107].

Na druhou stranu, u většiny těchto léčiv (s výjimkou amisulpridu a snad aripiprazolu a ziprasidonu) není jasně prokázán vztah mezi plazmatickou koncentrací a klinickým účinkem anebo zcela chybí. Často není jasné, jaká je úloha aktivního metabolitu.

Rutinní TDM výše uvedených léků není indikováno (s výjimkou amisulpridu a případně aripiprazolu a ziprasidonu), ale může být v určitých situacích zvažováno za účelem a) potvrzení neadherence nebo intoxikace, b) vyloučení velmi nízkých plazmatických koncentrací jako možný důvod pro nedostatečnou odpověď / selhání léčby, c) vyloučení velmi vysokých plazmatických koncentrací jako možného důvodu pro špatnou snášenlivost / nepříznivé účinky, d) posouzení podezření / očekávané farmakokinetické lékové interakce.

Pokud jde o samotnou analýzu, klinické laboratoře mají dvě hlavní možnosti, jak analyzovat léčiva v biologických tekutinách: imunoanalýza nebo chromatografie. V současné době je kvantitativní analýza léků pro TDM založena především na imunoanalytických metodách (IA), které jsou automatizované a rychlé, a tím vhodné pro rutinní. Jejich nedostatky spočívají v potenciálně nedostatečné specifitě (zkřížené reakce s metabolity nebo strukturně příbuznými sloučeninami) [108]. U IA metod není vždy možné měřit více strukturních analogů (např. léčivo + metabolit) v jediné analýze, což je žádoucí zejména v rutinních laboratořích TDM. Náklady na analýzu pomocí IA technik mohou být navíc relativně vysoké [109].

Imunoanalytické metody představují užitečný nástroj ve forenzní toxikologii pro screening tricyklických antidepresiv [110]. Jejich výsledky však mohou ovlivnit vnější faktory a další proměnné [110]. Před vlastním zhodnocením je tedy nutné provést další konfirmační testy [110]. Prozatím neexistují žádné IA metody pro kvantifikaci výše uvedených antidepresiv a antipsychotik, což podtrhává význam chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Takové spojení poskytuje vysokou selektivitu a spolehlivost pro TDM a představuje vhodnou alternativu k imunoanalytickým metodám. Vysokou účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) se úspěšně používá pro kvantitativní analýzu léků ve farmakokinetických studiích a TDM. Nyní se považuje za „zlatý standard“ v těchto oblastech. V rutinní praxi se stanovení psychofarmak pro optimalizaci terapie provádí téměř výhradně z venózní krve, neboť je to jediná biologická tekutina, kde je prokázán vztah mezi koncentrací léčiva a klinickou odpovědí. V klinické praxi je konvenční TDM založeno na analýze vzorku žilní krve. Metoda suché krevní kapky

je v současnosti zajímavou alternativou. Nejdůležitějšími výhodami DBS v TDM je minimální invazivní odběr vzorku (domácí vzorkování), malý objem vzorku (děti) a stabilita analytu [111]. Byly publikovány metody, které využívají pro stanovení psychofarmak jako biologickou matici DBS, ale v rutinní praxi TDM tento postup není rozšířen. Všechny psychofarmaka se pravděpodobně více či méně vylučují do mateřského mléka. Pokud je matka léčena psychofarmaky a přeje si pokračovat v kojení, může být velmi užitečné měřit hladiny léčivých látek v mateřském mléku tak, aby bylo možné odhadnout celkové množství léčiva, které dítě přijme. Jiné biologické tekutiny, jako je mozkomíšni mok a moč, se používají pouze ve zvláštních situacích. Objem krve potřebný pro TDM stanovení psychofarmak závisí na citlivosti analytických metod. Publikované metody používají různé objemy vzorků. Nejčastěji se objem krve pro TDM psychofarmak pohybuje rozmezí 100 - 200 μ l. Vzhledem k tomu, že odběr vzorku je pro pacienty bolestivý a stresující, jsou preferovány metody, které používají pro analýzu pouze malé množství biologického materiálu. Někteří autoři však stále používají objemy vzorku větší než 400 μ l [53, 68].

Pro analýzu psychofarmak ze vzorků krve, pro účely TDM, jsou doporučovány odběrové materiály bez gelu. Plastové gelové odběrové systémy a systémy se separátory pro sérum by neměly být používány, protože mohou adsorbovat léky nebo vytěsňují některé léky z jejich vazebných míst na bílkovinách. Tento fakt je důležitý při monitorování antidepresiv a benzodiazepinů [108]. Bylo zdokumentováno mnoho látek, které mohou interferovat při stanovení psychofarmak. Jsou to látky, které jsou součástí matrice jako metabolity léků, různé rozkladné produkty, současně podávaná léčiva, složky potravy a případně i jiná xenobiotika. Testování vlivu interferencí, které mohou nastat při současném užívání vícero léků, je nezbytnou součástí validace bioanalytických metod. Psychiatrickí pacienti jsou převážně léčeni kombinacemi psychofarmak nebo kombinací psychofarmak a antiepileptik, tato léčiva by měla být testována jako potenciálně interferující látky.

Podmínky skladování (teplota, doba skladování) mohou významně ovlivnit stabilitu antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích, což je důležité pro interpretaci analytických výsledků [80]. Výsledky stabilitních testů u většiny autorů potvrzují, že plazma (EDTA antikoagulant) je nejvhodnějším vzorkem pro TDM vybraných antipsychotik a antidepresiv. Nejsou známy důvody pozorovaných rozdílů ve stabilitách řady psychofarmak mezi plazmou a některými dalšími studovanými maticemi [79]. Stabilita vzorků je nezbytná zejména, pokud laboratoř provádí analýzy pro další spádové oblasti jiných nemocnic, ambulantní specialisty nebo laboratoře. Stabilita vzorků je dostatečná, pokud jsou

psychofarmaka stabilní 24 hodin, což je čas dostatečný pro přepravu a analýzu vzorků. Po této době se doporučuje ukládat vzorky do chladničky nebo mrazničky.

Bez ohledu na vysokou selektivitu a spolehlivost HPLC/MS metod zůstává příprava vzorků rozhodující pro preciznost a přesnost výsledků. Metody využívající PPT jsou jednoduché a levné, ale produkují poměrně nečisté vzorky, které mohou zkrátit životnost chromatografických kolon, prodloužit čištění/údržbu hmotnostního spektrometru nebo vést k matricovým efektům. LLE a SPE jsou účinnější z pohledu čistoty extraktů a menšího rizika matricových efektů. Jsou však také pracnější a časově náročnější. Jsou obtížně automatizovatelné v klinických laboratořích (např. bez investice do potřebného zařízení pro automatizaci SPE). Jak je shrnuto v tabulkách č. 3-13, LLE zůstává nejběžněji používanou metodou pro zpracování vzorků při analýze popsaných antidepresiv a antipsychotik v biologických matricích. V posledních deseti letech byly vyvinuty různé postupy úprav vzorků založené na práci mikrotitračními destičkami s 96 jamkami nebo robotickými stanicemi pro manipulaci s kapalinami, které automatizují proces extrakce, avšak v rutinních klinických laboratořích nejsou příliš využívány. Jak již bylo zmíněno, krok přípravy vzorku může zaujmout až 50-75 % z celkové doby analýzy.

UHPLC systémy umožnily výrazně zlepšit chromatografickou účinnost oproti konvenčním HPLC systémům. Zvyšuje se účinnost, chromatografické rozlišení, ale i citivost a rychlost separace. Bylo vyvinuto velké množství nových stacionárních fází na bázi sub-2 μm částic, které byly použity pro analýzu psychofarmak a jejich metabolitů v lidské plazmě. Bez ohledu na vývoj materiálů s různou selektivitou systémy obrácených fází stále nabízejí nejlepší platformu pro TDM studovaných psychofarmak a analýzu jejich metabolitů. Stanovení metabolitů psychofarmak v biologických matricích může být užitečné zejména pro zhodnocení lepšího terapeutického dávkování léků. Stále však ještě někteří autoři publikují analytické metody bez stanovení aktivních metabolitů (aripiprazol, citalopram, olanzapin, sertralin) [33].

Ionizace elektrosprejem s tandemovými hmotnostními spektrometry dominují mezi detektory pro LC/MS analýzu psychofarmak. Trojitý kvadrupól je nejčastěji používaným nástrojem pro analýzu psychotropních léků. Selektivní monitorování reakcí (alespoň dvou) je mód doporučovaný mezinárodními autoritami (FDA, EMEA) [81] [94]. Správná LC/MS kvantifikace je ovlivněna použitím vhodného interního standardu. Metody využívající pro analýzu psychofarmak izotopově značených vnitřních standardů poskytují mírně lepší preciznost oproti metodám s chemickými analogy. Izotopově značené standardy jsou obecně

doporučovány FDA. Navzdory obtížnější komerční dostupnosti a vysokým cenám jsou v rutinních klinických laboratořích izotopově značené standardy používány.

Ačkoli se lze setkat s testováním ambientních ionizačních technik, zejména techniky DESI a DART, pro účely analýzy léčiv v biologických matricích, problémy těchto technik spojené se stabilitou a reprodukovatelností signálu zůstávají nevyřešeny a pro rutinní aplikaci v TDM laboratořích nejsou zatím vhodné.

Tab. 3: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mód)	Literatura
Ziprasidon, amisulprid, aripiprazol, zotepin (+ dalších 44 analytů)	Lidské sérum	PPT acetonitrilem: methanolem	clonidin, methyl risperidon, methabenzthiazuron	gradient eluce, A: MeOH B: 5mM acetátový pufr, pH 3,9	Chromolith Speed ROD C ₁₈ (50×4.6 mm, 5μm), ambientní teplota	LC-ESI(+)-MS/MS, (CID mód, Q ₃)	[61]
Ziprasidon	Lidská plazma	LLE, vzorek + borátový pufr, pH 10.2; extrakce s tert-butyl methyl etherem	N- methyl ziprasidon	Isokratická eluce, 2mM NH ₄ Ac v ACN : voda (9:1)	Symmetry C ₈ (2.1×150 mm, 5μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (CID mód, Q ₃)	[47]
Amisulprid	Lidská plazma	LLE, vzorek + 1M K ₂ CO ₃ ; Extrakce s diisopropyletherem: dichloromethane, 1:1; (extrakční recovery: 82-85%)	sulprid	Isokratická eluce, 5 mM octanamonný (30:70)	Phenomenex Synergy Polar-RP (75 ×4.6mm, 4 μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[48]
Ziprasidon	Lidská plazma	LLE, vzorek + sat. aq. soln. Na ₂ CO ₃ extrakce s methylen dichloridem: pentane, 2:8 (recovery 82%)	INS-RSP	Isokratická eluce, 0.65 mM octanamonný ve vodě : MeOH :ACN (10:45:45)	Luna-C ₁₈ (4.6×50 mm, 5μm), (37 °C)	LC-APCI(+)-MS/MS, (CAD mód, Q ₃)	[49]
Ziprasidon (+ dalších 5 analytů)	Mozková tkáň	LLE, vzorek + 0.5M Na ₂ HPO ₄ , pH 10.69, extrakce s isopropyl etherem (recovery: 73.6- 95.0% pro všechny analyty)	midazolam	gradientová eluce, A: 5mM vodný roztok mravenečnanu amonného (pH 6.1) B: ACN	Atlantis™ dC-18 (30×2.1 mm, 3 μm), (25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[69]
Ziprasidon (+ dalších 5 analytů)	Krysí plazma	LLE, vzorek + 0.5M Na ₂ HPO ₄ , pH 10.7; extrakce s isopropyl ether; (recovery 77%)	midazolam	Gradientová eluce A: 5mM vodný roztok mravenečnanu amonného (pH 6.1) B: ACN	Waters Atlantis™ dC-18 (30×2.1 mm, 3μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (CAD, Q ₃)	[70]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 4: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mód)	Literatura
Aripiprazol (+ další 3 analyty)	In vitro vzorek	Suchý vzorek rozpuštěn v 1-chlorobutan: triethylamin, 5:0.5 (recovery 72-94%)	zaleplon	Isokratická eluce, acetonitril :30 mM octan amonný (62:38)	BEH C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm), (40°C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[71]
Ziprasidon	Kryší plazma, mozková tkáň	LLE, vzorek + 0.5M Na ₂ HPO ₄ , pH 10.7; extrahován s isopropyl: methylchlorid, 80:20 (v/v) (recovery 81%)	midazolam	Gradientová eluce, A: 0,02% vodný roztok amoniaku (pH= 7.2) B: ACN	Agilent Eclipse XDB C-8 (150×2.1, 5μm), (25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[65]
Ranolazin	Lidské plazma	PPT s methanolem	aripiprazol	Isokratická eluce, MeOH : 1% kys. Mravenčí ve vodě (65:35)	Peerless Cyano (33×4.6 mm, 3μm),	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[36]
Diltiazem a 2 metabolity	Lidské plazma	LLE, vzorek + methyl- <i>t</i> -butyl ether (recovery 74.1%)	ziprasidon	Isokratická eluce, 10 mM octan amonný : ACN (25:75)	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (100×2.1 mm, 1.7 μm), (45 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[50]
Aripiprazol, dehydro-aripiprazol	Lidské plazma	LLE, vzorek + vodný amoniak; extrahován s methyl- <i>t</i> -butylether:ether, 1:1 (v/v) (recovery 93.6-111%)	papaverin	Isokratická eluce, MeOH : octan amonný (70:30)	RP BDS Phenyl column (250×4.6 mm, 5μm), (30 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (SRM mód, Q ₃)	[55]
Aripirazol, dehydro-aripirazol (+ dalších 9 analytů)	Lidské plazma	SPE, Oasis MCX (recovery 92-123%)	remoxiprid	Gradientová eluce, A: 20 mM octan amonný (pH= 8.1) B: ACN	Xbridge C18 (2.1×100 mm, 3.5 μm)	LC-ESI(+)-MS, (SIM mód, Q ₁)	[46]
Aripiprazole	Lidské plazma	LLE, vzorek + 1M NaOH; extrahován s n-butyl chlorid: acetonitril, 4:1(v/v)	haloperidol-d4	Gradientová eluce A: 0,1% kys. mravenčí B: ACN	YMC ODS-AQ S (100×2.0 mm, 3μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (SRM mód, Q ₃)	[51]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalínová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 5: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mód)	Literatura
Zotepin	Lidské sérum	PPT acetonitrilem	imipramin	Gradientová eluce, A: 10mM mravenečnan amonný + 10% ACN B: 10mM mravenečnan amonný + 90% ACN	Tosoh ODS-100V (50×2 mm, 5 μm), (40 °C)	LC-EC/ESI-MS/MS, (SRM mód, Q ₃)	[59]
Ziprasidon	Lidská plasma	SPE, Typ není uveden (recovery 81.3%)	carbamazepin	Isokratická eluce, 15 mM NH ₄ Ac a 0.12% kys. octová ve vodě: MeOH (50:50)	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50×2.1 mm, 1.7 μm), (40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[40]
Ziprasidon (+ dalších 12 analytů)	Lidská plasma	PPT s zinc sulphate, methanol (recovery 70%)	ziprasidon-d ₈	Gradientová eluce, A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě B: 0,1% kyselina mravenčí v MeOH	Zorbax SB-C ₈ column (2.0×50 mm, 1.8 μm), (60 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[62]
Lurasidon	Krysí plasma	PPT s acetonitrilem	ziprasidon	Gradientová eluce, A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě B: 0,1% kyselina mravenčí v ACN	Gemini C ₁₈ (50×2 mm, 5μm), (25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[39]
Aripiprazol, amisulprid (+ dalších 95 látek a metabolitů)	Lidská plasma	SPE, Oasis HLB	d ₃ -clomipramin, d ₅ -amfetamin	Gradientová eluce A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě B: 0,1% kyselina mravenčí v ACN	Hypersil gold (100×2,1 mm, 1,9 μm), (40 °C)	LC-ESI-MS, (QTRAP)	[45]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 6: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura
Ziprasidon, aripiprazol (+ dalších 16 látek)	Lidská plazma	PPT s acetonitril:metanol, 9:1 (v/v)	clonidin	Gradientová eluce A: 0.2% AcA v ACN B:0.2% AcA ve vodě	Chromolith Speed ROD C ₁₈ (50×2 mm, 5µm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[37]
Ziprasidon, aripiprazol, amisulprid (+dalších 14 látek)	Lidská mozková tkáň	PPT s Kys. mravenčí v ACN, SPE, HybridSPE precipitační kártrič	haloperidol-d ₄	Gradientová eluce A: ACN B: mravenecnan amonný ve vodě (pH 8.2)	Zorbax Eclipse plus C ₈ (2.1×150 mm, 5µm), (30 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[72]
Ziprasidon	Kryší plazma, žluč a moč	LLE, vzorek kyselina octova ZnSO ₄ ; extrakce hexanem	lurasidon +	Isokratická eluce ACN: 0.1% kys. mravenčí (80:20)	Gemini C ₆ Phenyl (150×4.6 mm, 5µm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (SIM mód)	[66]
Agomelatin	Lidské plazma	LLE s ethyl acetate (recovery 67%)	fluoxetin	Isokratická eluce 0.1% kys. mravenčí ve vodě : ACN (20:80)	Betasil C ₁₈ (100×4 mm, 5µm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[52]
Asenapin (ASE), N-desmethyl asenapin (DMA), asenapin-N ⁺ -glucuronid (ASG)	Lidská moč	SPE, Oasis HLB		Gradientová eluce A: 0.1 M octan amonný (pH 4.2) B: ACN	for ASE a DMA: Discovery C ₈ (150×2.1 mm, 5 µm) for ASG: Luna C18 (30×2 mm,5µm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (CAD mód, Q ₃)	[44]
Aripiprazol, dehydro-aripirazol	Lidské sérum	PPT s acetonitrilem	dansyl-norvalin	Gradientová eluce A: 0.1% kys. mravenčí ve vodě B: 100% ACN	Luna C18 (50×2.0 mm, 5µm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[60]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosférického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalínová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 7: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura
Asenapin (ASE), N-desmethyl asenapin (DMA), asenapin-N ⁺ -glucuronid (ASG), 11-O-sulfat-asenapin (OSA)	Lidské plazma	On-line SPE, Symbiosis Pharma System (recovery 69-97% pro ASG)	[¹³ C ² H ₃]-ASE, [¹³ C ² H ₃]-ASG, Org 5649 pro DMA, Org 8444 pro OSA	Gradientová eluce A1: 0.01 M octan amonný (pH 4.2) for ASE, DMA, OSA A2: 0.1 M octan amonný (pH 4.2) for ASG B: ACN	for ASE, DMA, OSA: Discovery C ₈ (150×2.1 mm, 5 μm), (30 °C), for ASG: Luna C ₁₈ (30×2.0 mm, 5 μm), (40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (CAD mód, Q ₃)	[43]
CM 156	Krysí plazma	LLE chloroformem	aripiprazol	Isokratická eluce 10 mM mravenečnan amonný v 0.1% FA : ACN (10:90)	Acquity UPLC BEH HILIC (50×2.1 mm, 1.7 μm), (25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (SIM mód, Q ₃)	[67]
Aripiprazol	Krysí plazma a mozková tkáň	SPE, Evolute CX	midazolam	Gradientová eluce A: 0.1% FA ve vodě B: ACN	Agilent Eclipse plus C ₁₈ (50×2.1 mm, 1.8 μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[41]
Aripiprazol (+ 1 další analyt)	Lidské plazma	LLE s ethyl acetátem (recovery 71%)	propranolol, zidovudin	Isokratická eluce 0.1% FA ve vodě : ACN (10:90)	Phenomenex C ₁₈ (50×4.6 mm, 5 mm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[56]
Aripiprazol, dehydro-aripiprazol, amisulprid (+ dalších 7 látek)	Lidské plazma, sérum, sliny, krev	LLE s buthyl acetátem: butanol, 9:1 (v/v) (recovery ARP 93-100%, d-ARP 58-106%, AMS 43-48%)	aripiprazol-D8, amisulprid-D5	Isokratická eluce 50 mM octan amonný v MeOH (pH 6.0)	Waters Spherisorb S5SCX (100×2.1 mm, 5 μm)	LC-APCI(+)-MS/MS, (SRM mód, Q ₃)	[32]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 8: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mód)	Literatura
AZ66	Kryší plazma	LLE chloroformem, (av. recovery 98%)	saripiprazol	Isokratická eluce 10 mM octanamonný obasující 0.1% FA : MeOH (40:60)	Acquity UPLC BEH Shield RP18 (150×2.1 mm, 1.7 mm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[88]
Amisulprid, asenapin, iloperidon (+ dalších 7 analytů)	Lidské plazma	PPT s acetonitrilem (recovery AMS 95-96%, ASE 46-50%, ILO 81-83%)	amisulprid-d ₅ , asenapin- ¹³ C, ₃ , iloperidon-d ₃	Gradientová eluce A: 10 mM pufr mravenečnanu amonného (pH 3.0) B: ACN	Acquity UPLC BEH Shield RP18 (50× 2.1 mm, 1.7 μm, 40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[38]
Iloperidon + 2 metabolity	Lidské plazma	LLE s ethyl acetátem (ILO >71%)	pioglitazon	Isokratická eluce ACN:5 mM mravenečnan amonný obsahující 0.3% FA, pH 4.8, (25:75)	CAPCELL PAK C18 MG III column (150×2.0 mm, 5 μm, 40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, QTRAP)	[57]
Asenapine (+ 1 analyt)	Lidské plazma	LLE s methyl-tert-butyl ether (recovery >81.3%)	gliclazid	Isokratická eluce 10 mM mravenečnan amonný : ACN, (5:95)	Phenomenex C18 (50×4.6 mm, 5 μm, 40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[58]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrospřejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 9: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura	
Aripiprazol	Lidské plazma	SPE, Strata (recovery >96%)	X	aripiprazol-d8	Isokratická eluce MeOH : 100 mM mravenečnan amonný, pH 4, (85:15)	BEH C18 (50×2.1 mm, 1.7 μm), (30 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[42]
Iloperidon, asenapin, aripiprazol, dehydro-aripiprazol amisulprid (+ dalších 19 analytů)	Lidské sérum	LLE, vzorek + 1M karbonátový pufr, pH 9.5; extrakce s methyl-tert-butyl etherem		amisulprid-d5, aripiprazol-d8, dehydro-aripiprazol-d8, iloperidon-d3, asenapin-13CD3	Gradientová eluce A:10 mM octan amonný, pH 3.7 B:ACN	Agilent SB C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm), (40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[30]
Agomelatine (screening pro dalších 131 léků)	Plná krev	PPT s acetonitrilem		trimipramin-d3, nimodipin-d7	Gradientová eluce A:25 mM octan amonný, pH 7.5 B:ACN	Kinetex XB C18 (150×4.6 mm, 5 μm), (60 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, QTRAP)	[31]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosférického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 10: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura	
Vilazodon	Psí plazma	LLE, vzorek + sat. Na ₂ CO ₃ ; extrakce s ethyl acetátem		omeprazol	Isokratická eluce, ACN : 10 mM octan amonný (50:50)	Luna C18 (150×2.0 mm, 5 μm), (35 °C)	LC-ESI(-)-MS/MS, (SIM mód, Q ₃)	[68]
Agomelatin	Lidské plazma	LLE s n-hexan: dichloro methan:2-propanol, 20:10:1 (v/v/v), (recovery >90.0%)		diazepam	Isokratická eluce 5 mM octan amonný obsahující 0.1% FA : MeOH (30:70)	Zorbax SB-C18 (150×2.1 mm, 5 μm), (35 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[53]
Vilazodon	Křysí plazma	LLE, Vzorek + 1M Na ₂ CO ₃ + voda; Extrakce s diethyl etherem (recovery >82.0%)		escitalopram	Isokratická eluce ACN : 5 mM octan amonný : FA, (35:65:0.1)	Agela C18 (50×2.1 mm, 3 μm, 30 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[54]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosférického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 11: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura
Agomelatin, amisulprid, aripiprazol, Flupentixol, Haloperidol (+ dalších 35 analytů)	Plná krev	PPT s acetonitrilem	venlafaxin-d6, amisulprid-d5, aripiprazol-d8, haoperidol-d4	Gradientová eluce A-50 mM mravenečnan amonný + 0.3% FA B- ACN + 0.1% FA Gradientová eluce A-10 mM mravenečnan amonný (pH 3.5) B-ACN + 0.1% octová kyselina	Synergy Polar RP (100×2 mm, 2.5 μm), Halo Phenyl Hexyl column (50×0.5 mm, 2.7 μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, QTRAP) Microflow-LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, QTRAP)	[33]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosferického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 12: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura
Haloperidol a dalších 18 analytů	Lidské plazma	SPE	Chlorpromazin-d ₆	Gradientová eluce, A: 5mM octanamonný ve vodě B: 0.1 % FA v ACN	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ column (50mm × 2.1 mm, i.d. 1.7 μm, 30 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[112]
Haloperidol, fluphenazine	Lidské sérum a plazma	PPT	Imipramin-d ₃	Gradientová eluce A: FA ve vodě B: FA v ACN	UPLC HSS T3 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm, 25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[113]
Aripiprazol a dehydroaripiprazol	Lidská lazma	(SPE, Oasis PRiME HLB 96)	Aripiprazol-d ₈	Gradientová eluce A: 5mM mravenečnan amonný B:ACN	ACE C18-PFP column (4.6 × 100 mm, 3 μm, 25 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[114]
Aripiprazol a jeho 3 metabolity	Lidská plazma	SPE, Bond Elut Plexa cartridges	Aripiprazol-d ₈	Izokratická eluce Voda:ACN (25:75) obsahující 0.1%FA	Eclipse XDB-CN column (100 × 2.1 mm, 3.5 μm, 38 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[115]
Aripiprazol, asenapine, haloperidol (+ dalších 167 analytů)	vlasý	Proces: mytí, sušení, ultrazvuková lázeň	Směs deuterovaných IS	Gradient eluce A: 5mM mravenečnan amonny a 0.1% FA B: MeOH:CAN (1:1) s 0.1% FA	Acclaim RSLC 120 C18 (2.1 × 100 mm, 2.2 μm, 40 °C)	Orbitrap (Exactive) MS	[116]
Aripiprazol, ziprasidon (+ dalších 12 analytů)	Krysí chlupy	Proces sušení	Desipramin-d ₃	Gradient eluce, A: 2 mM mravenečnan amonny/ 0.2% FA ve vodě B: 2 mM mravenečnan amonny/ 0.2% FA v ACN	Kinetex C18 (3.0 × 50 mm, 2.6 μm, 40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[117]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosférického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

Tab. 13: Přehled LC/MS a LC/MS/MS metod publikovaných pro kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných antidepresiv a antipsychotik v biologických vzorcích. Převzato z citace [1] a upraveno.

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku (recovery)	IS	Typ eluce a složení MF, (poměr, v/v)	Kolona	MS systém, (detekční mod)	Literatura
Aripiprazol a dalších analytů	+Lidské sérum a sliny	Sérum: LLE Sliny: SPE	Není	Směs methanolu a acetátového pufru	Phenyl-Hexyl, nejsou uvedeny rozměry, 20 °C	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[118]
Haloperidol, flupentixol a dalších analytů	+Lidská plazma	PPT	Flupentixol-d ₄ Haloperidol-d ₄	Gradientová eluce, A: 20 mM mravenečnan amonný ve vodě (pH 4) B: ACN	Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 50 mm; 1.7 μm, 40 °C)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[119]
flupentixol	Lidská plazma	LLE	mosapride	Izokratická eluce, ACN:voda: FA (36:64:1, v/v/v)	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)	LC-ESI(+)-MS/MS, (MRM mód, Q ₃)	[83]

IS, interní standard; MS, hmotnostní spektrometrie; PPT, metoda srážení proteinů; LLE, extrakce kapalina-kapalina; ESI(+), ionizace elektrosprejem (v pozitivním ionizačním modu); APCI(+), chemická ionizace za atmosférického tlaku (pozitivní ionizační mod); LC-MS/MS, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií; CID, kolizně indukovaná disociace; MRM, multiple reaction monitoring; CAD, kolizně aktivovaná disociace; Q₁, jednoduchý kvadrupól MS; Q₃, trojitý kvadrupól MS.

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem doktorské práce byl vývoj metod pro stanovení vybraných psychofarmak v séru a identifikaci metabolitů agomelatinu spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Stanoveny byly tři cíle:

1. Rozšířit možnosti terapeutického monitorování léčiv na Oddělení klinické farmakologie FN Ostrava o možnost stanovení deseti psychofarmak v séru pacientů. Úkolem bylo vyvinout, validovat a zavést do praktického použití metodu pro stanovení vybraných antidepresiv (agomelatin, vilazodon) a antipsychotik (amisulprid, asenapin, aripiprazol a jeho metabolit, iloperidon, melperon, ziprasidon, zotepin)
2. Doplnit stávající metodu o další látky: haloperidol, flufenazin a flupentixol a použít tuto validovanou metodu v klinické laboratoři pro analýzu patientských vzorků séra.
3. Vyvinout a aplikovat metodu pro screening a identifikaci metabolitů agomelatinu po inkubaci lidských hepatocytů, v patientských vzorcích krve a moči.

S řešením cílů souvisí následující publikační výstupy:

P. Šišťík, R. Uřinová, H. Brozmannová, I. Kacířová, P. Šilhán, K. Lemr, *Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication*, Biomed Chromatogr, 30 (2016) 217-224. V seznamu literatury cit [120]

P. Šišťík, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednář, *Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015)*, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 160 (2016) 39-53. V seznamu literatury cit. [1].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Stanovení vybraných psychofarmak pro účely jejich terapeutického monitorování

4.1.1 Současné stanovení deseti psychofarmak pro klinickou praxi

Publikováno v rámci prvoautorské publikace [120].

Chemikálie

Standardy vilazodonu, amisulpridu, aripiprazolu, dehydro-aripiprazolu hydrochloridu, iloperidonu, asenapinu, agomelatinu a monohydrátu hydrochloridu ziprasidonu byly zakoupeny od společnosti TRC (Toronto Research Chemicals Inc., Kanada), hydrochlorid melperonu byl získán od firmy Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), zotepin a alprenolol hydrochlorid byly pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Alprenolol byl použit jako interní standard (IS), protože Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) nepovoluje registraci této látky. Acetonitril HPLC čistoty byl zakoupen od společnosti J. T. Baker Inc. (Phillipsburg, USA). Methanol pro HPLC, octan amonný ($\geq 98\%$) a mravenčí kyselina ($\geq 95\%$) byly dodány firmou Merck (Darmstadt, Německo). Voda HPLC čistoty a síran zinečnatý ($\geq 99\%$) byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Sérum od zdravých dobrovolníků neobsahující sledované látky poskytlo krevní centrum, Fakultní nemocnice Ostrava. Externí kontroly kvality pro amisulprid, aripiprazol a ziprasidon byly zakoupeny od společnosti Recipe (Mnichov, Německo). Vzorke interních kontrol kvality (QC) byly připraveny přidavkem analytů do sér s jejich nulovou koncentrací.

Příprava zásobních roztoků pro validaci metody

Zásobní roztoky psychofarmak byly připraveny rozpuštěním navážky jednotlivých látek v methanolu tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mg/ml. Léčiva byla rozdělena do dvou skupin podle očekávaných terapeutických rozmezí v séru. Mezi látky tvořící směs o nízké koncentraci patří agomelatin, iloperidon a asenapin. Mezi látky tvořící směs o vyšší koncentraci patří agomelatin, amisulprid, hydrochlorid melperonu, zotepin, aripiprazol,

dehydroaripiprazol hydrochlorid, monohydrát hydrochloridu ziprasidonu a vilazodon. Agomelatin se nachází v obou skupinách, protože má široký rozsah koncentrací v lidském séru. Kalibrační standardy byly připraveny v následujících koncentracích: 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50 a 100 ng/ml pro analyty s nízkou koncentrací v séru a 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 500 a 1000 ng/ml pro látky s vyšší koncentrací. Vzhledem k tomu, že u některých látek byly použity soli, bylo nutné přepočítat jejich koncentrace. Výsledná koncentrace dehydroaripiprazolu byla: 2,3; 4,6; 9,3; 23,1; 46,2; 92,5; 231,1; 462,3; 924,6 ng/ml a 2,2; 4,4; 8,8; 22,0; 43,9; 87,8; 219,6; 439,2; 878,4 ng/ml pro melperon a pro ziprasidon byla koncentrace: 2,2; 4,4; 8,8; 22,1; 44,2; 88,4; 220,9; 441,7; 883,5 ng/ml. Alprenolol byl použit jako vnitřní standard a před použitím byl skladován při teplotě 4 °C. Koncentrace alprenololu byla 20 000 ng/ml, protože měl nízkou odezvu v ESI-MS. Zásobní roztoky a kalibrační standardy byly skladovány při teplotě -20 °C.

Úprava vzorku

Objem 0,2 ml séra byl napipetován do 10 ml skleněné zkumavky. Po přidání 0,05 ml IS, 0,05 ml kalibračního standardu, 0,5 ml srážecího roztoku a 0,2 ml vody byla směs míchána 30 s na vortexu. Jako srážecí činidlo byla použita směs 0,05 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ve směsi acetonitril:methanol (40:60, v:v). Po centrifugaci při 1370 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C byla horní vrstva přenesena do vialky. Vzorky pacientů, externí kontrolní vzorky kvality a interní vzorky kontroly kvality byly připraveny stejným způsobem, ale bez přidání 0,05 ml kalibračního standardu.

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Analýzy LC/MS/MS byly provedeny na systému Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) připojeného k trojitému kvadrupólu Quattro Micro API (Micromass, Manchester, UK). Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity UPLC RP BEH C18, 1,7 μ m, 2,1 \times 50 mm při 30 °C za použití binární gradientové eluce při průtoku 0,4 ml/min. Složení mobilní fáze A (2 mmol/l octan amonný, 0,1% mravenčí kyselina ve směsi voda : acetonitril 95 : 5, v/v) a B (2 mmol/l octan amonný, 0,1% mravenčí kyselina ve směsi voda :acetonitril 5 : 95, v/v). Časový průběh gradientové eluce byl následující: 0 min A : B 80:20; 3 min. 5:95; 3,1 min 80:20 a 5 min 80:20 (v/v). Teplota automatického dávkovače byla 4 °C, nastříkováno bylo 10 μ l vzorku. Během vývoje metody byly testovány ionizační režimy ESI+ a APCI+. Nastavení APCI+ iontového zdroje: koronový proud - 2 μ A; teplota iontového zdroje - 100 °

C; teplota APCI sondy - 500 ° C. Nakonec byl pro analýzu psychofarmak vybrán ESI+ ionizační mód s následujícími parametry: napětí na sprejovací kapiláře - 1,5 kV; teplota iontového zdroje - 100 ° C; desolvatační teplota - 420 ° C. Při vývoji metody bylo pro obě ionizační techniky testovány různé hodnoty napětí na kónusu (CV) a nastavení kolizní energie (CE). ESI+ mód poskytoval lepší výsledky ve srovnání s APCI+ a nakonec byl použit pro validaci metody a následně pro analýzu psychofarmak ve vzorcích lidského séra. Argon byl použit jako kolizní plyn v režimu sledování vybraných reakcí (SRM). Všechna data byla zpracována pomocí softwaru MassLynx 4.1 (Waters, Milford, USA). Identifikační a kvantifikační SRM přechody jsou uvedeny v tabulce 14.

Tab. 14: SRM přechody a porovnání ploch píků pro ionizaci ESI⁺ a APCI⁺ (průměry a směrodatné odchylky byly vypočítány ze 7 měření).

Pozn.: veličina CE je výrobcem označována jako kolizní energie, ale nastavované hodnoty jsou ve voltech. Převzato z citace [120] a upraveno.

Látka	ESI ⁺				APCI ⁺				R _t (min)
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	Plocha píku ± (SD)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	Plocha píku ± (SD)	
Agomelatin	244,0	185,0	40	360 * 10 ² ± (105 * 10)	244,1	185,0	46	132 ± (14)	1,38
		169,8	26						
Alprenolol (IS)	250,2	91,0	34	511 * 10 ³ ± (800 * 10)	250,1	90,9	40	120 * 10 ² ± (226)	1,06
		74,3	20						
Amisulprid	369,9	242,0	38	928 * 10 ⁴ ± (154 * 10 ³)	370,1	241,9	55	237 * 10 ± (72)	0,63
		111,9	24						
Aripiprazol	447,9	284,6	35	280 * 10 ⁴ ± (104 * 10 ³)	448,1	284,9	34	443 * 10 ² ± (129 * 10)	1,28
		98,0	40						
Asenapin	285,9	228,9	50	111 * 10 ³ ± (165 * 10)	286,1	228,9	30	121 * 10 ² ± (425)	1,21
		165,4	38						
Dehydroaripiprazol	446,0	285,0	52	111 * 10 ³ ± (197 * 10)	446,1	284,7	13	505 * 10 ² ± (192 * 10)	1,21
		98,0	46						

Tab. 14 - pokračování: SRM přechody a porovnání ploch píků pro ionizaci ESI⁺ a APCI⁺ (průměry a směrodatné odchylky byly vypočítány ze 7 měření). Pozn.: veličina CE je výrobcem označována jako kolizní energie, ale nastavované hodnoty jsou ve voltech. Převzato z citace [120] a upraveno.

Látka	ESI ⁺				APCI ⁺				R _t (min)
	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	Plocha píku ± (SD)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	Plocha píku ± (SD)	
Iloperidon	426,8	261,0	27	840 * 10 ⁴ ± (785 * 10 ²)	427,3	260,8	40	772 * 10 ± (194)	1,18
		96,0	44						
Melperon	264,2	165,0	19	111 * 10 ⁵ ± (236 * 10 ³)	264,1	165,2	19	313 * 10 ³ ± (104 * 10 ²)	0,96
		122,9	32						
Vilazodon	442,0	155,0	40	886 * 10 ⁴ ± (843 * 10 ²)	442,1	424,7	50	21 ± (4)	0,98
		197,0	32						
Ziprasidon	412,9	193,9	55	318 * 10 ³ ± (478 * 10)	413,0	193,9	38	957 * 10 ² ± (225 * 10)	1,05
		158,9	46						
Zotepin	331,9	72,0	30	651 * 10 ⁴ ± (157 * 10 ³)	332,1	71,9	33	102 * 10 ³ ± (273 * 10)	1,47
		165,4	38						

Validace metody

Metoda byla validována podle kritérií US Food and Drug Administration [81] na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, preciznost, přesnost, matricový efekt.

Selektivita

Testování selektivity bylo provedeno analýzou šesti vzorků séra od neužívajících dárců.

Linearita

Kalibrační křivky o 9 koncentračních bodech pro všechna psychofarmaka byly připravovány každý den (3 měření pro každou koncentrační hladinu). Vynášeny byly plochy standardů psychofarmak vztažené k ploše vnitřního standardu v závislosti na koncentraci psychofarmak. Aplikována byla vážená ($1/x$) lineární regrese. Zpětně vypočtená koncentrace všech kalibračních vzorků byla porovnána s jejich příslušnými nominálními hodnotami, opakovatelnost se pohybovala v rozmezí do 15% a u spodního limitu meze kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ) je hranice do 20%.

Preciznost a přesnost

Pro hodnocení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti byly standartní roztoky připraveny desetkrát. Z naměřených hodnot byly pro každou látku vypočítány: relativní směrodatná odchylka (SD), průměr (\bar{x}), recovery a variační koeficient (CV) a to analýzou tří koncentračních úrovní: 1,25, 5 a 25 ng/ml pro směs s nízkou koncentrací; 10, 100 a 500 ng/ml pro směs se vyšší koncentrací. Pro soli byly pro výpočet použity následující koncentrace: 9,3; 92,5 a 462,3 ng/ml pro dehydroaripiprazol, 8,8; 87,8 a 439,2 ng/ml pro melperon a 8,8; 88,4 a 441,7 ng/ml pro ziprasidon. U agomelatinu je terapeutické rozmezí poměrně široké, proto byl analyzován na šesti koncentračních hladinách (1,25; 5, 10, 25, 100 a 500 ng/ml). Hodnoty preciznosti (variační koeficient, CV) by se měla pohybovat v rozmezí $\pm 15,0\%$ od nominální koncentrace a $\pm 20,0\%$ pro LLOQ.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

První kalibrační bod byl pro všechna psychofarmaka akceptován jako spodní limit kvantifikace (LLOQ) z důvodu toho, že odezva látek byla desetkrát vyšší než odezva blanku s přijatelnou přesností (20 %) a správností (80-120 %). Bylo provedeno nařazení prvního kalibračního bodu za účelem vyhodnocení meze detekce (limit of detection, LOD), který by

měl být 3krát nižší než LOQ, což vyplývá z poměru signálu k šumu 3:1. Výsledná koncentrace, která se následně analyzovala byla 0,08 ng/ml pro agomelatin, asenapin a iloperidon, 0,8 ng/ml pro amisulprid, aripiprazol, dehydroaripiprazol, vilazodon a zotepin a 0,7 ng/ml pro melperon a ziprasidon.

Stabilita

Stabilita při 4 °C (stabilita v automatickém dávkovači) byla testována na vzorcích interních kontrol kvality. Extrakty vzorků kontrol byly připraveny a opakovaně analyzovány během pěti následujících dnů (jeden týden) a nebyly pozorovány žádné koncentrační změny.

Matricový efekt

Pro zjištění matricového efektu byla použita metoda zavádění roztoku standardu za kolonu. Na chromatografickou kolonu byl nastříknut upravený vzorek (S0), kdy místo séra bylo použito 0,2 ml vody, a vzorek připravený z 0,2 ml séra neobsahujícího psychofarmaka (S). Za kolonou byl do toku mobilní fáze kontinuálně zaváděn roztok obsahující 100 ng/ml každého jednotlivého psychofarmaka. Pro ověření, zda by nemohl ovlivňovat ionizaci analytů amisulprid, byl přidán o koncentraci 5 (nízká hladina) a 100 ng/ml (vysoká hladina) do vzorků S0 a S a rovněž tyto vzorky byly dávkovány na kolonu. Plochy píků amisulpridu a IS vzorků S a S0 byly následně porovnány pro výpočet matricového efektu. Experiment byl proveden s deseti vzorky sér bez psychofarmak.

Testování potenciálních interferencí s jinými léčivy

Pro testování potenciálních interferencí byly ke vzorkům čistého séra přidány karbamazepin, lamotrigin, valproová kyselina a klonazepam. Jedná se o láky, které by pacienti potenciálně mohli užívat společně se stanovovanými psychofarmaky. Vzhledem k chromatografické separaci k interferenci nedocházelo.

Analýza patientských vzorků

Vilazodon, asenapin a iloperidon nebyly podávány pacientům, a proto se neobjevily ve studovaných reálných vzorcích. Všechny ostatní léky byly nalezeny ve vzorcích od pacientů psychiatrického oddělení Fakultní nemocnice v Ostravě. Vzorky krve byly odebírány před podáním léčiva a následně byly analyzovány koncentrace psychofarmak.

Po odběru byly patientské vzorky okamžitě odeslány do naší laboratoře, centrifugovány a analyzovány ve stejný den. Údaje jsou shrnuty v tabulce 18.

4.1.2 Stanovení haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu v séru

Dalším požadavkem z psychiatrického oddělení FN Ostrava byla analýza haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu u dlouhodobě léčených pacientů. Podmínky a parametry analýzy byly nastaveny podle námi vyvinutých metod pro stanovení přecházející skupiny psychofarmak. Pro analýzu flufenazinu a flupentixolu byly vyhovující a výsledky validace metody byly při těchto podmínkách přijatelné. Haloperidol však vykazoval malou odezvu a použité experimentální podmínky neumožňovaly jeho stanovení na úrovni terapeutických koncentrací. Z tohoto důvodu byly pro validaci vytvořeny 2 skupiny analytů. Jednu tvořil-flufenazin a flupentixol a druhou samostatně haloperidol.

Nastavení hmotnostního spektrometru bylo stejné, jako v případě dříve stanovovaných psychofarmak, pouze u haloperidolu došlo ke změně složení mobilní fáze. Je třeba poznamenat, že snaha využít stejné podmínky pro širší skupinu psychofarmak je dána požadavky laboratoře pro TDM. Snahou je minimalizovat počet nezbytně zaváděných metod do provozu laboratoře.

Chemikálie

Pro flufenazin, flupentixol a haloperidol byly použity standardy od společnosti Sigma-Aldrich. Mravenčí kyselina (reagent grade, > 95 %) byla zakoupena od společnosti Merck. Ostatní použité chemikálie a jejich dodavatelé byli stejní, jako v případě dříve uváděných psychofarmak.

Příprava zásobních roztoků pro validaci metody

Zásobní roztoky o koncentraci 0,1 mg/ml byly připraveny navážením flufenazinu, flupentixolu a haloperidolu a rozpuštěny v methanolu. Naředěním zásobních roztoků byly připraveny směsné standardní roztoky flufenazinu a flupentixolu o koncentraci: 0,624; 1,285; 2,5; 5; 10; 20; 100; 200; 400 ng/ml. Pro haloperidolu pak o koncentraci: 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 100; 200; 400 ng/ml. Pracovní roztok pro vnitřní standard, kterým byl Alprenolol, byl připraven o koncentraci 20 000 ng/ml. Tento vnitřní standard byl použit jak pro flufenazin a flupentixol, tak pro haloperidol. Vzorky séra (od neužívajících dárců) byly dodány z krevního centra FN Ostrava. Interní kontrolní vzorky pro flufenazin a flupentixol

byly připraveny ze standardních vzorků na Oddělení farmakologie FN Ostrava. Externí kontroly haloperidolu byly zakoupeny od společnosti Biorad.

Úprava vzorku

Postup úpravy patientských vzorků séra je pro všechna psychofarmaka totožný a je uvedena na straně 46 v části úprava vzorku.

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Oproti dříve validované metodě (pro stanovení 10 psychofarmak) byl pro analýzu flufenazinu, flupentixolu a haloperidolu použit H-class UPLC ternární systém ve spojení s trojitým kvadrupólem XEVO-TQD (Waters).

Pro analýzu haloperidolu byla použita mobilní fáze (průtok 0,4 ml/min) o složení A: 0,1 % HCOOH ve vodě; B: 0,1 % HCOOH v methanolu. Pro analýzu byla použita gradientová eluce s následujícím nastavením: 0 min A: B = 80 : 20, 3 min 5 : 95, 3,1 min 80 : 20, 5 min 80 : 20 (v/v). Separace byla prováděna na koloně Acquity UPLC RP BEH C18, (1,7 μm; 2.1 x 50 mm), teplota kolony 30 °C, teplota zásobníku automatického dávkovače 10 °C, průtok 0.4 ml/min. Čas analýzy byl 5 min, nástřik vzorku: 5 μl.

Pro analýzu flufenazinu a flupentixolu byla použita mobilní fáze obsahující A: 2 mmol/l octanu amonného, 0,1% kyselina mravenčí ve směsi voda : acetonitril 95 :5 (v/v), B: 2 mmol/l octanu amonného, 0,1% kyselina mravenčí ve směsi voda : acetonitril 5 : 95 (v/v). Kolona byla stejná a jednalo se o Acquity UPLC RP BEH C18, (1,7 μm; 2.1 x 50 mm), teplota kolony 30 °C, teplota zásobníku automatického dávkovače 10 °C, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min.

Nastavení hmotnostního spektrometru pro haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu bylo totožné, ionizace byla prováděna v módu ESI+ s následujícím nastavením: napětí na sprejovací kapiláře: 1,5 kV, desolvatační teplota: 420 °C, průtok desolvatačního plynu (dusíku): 650 l/hod., teplota iontového zdroje: 100 °C. Tato nastavení jsou totožná pro všechna psychofarmaka. Nastavení SRM přechodů jsou uvedena v Tab. č. 15.

Tab. 15: Identifikační a kvantifikační (tučně označené) přechody pro HLP, FLF a FLP

látko	SRM přechod	Napětí na kónusu (V)	Kolizní energie (V)
Alprenolol (IS)	250.4>115.9	44	16
Flupentixol	434.9>99.8	40	40
Flupentixol	434.9>264.8	40	40
Flufenazin	438.0>142.9	35	30
Flufenazin	438.0>171.0	35	20
Haloperidol	376.0>122.8	30	42
Haloperidol	376.0>164.8	30	22

Validace metody

Metoda byla validována na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, preciznost, přesnost, matricový efekt.

Selektivita

Deset sér vzorků z krevního centra FN Ostrava od neužívajících dárců bylo analyzováno na možnou interferenci s HLP, FLF a FLP a také s IS. Navíc k ověření možných interferencí s jinými běžnými léky (nejčastěji antiepileptiky) a / nebo jejich metabolity byly použity vzorky séra běžně dostupné v laboratoři z dřívějších rutinních TDM analýz. Vzorky obsahovaly antiepileptika stanovovaná na oddělení klinické farmakologie (lamotrigin, fenobarbital, rivotril, fenytoin, karbamazepin a jeho metabolit, levetiracetam).

Linearita

Sérum od neužívajících dárců (0,2 ml) s přídavkem 0,05 ml odpovídajícím analytickým standardem HLP a 0,05 ml roztoku IS, abychom získaly jeho koncentraci v lidském séru: 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 ng/ml. Stejným způsobem byla provedena linearita pro směs FLF a FLP, kdy koncentrace FLF a FLP v extrahovaném séru byla: 0,156; 0,321; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 25; 50; 100 ng/ml. Tyto Kalibrační křivky byly připravovány a měřeny každý den. Aplikována byla vážená (1/x) lineární regrese.

Preciznost a přesnost

Standardní roztoky byly připraveny desetkrát pro hodnocení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti a měřeny buď ve stejný den anebo v různé dny. Ze získaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka, průměr, recovery a variační koeficient pro každou látku a to analýzou tří koncentračních úrovní. Pro testování opakovatelnosti HLP byly použity následující koncentrace: 0,156; 5,0 a 25,0 ng/ml a pro hodnocení mezilehlé preciznosti byla použita externí kontrola kvality o koncentracích: 2,15; 4,92 a 9,75 ng/ml. Směs FLF a FLP byla v testu opakovatelnosti analyzována na těchto koncentračních hladinách: 0,3; 2,5 a 10,0 ng/ml. Pro mezilehlou preciznost byly použity interní kontroly kvality o koncentracích 2,5; 5,0 a 10,0 ng/ml. V hodnocení preciznosti a přesnosti byl v obou metodách (jak pro HLP, tak pro směs FLF a FLP) variační koeficient pod hodnotou $\pm 15,0$ % a recovery v rozmezích 85-115 %, což je v doporučeních pro validace bioanalytických metod. Naměřené vzorky byly statisticky zpracovány vypočtením aritmetického průměru, relativní směrodatné odchylky, variačního koeficientu (coefficient of variation, CV) a recovery. Výsledky opakovatelnosti měření jsou uvedeny v tabulce č. 19 a výsledky mezilehlé preciznosti měření v tabulce č. 20.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro spodní limit kvantifikace (LLOQ) byl akceptována koncentrace prvního bodu kalibrační křivky z důvodu toho, že plocha odpovídala minimálně deseti násobku ploše blanku s přijatelnou přesností (CV 20 %) a přesností (recovery v rozmezí 80-120 %). Pro stanovení limitu detekce (LOD, poměr signálu k šumu = 3:1) v SRM režimu byl nařazen první bod kalibrační křivky 3 krát.

Stabilita:

Stabilita HLP, FLF a FLP byla testována na vzorcích interních kontrol kvality. Stabilitní testy byly totožné s dříve uváděnými v kapitole: Stabilita.

Matricový efekt:

Opět byla použita metoda postkolonové infuze pro identifikaci matricového efektu. Experiment byl navolen stejně, jak je popsán v předchozí části na str. 51.

Analýza patientských vzorků

Vhodnost metody byla ověřena analýzou reálných patientských vzorků, které byly odeslány nejen z psychiatrického oddělení FN Ostrava, ale také ze spádové oblasti či jiných psychiatrických ambulancí. Soubor zahrnoval spektrum koncentrací od nízkých až po vysoké hodnoty. Vzorky byly analyzovány dvakrát a jejich koncentrace odečítána z kalibrační křivky metodou vnitřního standardu.

4.2 Identifikace metabolitů agomelatinu

4.2.1 Po inkubaci lidských hepatocytů agomelatinem

Příprava těchto vzorků k analýze byla prováděna na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého prof. Ing. Janem Vackem, Ph. D. a Mgr. Martinou Zatloukalovou Ph. D.

Chemikálie

Standard agomelatinu byl zakoupen od společnosti Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada) a zaslán k inkubaci s hepatocyty na Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařské fakulty, UP Olomouc. Acetonitril LC čistoty byl zakoupen od společnosti J. T. Baker Inc. (Phillipsburg, USA). HPLC methanol, octan amonný ($\geq 98\%$) a kyselina mravenčí (98-100%) byly dodány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Voda HPLC čistoty, fosfátový pufr a síran zinečnatý ($\geq 99\%$) byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

Biotransformace agomelatinu na suspenzích kulturách lidských hepatocytů

Izolace a příprava suspenzí kultur lidských hepatocytů

Protokol o získání jaterní tkáně byl v souladu s požadavky Etické komise Fakultní nemocnice v Olomouci. Bylo provedeno deset izolací lidských hepatocytů od desíti multiorgánových dárců: suspenzní kultura LH48, žena, 17 let; LH49, muž, 38 let; LH50, žena, 55 let; LH51, žena, 58 let; LH52, žena, 60 let; LH53, žena, 58 let; LH54, muž, 71 let; LH55, muž, 28 let; LH58, žena, 47 let a LH59, žena, 42 let. Hepatocyty byly izolovány podle protokolu Pichard *et al.* [121]. Získané buňky byly resuspendovány v médiu bez séra (směs 1:1 Williamsova E a Ham F12 kultivačního média), přesné složení média lze najít v cit. [121]. Lidské hepatocyty (4×10^6 buněk/ml) byly inkubovány s agomelatinem ($20 \mu\text{M}$) v rotačním inkubátoru po dobu 1 a 2 hodiny při 37°C . Viabilita buněk na konci inkubace byla zkontrolována barvením trypanovou modří [122]. Po inkubaci byl 1 ml suspenze hepatocytů centrifugován ($100 \times g$) po dobu 3 minut při laboratorní teplotě a buněčný sediment a kultivační médium byly odděleny a uloženy při -80°C .

Zpracování vzorků pro analýzu HPLC/ESI-QqTOF MS

Po rozmražení vzorků byly hepatocyty třikrát promyty v 0,5 ml roztoku PBS (pH 7,4), resuspendovány v 0,4 ml metanolu s přidavkem 5 % kyseliny octové (v/v), sonikovány (cyklus 0,5, amplituda 50, 10-krát) pomocí zařízení UP 200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Německo) a centrifugovány ($14\ 000 \times g$) po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Kultivační médium bylo naředěno 1:1 (v/v) s metanolem s přidavkem 5 % kyseliny octové (v/v), centrifugováno ($14\ 000 \times g$) po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Supernatanty z obou frakcí byly analyzovány pomocí HPLC/ESI-QqTOF MS.

Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Chromatografie byla provedena na binárním ACQUITY UPLC systému (Waters, Milford, USA). Autosampler byl kondicionován na teplotu 4 ° C. Pro separaci bylo testováno celkem 5 kolon (dvě HPLC a tři UHPLC kolony). Specifikace HPLC a UHPLC kolon jsou uvedeny v tabulce 16. Binární gradientová eluce byla provedena při průtokové rychlosti 0,4 ml/min a následujícím složení mobilní fáze A (2 mmol/l octan amonný, 0,1 % kyselina mravenčí v 5% acetonitrilu, v/v) a mobilní fáze B (2 mmol/l octan amonný, 0,1% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu, v/v). Gradientová eluce pro HPLC kolony: 0 min A: B = 80:20; 2 min 80:20; 11 min 5:95; 12,5 min 80:20; 15 min 80 : 20 (v/v). Gradientová eluce pro UHPLC kolony: 0 min, A:B = 80:20; 0,65 min, 80:20; 3,67 min, 5:95; 4,17 min, 80:20 a 5 min, 80:20 (v/v). Teplota kolony byla udržována na 30 °C. Doba chromatografické analýzy byla 15 minut pro HPLC a 5 min pro UHPLC. Objem nástřiku byl 5 µl.

Hmotnostní spektrometr Waters Q-TOF Premier (Waters, Manchester, Velká Británie) s elektrosprejem pracoval v pozitivním módu se napětím na sprejovací kapiláře 2,5 kV a napětím na kónusu 35 V. Teplota iontového zdroje a desolvatační teplota byly nastaveny na 100 °C a 420 °C. Průtok plynu na kónusu a průtok desolvatačního plynu (dusíku) byl nastaven na hodnotu 30 l/h resp. 700 l/h. Data byla získána skenováním v rozsahu m/z 50 až 1000 se skenovacím časem 0,5 s. Pro identifikaci metabolitů agomelatinu byl použit software firmy Waters Masslynx V4.1 s programem pro vyhledávání signálů metabolitů MetaboLynx. Hmotnostní spektrometr byl kalibrován pomocí roztoku mravenčanu sodného v acetonitrilu. Data byla automaticky centrována a při sběru byla použita korekce m/z na leucin-enkefalin (200 µg/l ve směsi voda: acetonitril: kyselina mravenčí, 100: 100: 0,2, v/v při průtoku 5 µl/min).

Dále byl využit hmotnostní spektrometr Waters Synapt G2-S (Waters, Manchester, Velká Británie) rovněž ve spojení s UPLC. Nastavení bylo stejné jako pro Waters Q-TOF Premier.

Data byla získána dvěma nezávislými funkcemi skenování (MS a MS^E experimenty), které umožnily simultánní sběr dat při nízké a vysoké kolizní energii během jediného experimentu. Kolizní napětí bylo nastaveno na 5 V pro funkci 1 a na 10-30 V pro funkci 2. Skenování dat umožnilo sledování iontů prekurzorů i fragmentů.

Tab. 16: Specifikace testovaných HPLC a UHPLC kolon

Název kolony	Typ fáze	Navázaná skupina	Rozměr (mm)	Průměr částic (μm)	Velikost pórů (Å)	Plocha povrchu (m²/g)
Zorbax Eclipse XDB Phenyl	silikagelová	fenyl	150 x 2,1	5	80	180
Zorbax Eclipse XDB C₁₈	silikagelová	oktadecyl	150 x 2,1	5	80	180
Waters BEH C₁₈	hybridní	oktadecyl	100 x 2,1	1,7	130	185
Waters BEH C₈	hybridní	oktyl	100 x 2,1	1,7	130	185
Waters BEH Phe	hybridní	fenyl	100 x 2,1	1,7	130	185

4.2.2 Z patientských vzorků krve a moči

Chemikálie

Acetonitril LC čistoty byl zakoupen od společnosti J. T. Baker (Phillipsburg, USA). HPLC methanol, octan amonný ($\geq 98\%$), mravenčí kyselina ($\geq 95\%$) a octová kyselina ($\geq 99\%$) byly dodány firmou Merck (Darmstadt, Německo). Voda HPLC čistoty a síran zinečnatý ($\geq 99\%$) byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Acetátový pufr o pH 4.5 a fosfátový pufr o pH 8.0 byl dodán lékárnou Fakultní nemocnice Ostrava. β -glukuronidasa, (BG 100, Liquid beta-glucuronidase from Red Abalone, 10 ml) byla dodána společností Chromservis. SPE kolonky Phenomenex Strata C18-U, ($55\ \mu\text{m}$, $70\ \text{\AA}$, $1000\ \text{mg}/6\text{ml}$), Strata-X-drug B $33\ \mu\text{m}$ a silný polymerní kation měnič $30\ \text{mg}/3\ \text{ml}$, 50ks. Beta Gone, beta glucuronidasa Removal pro Ne-Rekombinantní Enzym, 1 mL, 100ks byly také dodány společností Chromservis.

Odběr vzorků séra a moči

Pro analýzu biologických vzorků byly odebírány vzorky krve a moči od 10 dárců ve FN Ostrava (2 muži a 8 žen).

Krev byla odebírána do zkumavek (typu Neutral) před užitím tablet agomelatinu. Následně pak 1 hodinu a 2 hodiny po podání agomelatinu. Odběry krve probíhaly v přesně stanovených časech. Krev byla následně centrifugována a pro analýzu bylo použito sérum.

Moč byla u dobrovolníků odebrána (do močových odběrových zkumavek) před užitím léčiva a následně 3 další odběry byly plánovány tak, aby první odběr byl v rozmezí 1-3 hodin a druhý 4-6 hodin po užití agomelatinu, posledním odběrem byla získána první ranní moč. U vzorků moči nebylo možné dodržet jednotný postup odběru, a proto byl odběr v uváděných časových rozmezích.

Vzorky byly skladovány při teplotě $-70\ ^\circ\text{C}$. V den analýzy byly vzorky připraveny a dopraveny na suchém ledu k analýze na Přírodovědeckou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci.

Úprava vzorků moči

Před analýzou reálných patientských vzorků byly testovány 4 postupy úprav vzorků moči. Tři postupy využívaly SPE kolonek (Postup 1, 2 a 3), čtvrtý postup byl založen na srážení

bílkovin (popis viz níže). Porovnávala se extrakční výtěžnost moči s přidavkem agomelatinu (koncentrace v moči 50 ng/ml).

Postup 1 (SPE Strata C18-U)

- 1) kondicionace kolony –
 - 1) 5 ml acetonitrilu
 - 2) 5 ml 5% acetonitrilu ve vodě
- 2) nanesení vzorku - 2 ml moči s přidavkem agomelatinem (50 ng/ml)
- 3) Promývání sorbentu- 5 ml 5% acetonitrilu
- 4) Sušení dusíkem 4 min
- 5) Eluce analytu- 2 ml 1% octové kyseliny v acetonitrilu
- 6) Odpaření pod dusíkem při laboratorní teplotě a následné rozpuštění odparku v 500 μ l mobilní fáze (složení odpovídající začátku chromatografického gradientu)

Postup 2 (SPE Strata X-Drug B)

- 1) kondicionace kolony –
 - 1) 2 ml methanolu
 - 2) 2 ml fosfátového pufru pH 8.0
- 2) nanesení vzorku- 0,5 ml moči s přidavkem agomelatinu (50 ng/ml) + 0,5 ml fosfátového pufru pH 8 (1:1, v:v)
- 3) Promývání sorbentu –
 - 1) 2 ml vody
 - 2) 2 ml acetátového pufru pH 4,5
 - 3) 1ml methanolu
- 4) Sušení dusíkem 3 min
- 5) Eluce analytu 1 ml dichlormethan:isopropanol:amoniak (4:1:0,1; v/v/v)
- 6) Odpaření pod dusíkem při laboratorní teplotě a následné rozpuštění odparku v 500 μ l mobilní fáze (složení odpovídající začátku chromatografického gradientu)

Postup 3 (SPE B-Gone)

- 1) 1 ml moče s přidavkem agomelatinu (50 ng/ml)+ 0,5 ml acetátového pufru (pH 4,5) + 30 μ l β -glukuronidázy
- 2) 10 min inkubace v uzavřené zkumavce při 70 °C

Odebráno 200 µl do zkumavky + 133 µL 1% kys. mravenčí v metahanolu a nadávkování na SPE kolonku B-Gone. Extrakt byl následně přímo nastříknut na chromatografickou kolonu.

Postup 4 (PPT)

- 1) 100 µl moči s přidavkem agomelatinu (50 ng/ml) + 200 µl acetonitrilu
- 2) Promícháno, centrifugace 10 min při 10 °C
- 3) Supernatant byl odebrán do vialky

4.2.3 Úprava vzorků krve

Postup 5 (PPT)

- 1) 200 µl séra + 400 µl srážecí směsi (methanol:acetonitril = 3:2, v/v, 6% ZnSO₄) + 100 µl vody
- 2) centrifugace 10 min, 10°C
- 3) supernatant přenesen do vialky

4.3 UHPLC/ESI-QqTOF MS

Pro analýzu biologických vzorků krve a moči byl použit UPLC systém spojený s hmotnostním spektrometrem Waters Synapt G2-S (Waters, Manchester, Velká Británie). Data byla získána skenováním v rozsahu m/z 50 až 1200 a vyhodnocení proběhlo pomocí softwaru MassLynx V4.1 (Waters, Milford, USA). Metabolity byly detekovány v režimu pozitivního módu ESI⁺. MS podmínky byly následující: napětí na sprejovací kapiláře 2,5 kV; teplota iontového zdroje 100 °C; desolvatační teplota 420 °C; průtok desolvatačního plynu (dusík) 700 l/h. Argon byl použit jako kolizní plyn. Separace proběhla na koloně Waters BEH C₁₈ (100 x 2.1 mm, 1,7 µm) s gradientovou elucí: 0 min A:B = 95:5; 5,67 min 5:95; 6,17 min 5:95; 7,0 min 95:5 a 8 min 95:5 (v/v). Kolona byla termostatována na 30 °C a teplota automatického dávkovače byla nastavena na 5 °C.

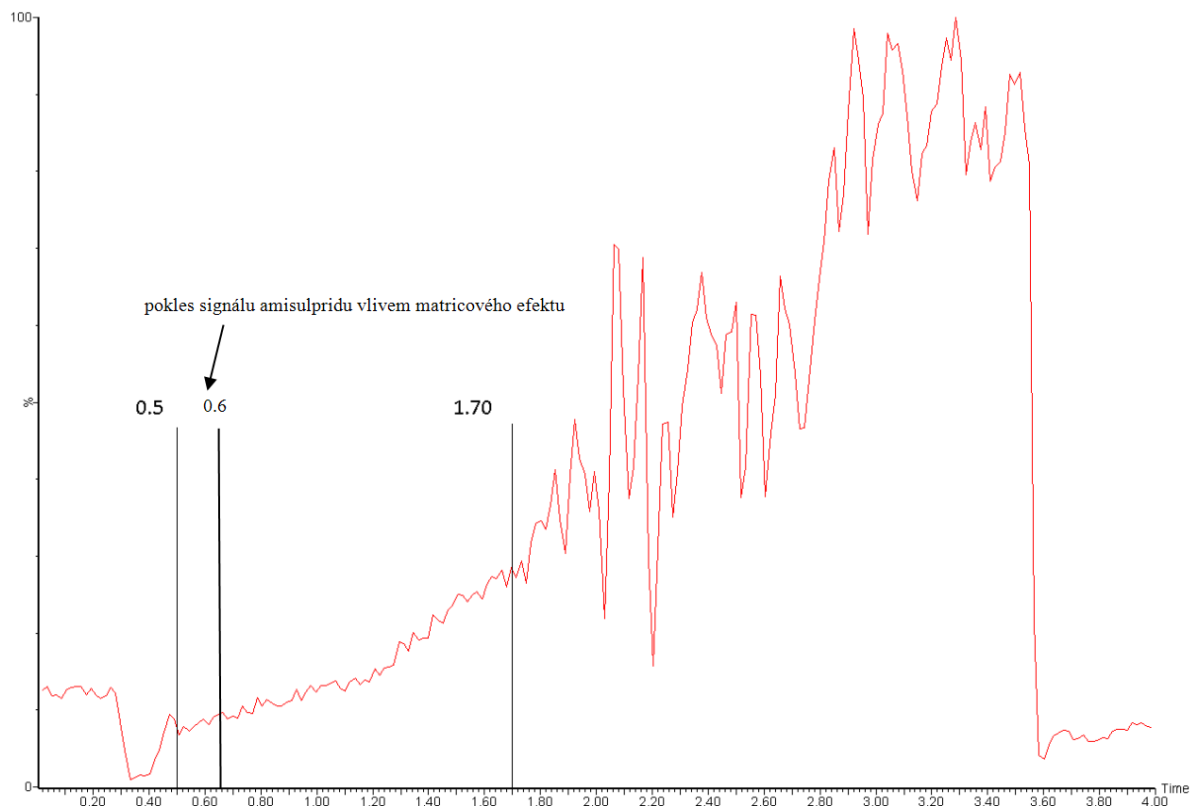
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Současné stanovení deseti psychofarmak pro klinickou praxi

Ionizační parametry, napětí na kónusu (cone voltage, CV) a kolizní energie (collision energie, CE) pro ESI+ a APCI+ byly systematicky laděny pomocí post-kolonové zavádění (0,2 ml/ min) roztoků standardů za použití nejvyšší koncentrace pro každou látku. Byl použit průtok 0,2 ml/min a složení mobilní fáze A: B bylo v poměru 50:50. Za těchto experimentálních podmínek byly u všech psychofarmak pozorovány protonované molekuly $[M + H]^+$, které představovaly ionty prekurzorů pro SRM přechody. Nastavení těchto přechodů jsou společně s plochami píků pro jednotlivá psychofarmaka uvedena v Tabulce 14. Pro validaci metody byla vybrána ESI+ ionizace pro všechna psychofarmaka, neboť poskytovala lepší odezvu ve srovnání s APCI+.

Matricové efekty za použití ESI+ ionizace byly pro všechny analyty zanedbatelné v retenčním čase mezi 0,5 a 1,7 minuty (viz obr. 3). Pro amisulprid (látko s nejmenší retencí) byla hodnota matricového efektu 9% pro nízkou koncentraci a 13,8% pro vysokou koncentraci. Obě hodnoty matricového efektu jsou v přijatelném rozmezí.

Obr. 3: Post-kolonové zavádění roztoků psychofarmak při nástřiku séra bez sledovaných látek (po PPT bylo nastříknuto 10 μ l séra na kolonu). Na obrázku je označeno rozmezí s negativním matricovým efektem. Převzato z citace [120] a upraveno.

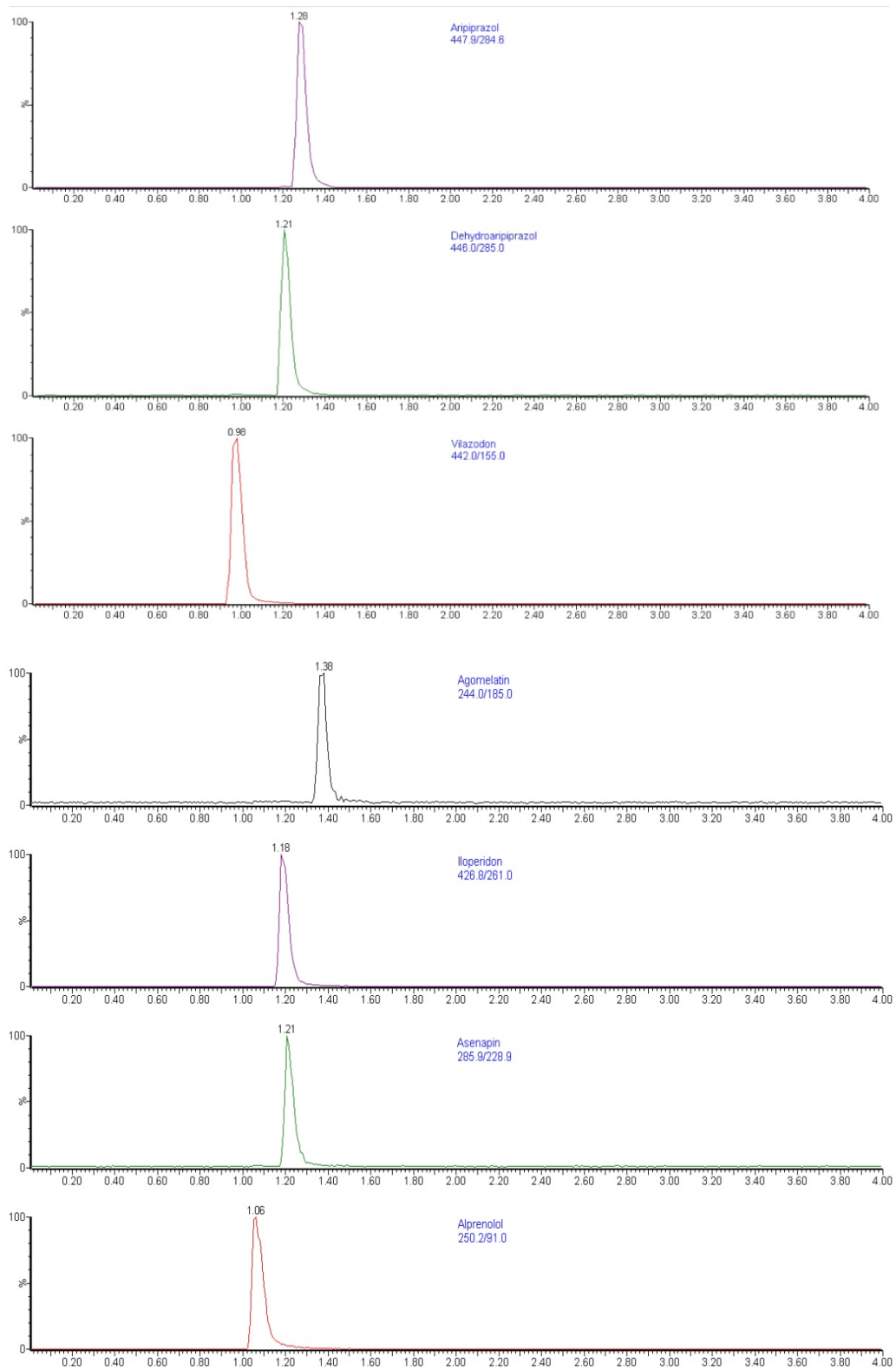


Tabulka 17 shrnuje parametry validace metody a uvádí koncentrační rozsahy, korelační koeficienty, LOD, regresní modely za použití vážené ($1/x$) regresní analýzy, výtěžky (recovery), preciznost a přesnost za podmínek opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti pro každou látku. První bod kalibrační křivky u všech látek splňoval kritéria přesnosti (v rozmezí 80-120%) a preciznosti ($CV < 20\%$) a byl proto přijat jako LLOQ. Chromatogramy získané analýzou séra s přidávkem standardů o nejvyšší koncentraci dokládají dostatečnou separaci a rychlou analýzu (obr. 4).

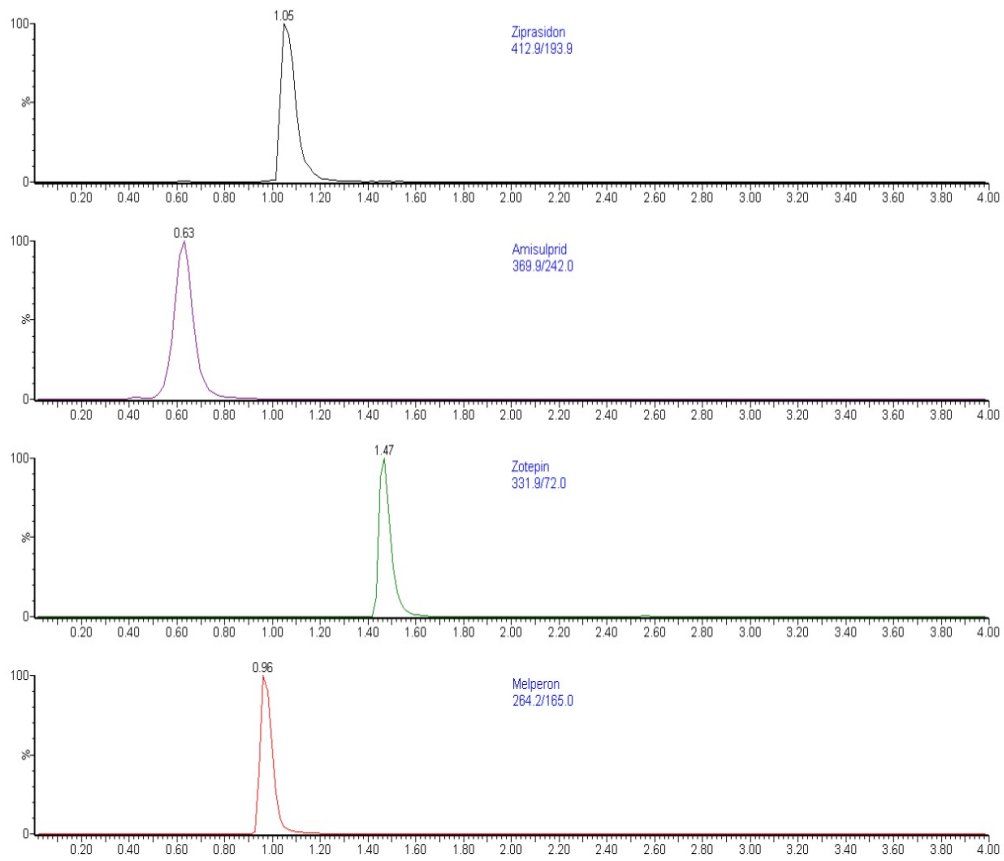
Pro amisulprid, aripiprazol a ziprasidon byly k dispozici komerční vzorky kontrol kvality. U ostatních látek (agomelatin, asenapin, dehydroaripiprazol, iloperidon, melperon, vilazodon a zotepin) nebyly komerční kontroly dostupné, a proto byly připraveny interní kontrolní vzorky na dvou koncentračních hladinách. Kontrolní vzorky byly měřeny společně se vzorky pacientů. Externí a interní QC vzorky potvrdily aplikovatelnost metody

Poslední látka opouští chromatografickou kolonu v 1,6 min. (obr. 4). Celkový čas chromatografické analýzy byl zvolen 5 minut z důvodu vymytí případných interferujících látek z kolony.

Obr. 4: UPLC-MS/MS chromatogramy vzorků séra s přidavkem standardů (nejvyšší koncentrace). Převzato z citace [120].



Obr. 4 - pokračování: UPLC-MS/MS chromatogramy vzorků séra s přidavkem standardů (nejvyšší koncentrace). Převzato z citace [120].



Tab. 17: Validační parametry psychofarmak. Převzato z citace [120].

Látka	Korelační koeficient	Koncentrační rozsah (ng/ml)	LOD	Kalibrační model	Koncentrace (ng/ml)	Opakovatelnost (n = 10)			Mezilehlá preciznost (n = 10)		
						Naměřená koncentrace ± SD (ng/ml)	CV (%)	R (%)	Naměřená koncentrace ± SD (ng/ml)	CV (%)	R (%)
Agomelatin	0,996	0,25-100	0,08	Linear 1/X	1,25	1,2 ± 0,0	4,0	95,4	1,2 ± 0,1	7,9	96,0
					5	5,0 ± 0,1	1,6	100,6	5,2 ± 0,3	6,4	104,8
					25	24,9 ± 0,4	1,5	99,7	25,0 ± 1,9	7,6	100,1
	0,997	2,5-1000	Quad 1/X	10	10,4 ± 0,5	4,7	103,7	10,7 ± 0,9	8,2	106,8	
				100	101,8 ± 1,5	1,4	101,8	101,9 ± 3,1	3,0	101,9	
				500	499,7 ± 5,0	1,0	99,9	501,1 ± 9,0	1,8	100,2	
Amisulprid	0,998	2,5-1000	0,8	Quad 1/X	10	10,0 ± 0,2	1,7	100,0	10,8 ± 0,4	3,7	108,3
					100	99,0 ± 1,5	1,5	99,0	103,7 ± 2,3	2,2	103,7
					500	498,6 ± 4,4	0,9	99,7	501,4 ± 4,8	1,0	100,3
Aripiprazol	0,998	2,5-1000	0,8	Linear 1/X	10	10,0 ± 0,1	1,0	100,0	11,0 ± 0,9	7,8	110,4
					100	99,9 ± 1,0	1,0	99,9	104,3 ± 2,8	2,7	104,3
					500	498,2 ± 4,5	0,9	99,6	503,4 ± 4,1	0,8	100,7
Asenapin	0,997	0,25-100	0,08	Linear 1/X	1,25	1,2 ± 0,1	5,5	97,1	1,3 ± 0,1	5,6	102,7
					5	5,0 ± 0,1	1,2	100,1	5,7 ± 0,4	6,4	113,3
					25	25,0 ± 0,2	0,9	99,9	26,2 ± 1,1	4,3	104,6
Dehydroaripiprazol	0,999	2,3-924,6	0,8	Linear 1/X	9,3	9,3 ± 0,1	0,9	100,9	10,1 ± 0,6	5,8	108,2
					92,5	92,6 ± 0,4	0,4	100,1	97,0 ± 4,2	4,3	104,9
					462,3	463,5 ± 2,7	0,6	100,3	466,3 ± 3,7	0,8	100,9
Iloperidon	0,998	0,25-100	0,08	Linear 1/X	1,25	1,2 ± 0,1	4,0	93,7	1,3 ± 0,1	5,5	105,3
					5	5,1 ± 0,1	1,2	101,4	5,6 ± 0,3	5,9	111,7
					25	22,0 ± 0,5	2,5	87,9	25,8 ± 0,9	3,3	103,1

Tab. 17 - pokračování: Validační parametry psychofarmak. Převzato z citace [120].

Látka	Korelační koeficient	Koncentrační rozsah (ng/ml)	LOD	Kalibrační model	Koncentrace (ng/ml)	Opakovatelnost (n = 10)			Mezilehlá preciznost (n = 10)		
						Naměřená koncentrace ± SD (ng/ml)	CV (%)	R (%)	Naměřená koncentrace ± SD (ng/ml)	CV (%)	R (%)
Melperon	0,996	2,2-878,4	0,7	Linear 1/X	8,8	8,9 ± 0,1	1,2	101,3	9,4 ± 0,7	7,9	107,3
					87,8	87,1 ± 0,9	1,0	99,2	90,2 ± 1,7	1,9	102,7
					439,2	435,3 ± 3,6	0,8	99,1	443,7 ± 2,5	0,6	101,0
Vilazodon	0,999	2,5-1000	0,8	Quad 1/X	10	10,1 ± 0,1	1,1	100,5	10,8 ± 0,7	6,8	108,2
					100	100,4 ± 0,6	0,6	100,4	104,6 ± 2,5	2,4	104,6
					500	497,3 ± 3,5	0,7	99,5	503,7 ± 4,8	0,9	100,7
Ziprasidon	1,0	2,2-883,5	0,7	Linear 1/X	8,8	8,8 ± 0,1	0,8	99,9	9,3 ± 0,6	6,2	105,2
					88,4	88,3 ± 0,6	0,7	99,9	90,5 ± 2,3	2,5	102,4
					441,7	444,9 ± 3,4	0,8	100,7	444,0 ± 2,5	0,6	100,5
Zotepin	0,997	2,5-1000	0,8	Quad 1/X	10	10,0 ± 0,1	1,2	100,4	11,4 ± 0,9	7,7	114,1
					100	102,0 ± 1,0	1,1	102,0	104,8 ± 2,8	2,7	104,8
					500	498,0 ± 4,2	0,8	99,6	505,1 ± 4,6	0,9	101,0

Pozn.: CV...variační koeficient, R...návratnost; první bod kalibrace odpovídá LLOQ pro všechny látky

Pro testování stability byly všechny sady kontrolních vzorků opakovaně analyzovány během pěti dnů (v rozmezí jednoho týdne) a nebyly pozorovány žádné koncentrační změny. Pro otestování použitelnosti navrhované metody v klinické laboratoři bylo analyzováno 52 vzorků od 49 pacientů (Tabulka 18).

Tab. 18: Terapeutické rozmezí léků [2], poločas eliminace ($t_{1/2}$), počet vzorků a rozmezí naměřených koncentrací (ng/ml). Převzato z citace [120].

Látka	Terapeutické rozmezí (ng/ml)	$t_{1/2}$ (h)	Počet vzorků	Rozsah naměřených koncentrací (mg/ml)
Agomelatin	7-300	1-2	10	<0,25
Amisulprid	100-320	12-20	6	21,0-300,8
Aripiprazol	150-500	60-80	10	71,8-260,5
Asenapin	2-5	24	-	-
Dehydroaripiprazol	-	-	10	2,5-81,2
Iloperidon	5-10	18-33	-	-
Melperon	30-100	4-6	12	2,2-92,2
Vilazodon	28-63	-	-	-
Ziprasidon	50-200	6	8	15,2-154,9
Zotepin	10-150	13-16	6	7,4-27,2

V Tabulce číslo 18 jsou uvedena terapeutická rozmezí vybraných psychofarmak, poločas eliminace, počet analyzovaných vzorků a rozsah naměřených hodnot. Protože asenapin, iloperidon a vilazodon nebyl v době vývoje metody registrován v Evropské unii, nebyly pacientům tato psychofarmaka podávána. Rozsah naměřených koncentrací se u amisulpridu a aripiprazolu pohybovala v terapeutickém rozmezí. U melperonu, ziprasidonu a zotepinu byla u některých pacientů naměřena nižší hladina než se doporučuje pro terapeutické rozmezí.

5.2 Stanovení haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu v séru

Podmínky HPLC separace a nastavení hmotnostně spektrometrické detekce bylo cíleno tak, aby bylo totožné s dříve publikovanými metodami [74] [120] pro stanovení psychofarmak v lidském séru. Snahou bylo převzít původní podmínky, aby bylo možné v jedné analýze stanovovat všechna psychofarmaka (jak starší, tak nově registrovaná léčiva), které jsou předmětem zájmu v naší klinické laboratoři. Analýza vzorků HLP, FLF a FLP

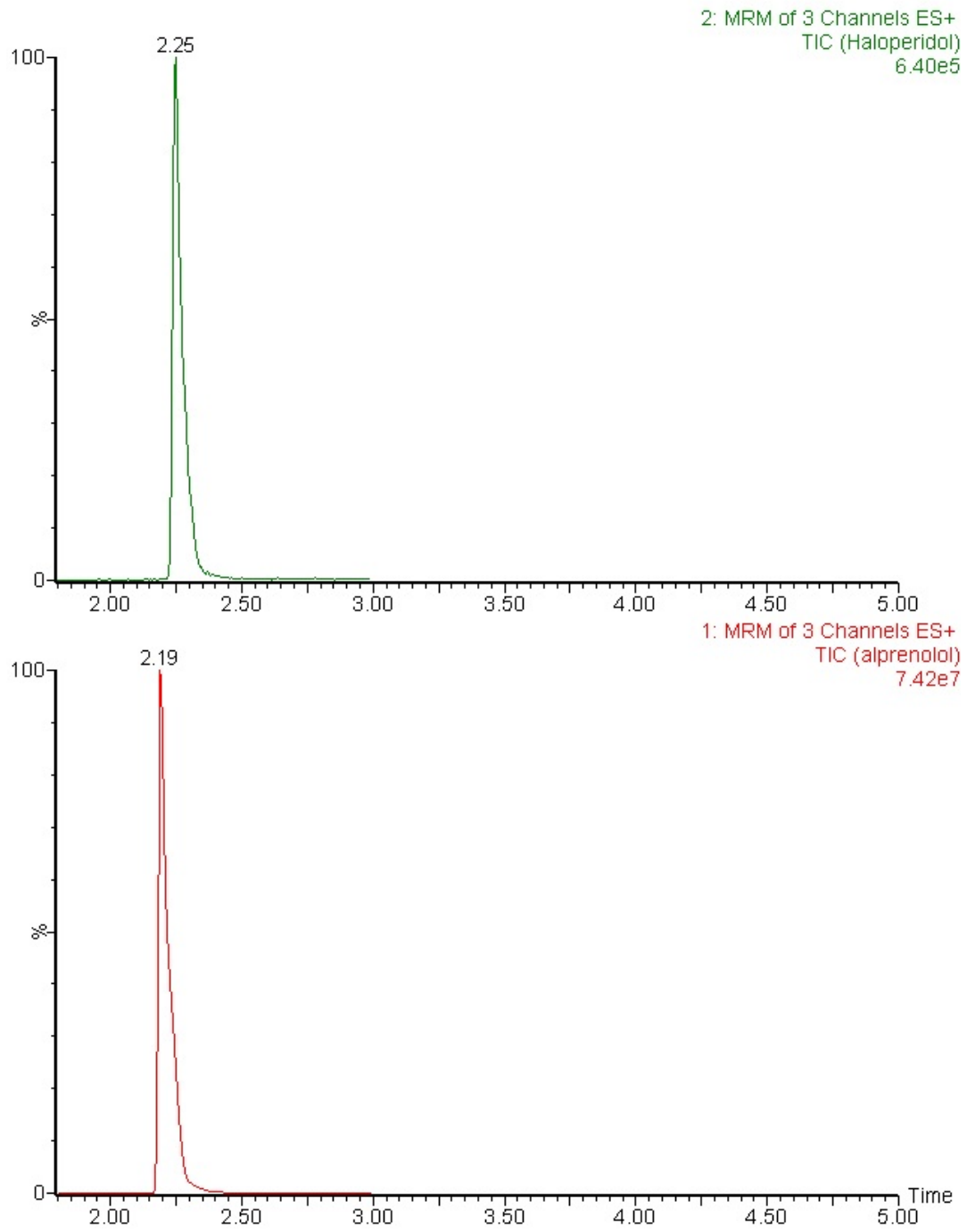
probíhala za použití ESI+ iontového zdroje. Nastavení iontového zdroje bylo totožné s již dříve publikovanými pracemi [74] [120]. SRM přechody a nastavení CV a CE pro HLP, FLF a FLP jsou uvedeny v tabulce č. 15. Parametry chromatografické kolony a složení mobilní fáze bylo pro FLF a FLP totožné jako pro stanovení vybraných psychofarmak. Haloperidol vykazoval nízkou odezvu a proto bylo změněno složení mobilní fáze obsahující kys. mravenčí ve vodě a v methanolu. Z tohoto důvodu byly validovány současně flufenazin a flupentixol. Kdežto haloperidol byl validován samostatně.

Linearita byla ověřena 9 bodovou kalibrační křivkou pro FLF a FLP a 11 bodovou kalibrační křivkou pro HLP. Hodnoty korelačního koeficientu v rozsahu 0,156 – 100 ng/ml byly 0,999 pro FLF a 0,998 pro FLP. Pro haloperidol s linearitou 0,078-100 ng/ml byl korelační koeficient 0,999.

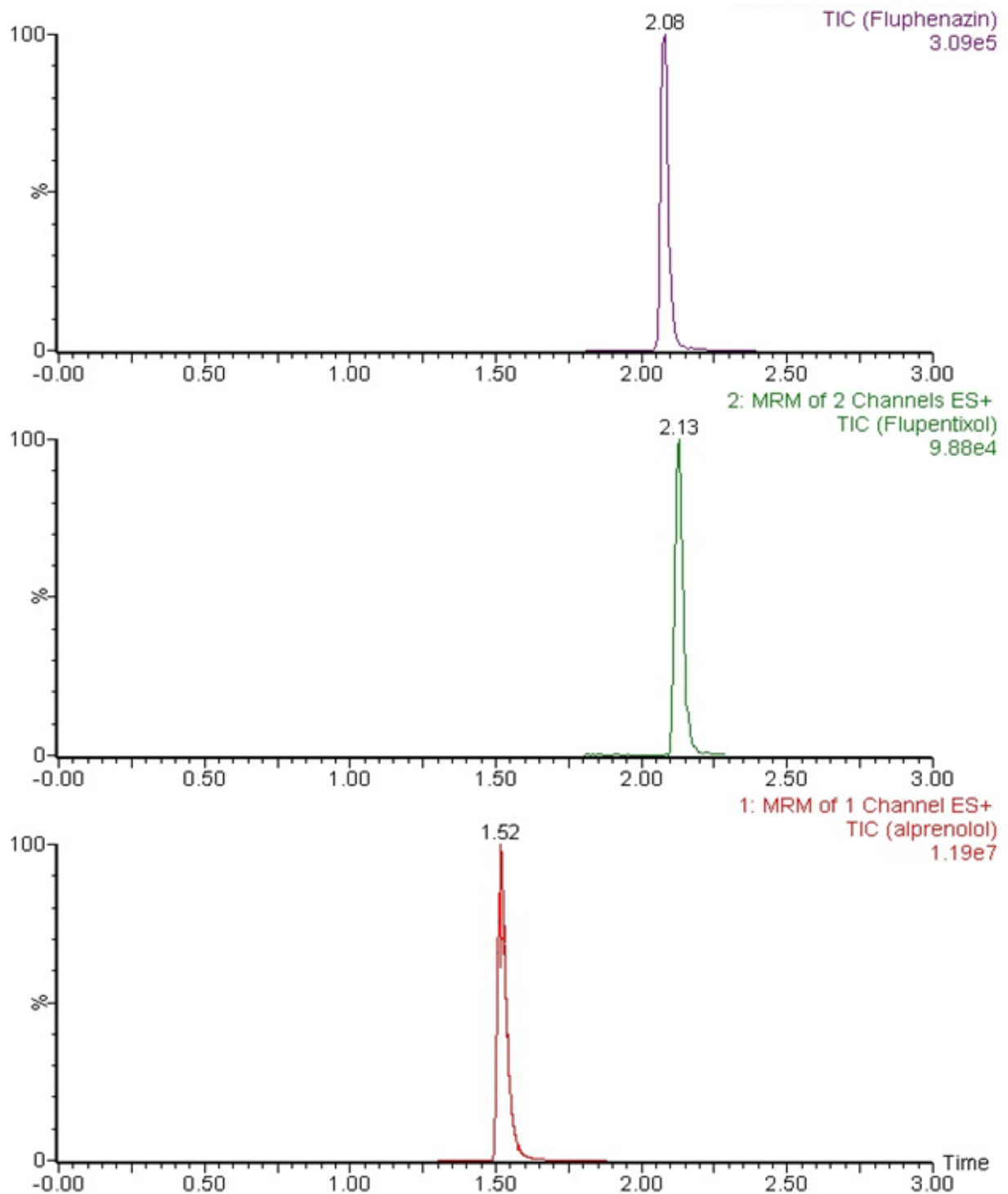
Výsledky testování matricového efektu ukázaly, že vliv koelujících látek na ionizaci IS, FLP, FLF, HLP byl v jejich retenčních časech zanedbatelný.

Chromatogramy reálného patientského séra jsou zobrazeny na obrázku č. 5 a 6. Z důvodu změny mobilní fáze je patrná změna retence vnitřního standardu v obou analýzách.

Obr. 5: Chromatogram reálného patientského vzorku séra s obsahem haloperidolu



Obr. 6: Chromatogram reálného pacientského séra s obsahom flufenazinu a flupentixolu. Jednalo sa o dva samostatné pacientské vzorky séra.



Výsledky opakovatelnosti měření pro HLP, FLP a FLP jsou uvedeny v tabulce č. 19 a výsledky mezilehlé preciznosti měření v tabulce č. 20.

Tab. 19: Výsledky opakovatelnosti měření pro haloperidol, flufenazin a flupentixol

	koncentrace standardů (ng/ml)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
haloperidol	0,16	0,15	0,01	4,2	97,3
	5,0	4,95	0,22	4,5	99,0
	25,0	25,0	0,36	1,4	100,0
flufenazin	0,3	0,3	0,0	11,3	100,0
	2,5	2,4	0,1	5,0	96,4
	10	10,1	0,3	2,6	101,1
flupentixol	0,3	0,3	0,0	10,9	100,0
	2,5	2,5	0,1	4,2	99,2
	10	10,0	0,3	3,3	100,4

Tab. 20: Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro haloperidol, flufenazin a flupentixol

	koncentrace standardů (ng/ml)	průměr	SD	CV (%)	recovery (%)
haloperidol	2,15	2,10	0,07	3,1	97,7
	4,92	4,76	0,46	2,0	96,7
	9,75	9,54	0,21	2,2	97,8
flufenazin	2,5	2,3	0,3	12,2	92,8
	5,0	4,8	0,7	10,4	93,7
	10	9,5	0,9	9,8	94,5
flupentixol	2,5	2,3	0,2	7,6	93,6
	5,0	4,6	0,6	9,4	92,8
	10,0	8,7	1,0	11,8	87,2

Preciznost za podmínek opakovatelnosti byla pro FLF a FLP v rozmezí 2,6% až 11,3%. Preciznost za podmínek mezilehlé preciznosti byla pro obě psychofarmaka v rozmezí 7,6% až 12,2%. Celková výtěžnost pro oba analyty byla mezi 87,2% a 101,1%. Preciznost za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti se pro HLP pohybovala v rozmezí od 1,4% do 4,5%. Celková výtěžnost (recovery) byla pro HLP v rozmezí 97,3% až 100%.

Přesnost metody byla pro HLP, FLF a FLP v rozmezí přijatelného intervalu $\pm 15\%$ (recovery v rozmezí 85-115%) pro všechny testované koncentrace za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti.

Tabulka 21 sumarizuje počet patientských vzorků za období 2015-2017. V dnešní době lze pozorovat trend nárůstu analýz na odd. klinické farmakologie FN Ostrava.

Tab. 21: Počet patientských vzorků séra pro stanovení HLP, FLF a FLP na oddělení klinické farmakologie za období 2015-2017

látka	Terapeutické rozmezí (ng/ml)	Počet patientských vzorků (za období 2015-2017)
Flufenazin	1 - 10	27
Flupentixol	1 - 10	71
Haloperidol	1 - 10	75

Závěr k současné analýze deseti psychofarmak a analýze flufenazinu, flupentixolu a haloperidolu

Byla vyvinuta a validována nová UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení psychofarmak (dvou antidepresiv, sedmi antipsychotik a jednoho hlavního metabolitu) [120]. Podle našich znalostí se jedná se o první validovanou metodu pro stanovení vilazodonu a melperonu v lidském séru. Vývoj této nové metody byl zahájen laděním parametrů hmotnostního spektrometru a srovnání ESI a APCI pro každou látku v kladném módu. Pokud jde o psychofarmaka, APCI se používá méně často než ESI. ESI nabízí účinnější ionizaci studovaných látek, což bylo také potvrzeno v naší předchozí publikaci [74].

ESI+ byla zvolena rovněž pro stanovení haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu. Analýza těchto látek byla, podle požadavků z psychiatrického oddělení FN Ostrava,

validována a analyty byly nově přidány do seznamu psychofarmak, které na oddělení lze stanovovat.

Úprava vzorku séra metodou srážením proteinů pomocí směsi acetonitril-methanol (40:60, v/v) za přítomnosti síranu zinečnatého byla dostačující. Tento postup je časově méně náročný a levnější než extrakce kapalina-kapalina nebo extrakce na pevné fázi. V analýze léčiv je tato metoda široce používána. Složky matrice mohou být problémem při analýze biologických vzorků. Jejich koeluce s analyty může výrazně ovlivnit odezvu. Mezi složky, které mohou interferovat nebo významně ovlivnit analýzu, patří lipidy a fosfolipidy, aditiva nebo polymery obsažené v plastových odběrových systémech [104] [38] [47]. Heparin nebo K₃EDTA, které se používají jako antikoagulanty při odběru vzorků krve, mohou také způsobit matricový efekt, a proto je vhodnější upřednostnit odběrové zkumavky bez jakýchkoli přísad [103].

V každém případě by mělo být vyhodnocení matricového efektu součástí vývoje bioanalytické metody. Experiment za použití infuze roztoků standardů za kolonou prokázal zanedbatelný vliv matrice v oblasti chromatogramu, kde jsou analyty eluovány (0,50 až 1,70 min). Výpočet matricového efektu pro amisulprid (nejméně zadržovaná látka) vykazoval hodnotu (< 14,0 %). Vyvinutá metoda splňuje kritéria pro akceptovatelnou míru matricového efektu (hodnoty pod 20% jsou obecně považovány za akceptovatelné z hlediska ovlivňování odezvy) [123].

Pro kvantifikaci je preferováno použití izotopově značených vnitřních standardů. Často však bývají použity i jiná psychofarmaka [52]. Jejich výběr by však měl být uvážlivý. Psychofarmaka jsou totiž často podávána v kombinaci s jinými psychofarmaky a volba vnitřního standardu by se neměla vyskytnout u podávaných léků pacientovi. Alprenolol používaný jako vnitřní standard v této práci patří do jiné skupiny léčiv a také není schválen Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA), takže by neměl být přítomen v patientských vzorcích.

Přesnost a preciznost za podmínek opakovatelnosti byly pro validaci metody pro stanovení 10 psychofarmak ze séra v rozmezí 87,9-102,0% a 0,4-5,5% (tabulka 17). Za podmínek mezilehlé preciznosti byla zjištěna přesnost v rozmezí 96,0-114,1%, zatímco preciznost byla mezi 0,6 a 8,2% (Tabulka 17). Preciznost a přesnost splňují doporučení US Food and Drug Administration (US Food and Drug Administration, 2001) [81]. Hodnoty LLOQ byly skutečně stanoveny a koncentračně jsou pod terapeutickým referenčním

rozmezím u všech psychofarmak. Za výše uvedených experimentálních podmínek nebyla pozorována přítomnost jiných rušivých chromatografických píků v chromatogramu.

Analýza vzorků kontrol kvality na dvou koncentračních úrovních potvrdila validitu vyvinuté metody. Karbamazepin, lamotrigin, kyselina valproová a klonazepam byly testovány jako potenciální interferenty, neboť je pacienti mohou užívat společně s psychofarmaky. Uvedená antiepileptika však neovlivnila stanovené koncentrace psychofarmak, antiepileptika byla eluována v jiných retenčních časech než psychofarmaka. Stabilita vzorků je důležitým parametrem pro přepravu vzorků séra z jiných laboratoří či nemocnic. Na základě našich zkušeností a experimentů jiných autorů [79] [80] [30] [52] [54, 61], byla stabilita vzorků po dobu delší než 24 hodin dostatečná, což je vhodná doba pro dodání a analýzu vzorků v klinické laboratoři. Na základě našich výsledků se koncentrace všech testovaných psychofarmak neměnila během 1 týdne při uskladnění v lednici při teplotě 6 °C .

Po validaci byla metoda použita pro analýzu psychofarmak ve vzorcích séra dle požadavků psychiatrického oddělení Fakultní nemocnice Ostrava. Pacienti užívali dva anebo více léků. Klinický význam této metody byl ověřen analýzou 52 reálných patientských vzorků. Ve vzorcích byly kvantifikovány všechny podávané léky kromě agomelatinu. Terapeutické rozmezí agomelatinu je 7-300 ng/ml 1-2 hodiny po požití dávky 50 mg. Hiemke a kol. [2] popsali rychlý metabolismus agomelatinu na inaktivní metabolity během dvou hodin. Agometalin byl podáván večer (25 mg) a odběr vzorků byl prováděn následující den ráno (po více než 8 hodinách). Lze tedy předpokládat jeho metabolickou přeměnu před odběrem.

Z psychiatrického oddělení FN Ostrava přicházejí stále nové požadavky na terapeutické monitorování nejrůznějších antipsychotik a antidepressiv. Stejně tak se setkáváme s analýzou psychofarmak pro účely toxikologického oddělení FN Ostrava. Z hlediska portfolia stanovovaných látek se jejich počet neustále rozšiřuje a bude rozšiřovat. Požadavky na analýzu přicházejí také ze spádových oblastí a tvoří nemalou část vzorků oddělení klinické farmakologie FN Ostrava.

Protože pacienti užívají kombinace psychofarmak, snahou je zachovat experimentální podmínky, které byly námi publikovány ve dvou článcích [74] [120]. Cílem není vyvíjet stále nové metody stanovení pro jednotlivá psychofarmaka, ale sjednotit experimentální podmínky analýzy tak, aby bylo možné nejlépe všechny látky stanovovat v jedné analýze. To je také v souladu s potřebou menšího objemu biologické matrice, což naplňuje požadavky na šetrnější odběr a menší zátěž pacienta. Kritériem praktického využití analytické metody je i

cena za stanovení a jeho časová náročnost. Snahou tedy bylo zachovat úpravu vzorků a nastavení LC-MS/MS tak, aby bylo možné vedle sebe stanovovat „starší“ i nověji registrovaná psychofarmaka. Tento klinický požadavek se liší od „čistě“ analytického přístupu, který je založen na hledání co možná nejlepších experimentálních podmínek takových, aby nově vyvinutá metoda byla co možná nejrychlejší, nejcitlivější, s nejmenšími hodnotami LOD a LOQ a splňovala podmínky validace bioanalytických metod. Fenomémem dnešní doby je nadužívání nejrůznějších léků, kdy se lidé domnívají, že existuje lék na „každou nemoc“. Z toho rovněž plynou požadavky kladené na analytické metody pro jejich stanovení. Ve velké většině je třeba léčiva stanovovat na koncentračních úrovních v jednotkách, desítkách až stovkách ng/ml. Tyto koncentrace lze detekovat pomocí nejčastěji používaného UV/VIS detektoru. Nevyhovující může ale být selektivita detekce. Může hrozit riziko interferencí a falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků. Pacienti často užívají 5 a více léků. Výjimkou nejsou ani pacienti, kteří denně užívají více jak 10 léků. Ve snaze vyhnout se interferencím a možným chybám lze pracovat s informacemi od lékařů a zjišťovat jaké kombinace léčiv je možné očekávat. I tento přístup může selhat, není možné při vývoji metody simulovat všechny možné kombinace. Zde se otvírá prostor pro užití selektivnější detekce než je UV/VIS spektrometrie, a to hmotnostní spektrometrie. I v tomto případě je nutné si uvědomit, že riziko interferencí nelze zcela vyloučit, ale je sníženo. Nezbytností je dodržet doporučené postupy pro vývoj bioanalytických metod, řádně provádět jejich validaci a ověřování výsledků kontrolními vzorky.

I s přispěním vyvinutých metod je nyní možné stanovit 38 psychofarmak v jedné analýze za použití stejných experimentálních podmínek.

5.3 Identifikace metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů

Chromatografické chování agomelatinu a jeho metabolitů na různých stacionárních fázích

Při vývoji metody pro necílenou metabolomiku by měla být délka analytického cyklu nastavena s ohledem na (1) parametry kolony, (2) potenciální kontaminace iontového zdroje a (3) stabilitu připravených vzorků v automatickém dávkovači. Optimalizace chromatografických parametrů je klíčová pro separaci a detekci izomerních metabolitů agomelatinu pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro tento účel byly otestovány různé typy HPLC a UHPLC chromatografických kolon (Tabulka 16).

Složení mobilní fáze zůstávalo pro HPLC a UHPLC kolony neměnné. Výběr mobilní fáze byl založen na naší předchozí publikované práci pro stanovení agomelatinu a dalších psychofarmak ve vzorcích sér u pacientů z psychiatrického oddělení Fakultní nemocnice Ostrava [74, 120].

Zachování vynikající opakovatelnosti retenčních časů je zásadní pro cílený i necílený analytický přístup [124]. Retenční časy agomelatinu a jeho metabolitů se směrodatnými odchylkami na různých kolonách jsou shrnuty v tabulce 22.

Kolony HPLC a UHPLC vykazovaly vynikající opakovatelnost s výjimkou kolony Zorbax Phenyl, která vykazovala vyšší směrodatné odchylky. Termodynamika a kinetika chromatografické separace agomelatinu a jeho metabolitů na HPLC koloně Zorbax Eclipse XDB Phenyl a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ byla při použitím složení mobilní fáze a nastaveném gradientu mobilní fáze velmi podobná, což je patrné z tvaru píků a retenčních časů. Velmi podobně probíhala eluce také na UHPLC kolonách a typ stacionární fáze za výše uvedených experimentálních podmínek neměl výrazný vliv na změny retence agomelatinu a jeho metabolitů.

Tab. 22: Retenční časy agomelatinu a jeho metabolitů na různých kolonách. Analýza vzorků lidských hepatocytů pomocí hmotnostních spektrometrů Q-ToF Premier^b a Synapt G2-S^c. (SD byla určena z 10 izolací).

výchozí látka / metabolity	Retenční čas (min) ± SD.				
	Zorbax Eclipse XDB- Phenyl ^b	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ ^c	BEH C ₁₈ ^c	BEH C ₈ ^c	BEH-Phe ^c
agomelatin	5,91 ± 0,10	5,98 ± 0,01	2,82 ± 0,07	2,74 ± 0,02	2,72 ± 0,004
OH-Met. 1	1,39 ± 0,11	1,25 ± 0,01	1,02 ± 0,02	1,05 ± 0,01	1,07 ± 0,004
OH-Met. 2	1,69 ± 0,13	1,61 ± 0,02	1,31 ± 0,004	1,35 ± 0,01	1,39 ± 0,005
OH-Met. 3	4,22 ± 0,07	4,13 ± 0,01	2,17 ± 0,02	2,16 ± 0,01	2,16 ± 0,01
(-CH ₃) Met. 4	2,11 ± 0,25	1,92 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,63 ± 0,03	1,64 ± 0,01

Chromatografie na obrácených fázích poskytuje slabší retenci polárních analytů. Retence agomelatinu a jeho (polárnějších) metabolitů byla dostatečná na všech testovaných kolonách. HPLC separace metabolitů agomelatinu za použití konvenčních kolon s velikostí částic 5 μm poskytla dobrou separaci, ale za cenu dlouhých retenčních časů. UHPLC kolony, ve srovnání s HPLC kolonami, vykazují lepší kinetiku chromatografického děje a s tím související kratší dobu analýzy, která může být kritická pro detekci nestabilních metabolitů. S využitím on-line software (Thermoscientific) [125] byl 15 min HPLC gradient přepočítán na 5 min UHPLC gradient při zachování stejné chromatografické separace.

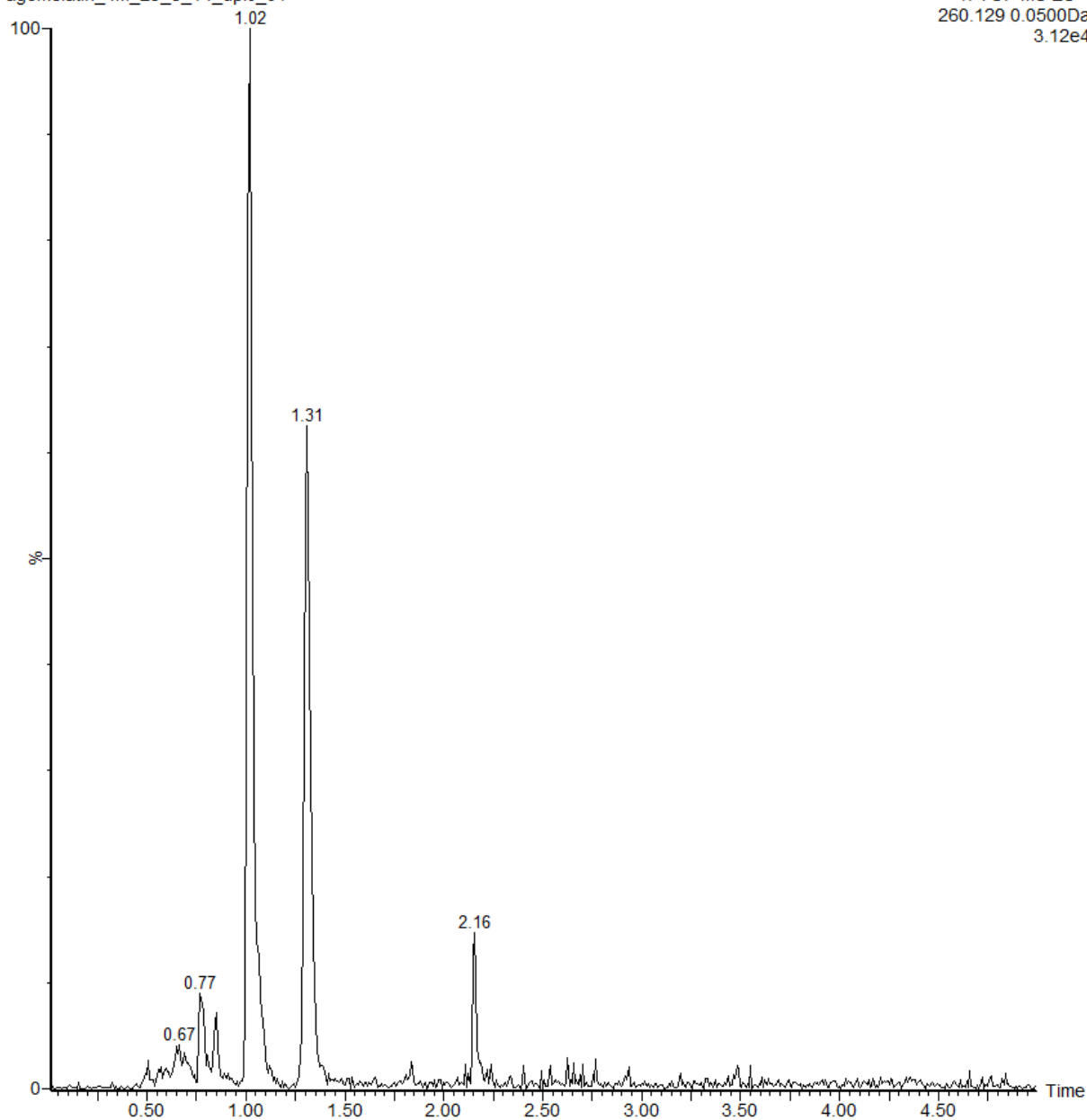
Je nutné zmínit, že analýza médií a celulárního obsahu hepatocytů inkubovaných s agomelatinem probíhala na kolonách připojených k různým hmotnostním spektrometrům (viz tabulka 22). Podstatné však je, že analýzy probíhaly na stejném typu kapalinovaného chromatografu a rozdíl se týkal pouze detekce. Volba typu kolony a stacionární fáze pro analýzu biologických vzorků krve a moči byla provedena na základě porovnání separace metabolitů agomelatinu na jednotlivých kolonách uvedených v tabulce 23. Na obrázku 7 je chromatogram hydroxy metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů separovaných na koloně BEH C₁₈. Kolona Waters BEH C₁₈ (150 x 2.1, 1.7 μm) vykazovala adekvátní retenci a nejlepší separaci z testovaných kolon všech identifikovaných metabolitů agomelatinu a proto byla vybrána pro následnou identifikaci metabolitů agomelatinu z biologické matrice.

Obr. 7. Chromatogram hydroxy metabolitů agomelatinu ve vzorku média inkubovaných s agomelatinem a separovaných na koloně BEH C18.

agomelatin_4M_29_5_14_BEH_C18

agomelatin_4M_29_5_14_uplc_01

1: TOF MS ES+
260.129 0.0500Da
3.12e4



Identifikace metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů

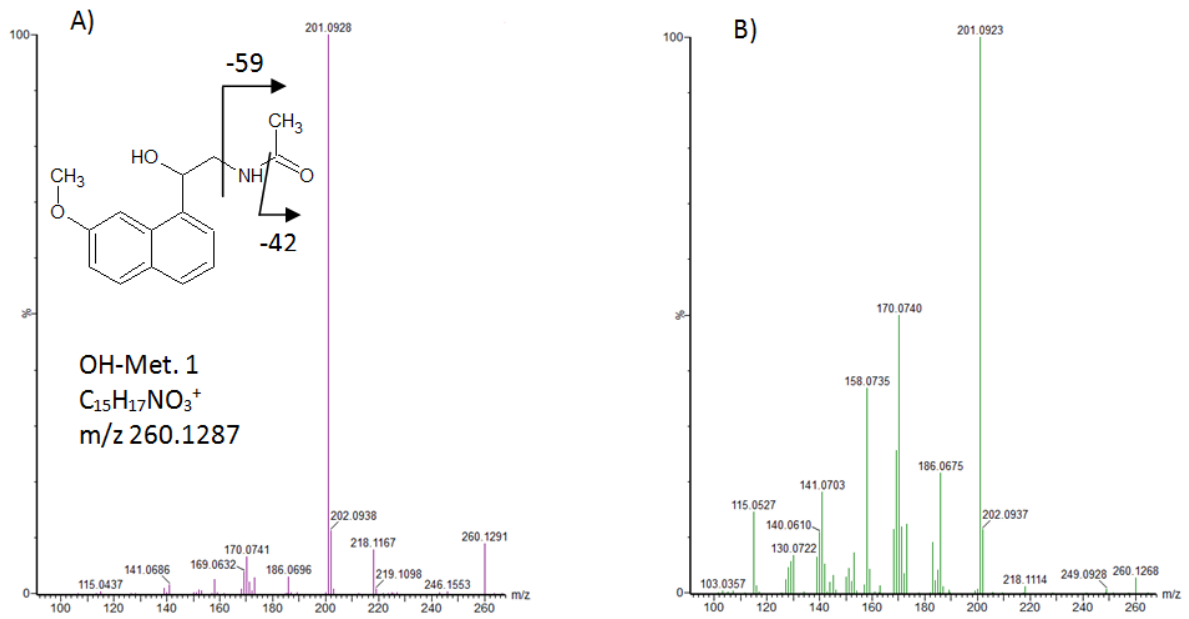
Agomelatin a jeho metabolity patří mezi sekundární aminy a je proto snadné je ionizovat v ESI+ módu a detekovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Výběr iontové techniky bude mít významný vliv na získaný metabolomický profil. Při analýze agomelatinu

a/nebo jeho metabolitů byla nejčastěji autory používána elektrosprejová ionizace v kladném módu [120] [24] z důvodu lepšího poměru signál/šum ve srovnání s APCI. Naměřená data jsou standardně zpracovávána automatickým vyhodnocovacím softwarem vybaveným rozpoznávacími algoritmy na přítomnost metabolitů a seznamem potenciálních produktů biotransformačních reakcí. Identifikace analytů ve vzorcích je založena na informaci o přesné hmotnosti odpovídajících iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro správnost ($\Delta \text{ ppm} \leq 3$). V kombinaci s elementárním složením iontů, je rovněž generována řada extrahovaných iontových chromatogramů (XICs), které jsou porovnávány mezi kontrolou a vzorkem.

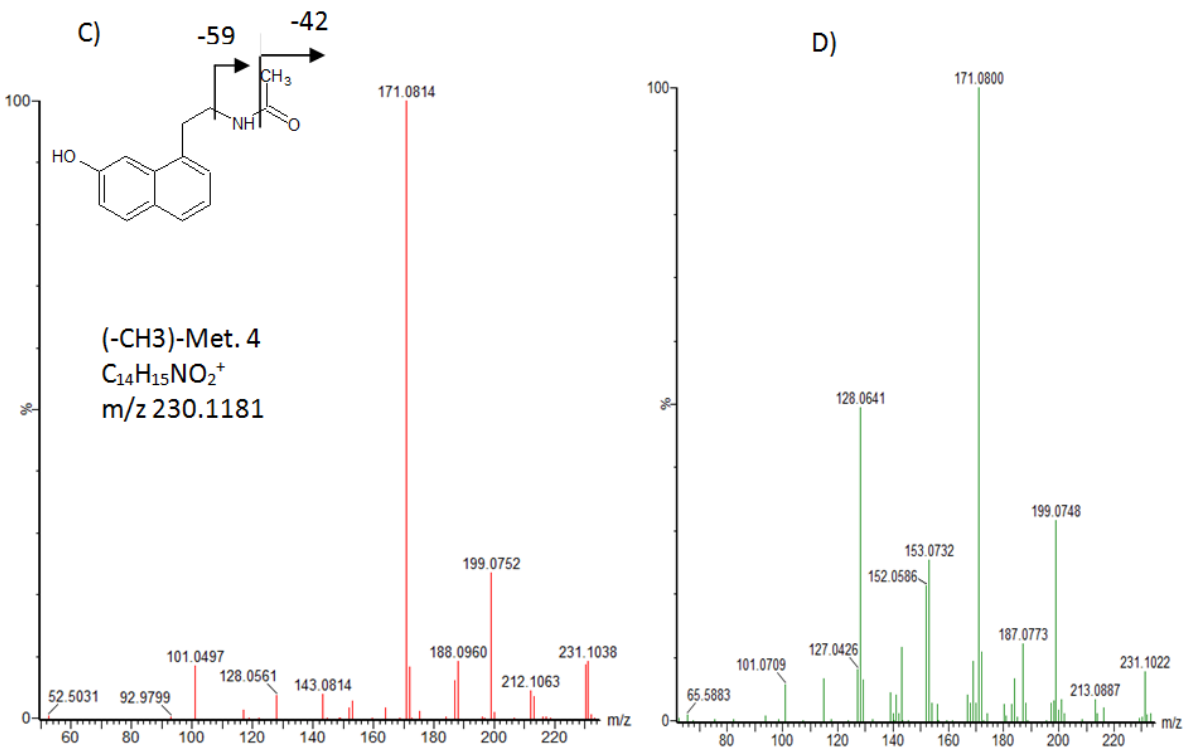
Po inkubaci agomelatinu s lidskými hepatocyty byly pomocí MS^E analýzy detekovány tři metabolity vznikající procesem hydroxylace (Met.1-Met.3) a jeden procesem demethylace 7-desmethyl (Met.4). Metabolity byly označeny podle jejich retenčního pořadí. Tabulka 23 ukazuje předpokládané struktury metabolitů, jejich přesné molekulové hmotnosti, sumární vzorec, vypočtené hodnoty m/z, kritérium správnosti (v ppm) a ionty vznikající při kolizi indukované disociaci těchto metabolitů. Podrobná fragmentace agomelatinu a jeho metabolitů byla již publikována [24]. Po optimalizaci kolizní energie pro získání reprodukovatelných spekter metabolitů agomelatinu byla kolizní spektra čtyř metabolitů pořízena při kolizní energii 30 eV (nastavení Synaptu G2) a porovnána s agomelatinem a jinými metabolity.

Dřívější práce potvrdily existenci čtyř hydroxy metabolitů agomelatinu. V naší práci byly detekovány pouze tři. Polohy hydroxylových skupin je možné obecně dohledat pomocí specifických fragmentových iontů v MS/MS spektrech. Pokud je hydroxy skupina navázána na aromatický kruh, je v řadě případů určení její pozice problematické z důvodu nepřítomnosti charakteristických fragmentů v hmotnostním spektru. Z tandemových hmotnostních spekter nebylo možné jednoznačně určit, ve které poloze aromatického kruhu je hydroxy skupina vázána (Met. 2 a Met. 3). Naopak z MS/MS spekter u hydroxy metabolitu 1 byla pozice této skupiny identifikována.

Obr. 8. A) UPLC-TOF-MS a B) UPLC-TOF-MS^E hydroxy metabolitu OH-Met. 1



Obr. 8. C) UPLC-TOF-MS a D) UPLC-TOF-MS^E desmethyl metabolitu (-CH₃)-Met. 4

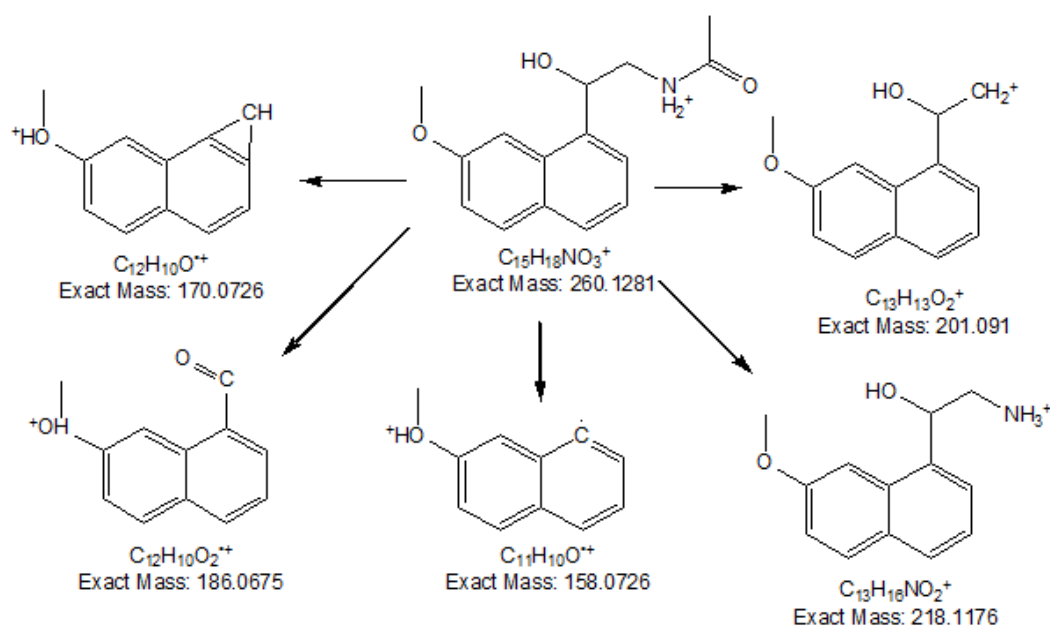


Veškeré metabolické procesy byly nalezeny programem MetaboLynx (metabolomický program od společnosti Waters), který pracuje na principu porovnávání přesných hmot a rozdílu mezi kontrolou a vzorkem. Potvrzení správnosti nalezených metabolitů vycházelo z hodnot přesných hmot a z vlastního rozdílu mezi protonovanými molekulami metabolitu a agomelatinu a určeného sumárního vzorce.

V hmotnostním spektru s nízkou kolizní energií byl pozorován protonizovaný ion a případné fragmenty vznikající při procesech v iontovém zdroji, v hmotnostních spektrech s vyšší kolizní energií potom fragmenty vzniklé kolizí indukovanou disociací. Mezi hlavní pozorované procesy v případě obou typů metabolitů byla neutrální ztráta C_2H_2O (ztráta 42) a C_2H_5NO (ztráta 59) (obrázek 8), kdy k fragmentaci dochází na chemické vazbě N-C. Pro OH-Met.1 metabolit následuje další fragmentace v podobě radikálového štěpení methylové skupiny, kdy byla pozorována fragmentace z $C_{13}H_{13}O_2^+$ (přesná hmota m/z 201,091) na $C_{12}H_{10}O_2^{*+}$ (přesná hmota m/z 186, 0675). Velmi důležitým iontem v kolizním spektru OH-Met.1 metabolitu je ion m/z 158,0735, ($C_{11}H_{10}O^{*+}$, Δ ppm 1.9), protonizovaný radikál methoxynaftalenu, potvrzující biotransformaci (hydroxylaci) mimo aromatickou část molekuly agomelatinu.

OH-Met. 1 byl eluován na různých kolonách v rozmezí retenčních časů od 1,02 do 1,39 min. a jeho protonovaná molekula poskytovala signál při m/z 260,1287 ($C_{15}H_{17}NO_3^+$). UHPLC-MS a UHPLC-MS^E záznamy hydroxy-metabolitu OH-Met. 1 jsou znázorněny na obr. 8A a 8B. Fragmentace tohoto metabolitu je uvedena ve schématu na obrázku 9.

Obr. 9: Fragmentační cesty OH-Met. 1 AGO (Rt = 2,26 min)



Met. 4 byl detekován na různých chromatografických kolonách v rozmezí retenčních časů od 1,55 do 2,11 min. Jeho protonovaná molekula ($C_{14}H_{15}NO_2^+$) při m/z 230,1181 vykazovala nepřítomnost methylové skupiny ve struktuře. V MS^E spektru můžeme vidět fragment při m/z 171,0810 vzniklý ztrátou C_2H_5NO . Ionty m/z 188,1075; 212,1075 vzniklé ztrátou C_2H_2O a vody vznikají termální fragmentací ve zdroji (obr. 8C a 8D). Ve spektru můžeme pozorovat také ion při m/z 153,0704, jehož elementární složení odpovídá $C_{12}H_9^+$.

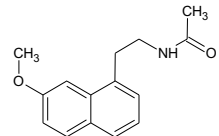
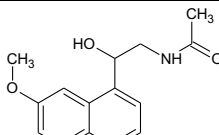
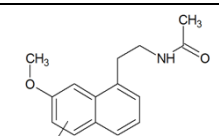
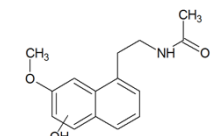
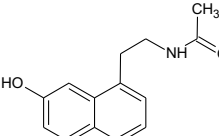
U hydroxy metabolitů 2 a 3 nelze v hmotnostním spektru rozlišit pozici chemické vazby hydroxy skupiny na plně konjugovaný skelet. Retenční čas hydroxy metabolitu 2 na různých kolonách se pohyboval v rozmezí od 1,31 do 1,69 minuty. Pro hydroxy metabolit 3 byly retenční časy v rozmezí od 2,16 do 4,22 minuty.

Tabulka 23 shrnuje hmotnostně-spektrometrické výsledky metabolitů agomelatinu identifikovaných ve vzorcích lidských hepatocytů. Tabulka podává informace o sumárním vzorci, předpokládané struktuře, molekulové hmotnosti, vypočtené hodnotě m/z , chybě v ppm a fragmentech vznikajících při MS^E experimentech pro jednotlivé metabolity. Vypočtená hodnota m/z uvedená v tabulce byla kalkulována programem: kalkulátor molekulové hmotnosti, který je součástí programu: MassLynx (verze 4.1, Waters). Experimentální naměřené hodnoty nejsou uvedeny v tabulce, ale tato hodnota se svou chybou nelišila o více jak 2 ppm. Chybu v ppm oproti vypočtené hodnotě pro agomelatin a jeho metabolity můžete

vidět v tabulce. Tabulka také shrnuje fragmentaci agomelatinu a jeho metabolitů při MS^E experimentech.

Metabolity agomelatinu byly dříve publikovány [25] [24] a uvedená data jen potvrzují správnost nalezených metabolitů. Játra, která byla použita pro identifikaci metabolitů agomelatinu pocházela z 10 izolací. V současné medicíně je snahou játra v rámci dárcovství orgánů použít pro pacienty. Přestože viabilita hepatocytů byla ověřena, metabolická transformace na nich probíhala podprůměrně. Podařilo se nám identifikovat 3 hydroxy metabolity agomelatinu a 1 desmethyl metabolit, ale dřívější práce publikovala 4 hydroxy metabolity agomelatinu nalezených ve vzorcích lidských jaterních mikrozomech [24].

Tab. 23: Základní hmotnostně-spektrometrické charakteristiky metabolitů identifikovaných po kultivaci agomelatinu s lidskými hepatocyty

látka	Sumární vzorec	Předpokládaná struktura	MW	vypočtená hodnota m/z	ppm	MS ^E m/z (Da)
agomelatin	C ₁₅ H ₁₇ NO ₂		243,30 10	244,133 8	1.1	185,0989; 170,0739; 153,0762; 202,1149
OH-Met. 1	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,12 08	260,128 7	0.2	201,0916; 186,0681; 170,0732
OH-Met. 2	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,30 04	260,128 7	0.6	201,0891; 218,1270; 170,0720
OH-Met. 3	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,30 04	260,128 7	0.9	201,0924; 218,1277; 170,0719
(-CH₃) Met. 4	C ₁₄ H ₁₅ NO ₂		229,27 44	230,118 1	1.7	212,0992; 188,0981; 171,0788; 153,0678

5.4 Identifikace metabolitů agomelatinu z patientských vzorků krve a moči

Pro testování extrakčních výtěžků byl v rámci vývoje metody agomelatin přidán do moče (50 ng/ml) a následně byly otestovány celkem čtyři postupy úpravy vzorků moči. Pro vzorky moče byl testován jeden PPT postup úpravy a tři SPE extrakce na různých SPE kolonkách. SPE extrakce pomocí Strata C18-U a Strata X-Drug B byly z důvodu nízkého extrakčního výtěžku vyřazeny z experimentu s reálnými vzorky moči. Pro identifikaci metabolitů agomelatinu v moči byl nakonec použit postup 3 (SPE pomocí B-Gone kolonek) a postup 4 (PPT moči). Pacientské vzorky séra byly pro analýzu zpracovány PPT postupem 5.

Jako jeden z možných postupů úpravy moči pro identifikaci metabolitů se využívá enzymatická hydrolyza (pomocí β -glukuronidázy) a je doporučovaná výrobcem (Phenomenex) a také často využíván na toxikologickém oddělení FN Ostrava pro uvolnění látek z vazby na kyselině glukuronové. To byl také důvod, proč jsme tento experiment zařadili mezi postupy úpravy vzorků moče.

Metoda úpravy vzorku séra nebyla testována během vývoje metody a postup byl převzat na základě našich zkušeností s analýzou agomelatinu ve vzorcích séra na oddělení klinické farmakologie ve FN Ostrava. Jako metoda úpravy vzorku byl vybrán pro analýzu moči postup číslo 2, 3 a 4 (viz experimentální část), protože při postupu č.1 agomelatin nevykazoval prakticky žádnou retenci na SPE kolonkách Strata C18-U za uvedených podmínek.

Složení mobilní fáze bylo zvoleno na základě naší zkušenosti s analýzou agomelatinu a dalších psychofarmak na oddělení klinické farmakologie v Ostravě. Stejně složení mobilní fáze bylo použito pro identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů. Gradient mobilní fáze, v analýze patientských vzorků séra a moči, byl oproti gradientu v analýze hepatocytů částečně pozměněn z důvodu navýšení počtu hydroxy metabolitů agomelatinu a jejich lepší separace na koloně. S novým gradientem se analýza prodloužila z původních pěti na osm minut.

Tabulka 24 ukazuje hlavní metabolické cesty agomelatinu ve vzorcích krve a moči zjištěné za použití různých metod přípravy vzorků. Tyto metabolity byly potvrzeny po jejich detekci MetaboLynxem a následném ověření hmotnostně-spektrometrických dat.

Dřívější práce identifikovaly čtyři hydroxy metabolity agomelatinu v lidských mikrozomech a jeden metabolit agomelatinu v myší moči a fekáliích. V naší studii jsme

identifikovali celkem sedm hydroxymetabolitů agomelatinu. Potvrzení konkrétní pozice hydroxylace by vyžadovalo další experimenty (např. syntéza standardů a porovnání hmotnostních spekter). Retenční časy těchto hydroxy metabolitů agomelatinu (v min) jsou: 1,94; 2,26; 2,67; 2,84; 3,14; 3,58; 3,64 (obr. 10). Obrázek 11 zahrnuje MS^E spektrum hydroxy metabolitu agomelatinu (Rt= 2.26).

Enzymatickou hydrolýzou moči pomocí β -glukuronidázy (postupem 3) došlo k uvolnění hydroxy metabolitů agomelatinu z vazby na kyselinu glukuronovou. To se projevilo navýšením ploch píků hydroxy metabolitů ve srovnání s postupem úpravy moči, který využíval její srážení (postup 4). To také odpovídá tab. 24, kde je patrná nepřítomnost hydroxy glukuronidů agomelatinu, která využívala postupu 3 úpravy moči.

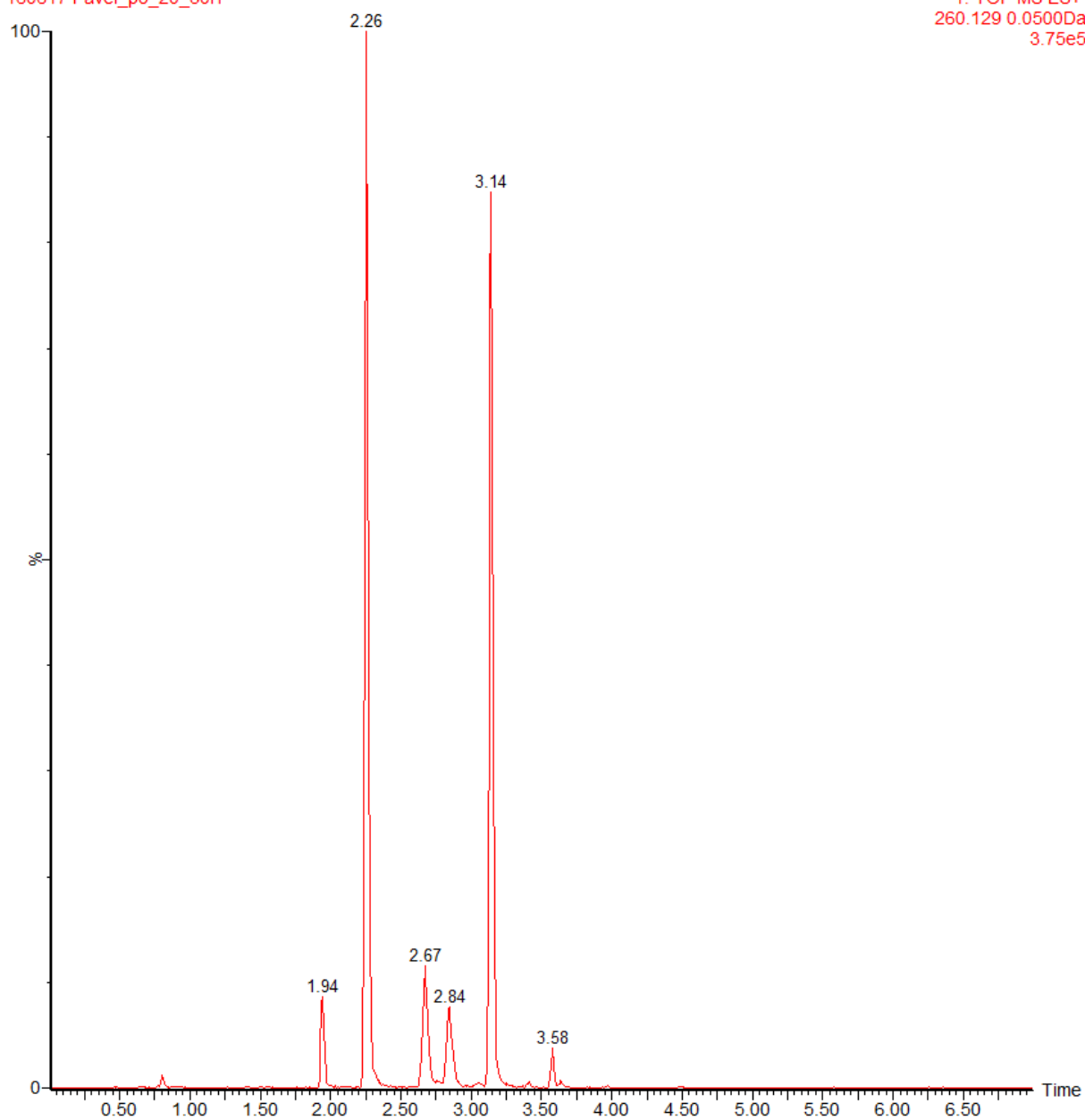
Tab. 24: Srovnání metabolických profilů agomelatinu při použití různých metod přípravy vzorků (GLU = glukuronid, AGO = agomelatin)

<u>Postup úpravy vzorku</u>	<u>Metabolický profil</u>
Postup 5	Hydroxylace, Demethylace
Postup 3	Hydroxylace, Hydroxylace + desaturace, Demethylace + hydroxylace, Desaturace + demethylace, 2x hydroxylace, Demethylace, Demethylace + Alkohol dehydratace, 2x hydroxylace + methylace, , 2x hydroxylace + demethylace, 2x demethylace + redukce + glukuronidace, Demethylace + hydroxylace + demethylace, Desaturace, 3x hydroxylace, Demethylace + konjugace se sulfátem konjugat, Redukce + 3x hydroxylace + acetylace, Hydroxylace + sulfatace
Postup 4	Hydroxylace, Demethylace + hydroxylace, Demethylace, 2x hydroxylace, 2x hydroxylace + methylace, Hydroxylace + desaturace, Hydroxylace + desaturace + taurin konjugace, desaturace, demethylace + 2x hydroxylace, 3x hydroxylace, Demethylace + hydroxylace + sulfatace, Hydroxylace + sulfatace, Desaturace + taurin konjugace, Demethylace + GLU, Demethylace + hydroxylace + GLU, Hydroxylace + GLU, 2x hydroxylace + GLU, 2x hydroxylace + methylace + GLU

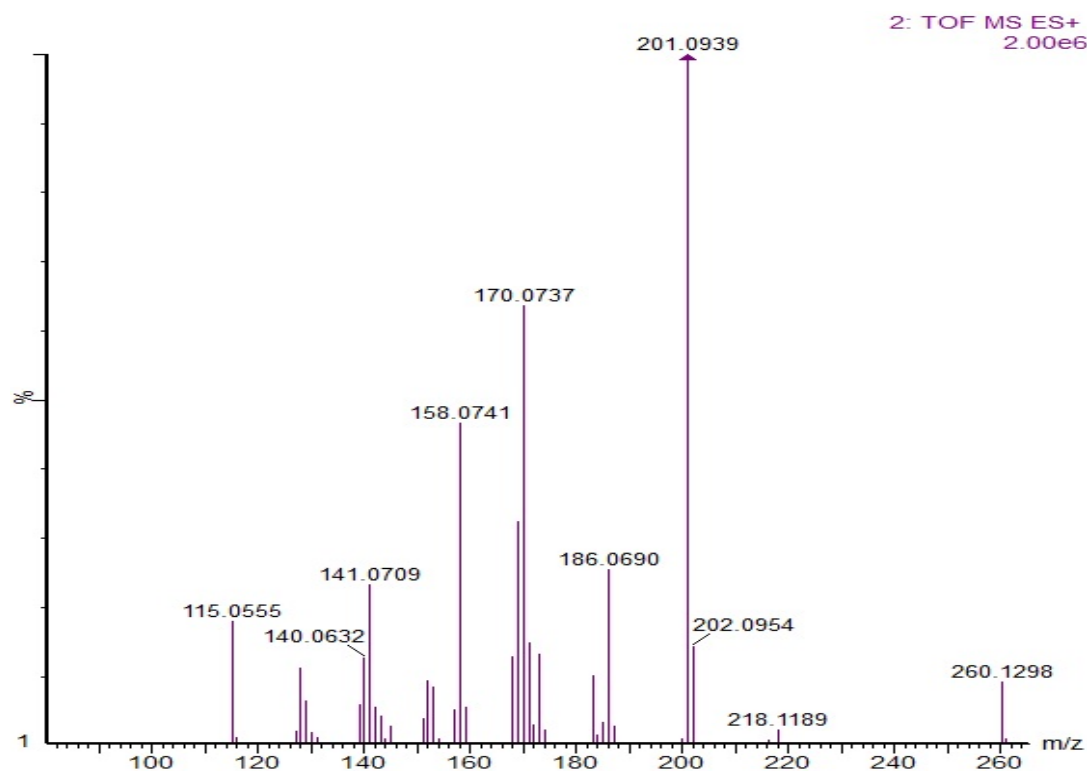
Obr. 10: UHPLC/MS separace hydroxy metabolitů agomelatinu ze vzorků lidské moči připravované postupem 3

160617 Pavel_po_20_30H

1: TOF MS ES+
260.129 0.0500Da
3.75e5



Obr. 11: MS^E spektrum hydroxy metabolitu agomelatinu (Rt= 2.26)



Pomocí statistického programu MarkerLynx byla provedena statistická analýza dat za účelem zjistit významné metabolity charakteristické pro určitou skupinu vzorků. Pro statistické zhodnocení byly použity pacientské vzorky séra a moči (2 muži a 8 žen), jak je popsáno v experimentální části. Počet pacientů byl malý na rozlišení konkrétních charakteristik pro jednotlivá pohlaví (pokud nějaká jsou). Cílem bylo případné pozorování určitého trendu.

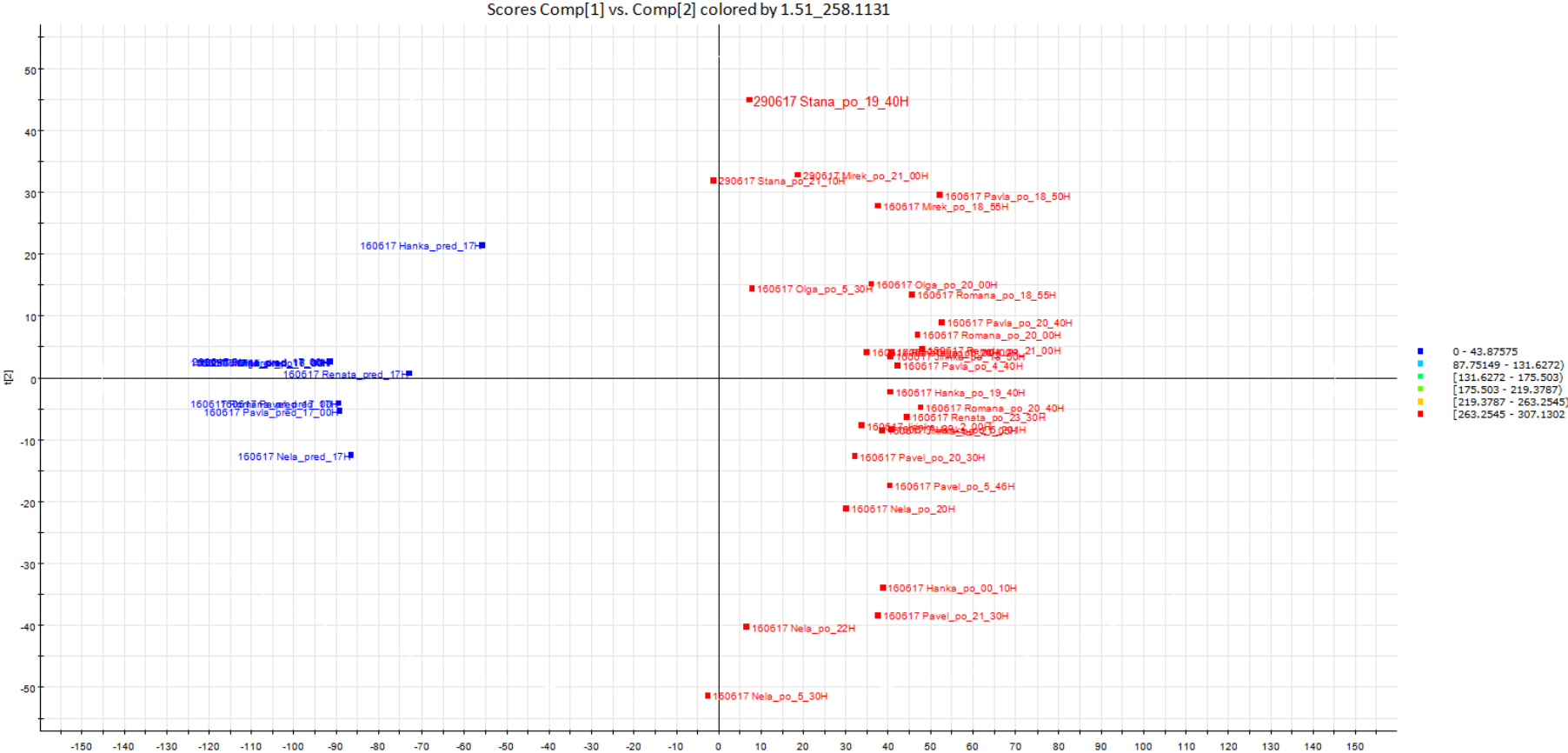
Obr. 12 zobrazuje porovnání výskytu metabolitů agomelatinu před požitím (modré body) a po požití (červené body) agomelatinu ve vzorcích moči zpracovaných postupem 3 a jednoznačně prokazuje, že Markerlynx na základě jiných parametrů než přednastavených metabolických procesů v Metabolynxu identifikoval m/z signály metabolitů agomelatinu jako hlavní rozdíly mezi vzorky před požitím a po požití agomelatinu.

S plot na obrázku 13 byl nakoncipován tak, aby byly zobrazeny případné rozdíly mezi muži a ženami, přičemž hlavní markery pro muže jsou v záporné části osy x a pro ženy v kladné. Čím jsou hodnoty vzdálenější od osy y, tím významnějším markerům odpovídají. Z hlediska metabolitů je v této omezené skupině dobrovolníků patrný určitý trend vyšší tvorby monohydroxyderivátů ve skupině mužů (obr. 13) se srovnání se ženami, ženy naopak více tvoří desmethyl metabolity (obr. 14, modrá barva). S rostoucím věkem žen se rozdíly

snižují (obr 14, červená barva). Nejmladší žena v experimentu měla 26 let, zatímco nejstarší 67 let.

Podle našeho zjištění se jedná o první práci popisující metabolity agomelatinu ze vzorků krve a moči. Na vyhodnocení dat se v současnosti stále pracuje.

Obr.12: Metoda hlavních komponent (PCA) porovnává výsledky metabolitů agomelatinu ve vzorcích moči zpracované pomocí postupu 3 před a po požití agomelatinu



Závěr k identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů a v patientských vzorcích krve a moči

Ve vzorcích lidských hepatocytů byly nalezeny tři hydroxy metabolity a jeden desmethyl metabolit agomelatinu. Dříve publikované práce však potvrdily čtyři hydroxy metabolity agomelatinu [24, 25]. Tento rozdíl mohl být způsoben nízkou funkčností dárcovských jater. Pro získání validních výsledků se provedlo celkově deset izolací. Identifikace metabolitů byla provedena pomocí dvou hmotnostních spektrometrů (Q-ToF Premier a Synapt G2-S) připojených k UHPLC systémům. Pro separaci metabolitů agomelatinu byly testovány dvě HPLC a tři UHPLC kolony. Z pohledu rychlosti a účinnosti chromatografické separace, byla pro analýzu patientských vzorků vybrána UHPLC kolona BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m). Identifikace metabolitů agomelatinu byla provedena na základě přesných hmot a fragmentačních spekter. U hydroxy metabolit 2 a hydroxy metabolitu 3 agomelatinu identifikované ve vzorcích lidských hepatocytů nebylo možné určit polohu hydroxylové skupiny (vazba hydroxy skupiny na aromatické jádro ve srovnání s hydroxy metabolitem 1).

Pro identifikaci metabolitů agomelatinu byly použity vzorky krve a moči od 10 pacientů odebíraných v různých časových intervalech. Analýza probíhala na Synapt G2-S připojeného k UHPLC systému. Pro separaci byla použita kolona, která se osvědčila v předchozí analýze metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů. Celkově byly testovány čtyři procesy úpravy vzorku pro analýzu moči. Byla testována moč s přídatkem agomelatinu (50 ng/ml). Porovnáním extrakčních výtěžků agomelatinu byl jako vhodný způsob extrakce metabolitů z moči vybrán postup 3 a postup 4. Postup 1 a 2 byl vyloučen z důvodu nízkého extrakčního výtěžku (menší jak 30%). Postup úpravy vzorku séra byl vybrán na základě našich předchozích zkušeností s analýzou agomelatinu v patientských vzorcích ve FN Ostrava. V současnosti ještě dále pracujeme na vyhodnocení nalezených dat. Oproti dříve publikovaným pracím jsme však našli sedm hydroxy metabolitů agomelatinu v patientských vzorcích moče. Dále byla provedena analýza hlavních komponent k nalezení potenciálních statisticky významných odlišností v metabolitech agomelatinu mezi skupinami mužů a žen. Byl pozorován trend preference tvorby hydroxyderivátů ve skupině mužů (pouze 2 pacienti z celkově 10 pacientů). Významněji probíhala demethylace agomelatinu u žen. Jedná se však o pozorovaný trend a s určitostí to nelze tvrdit bez ověření na podstatně větší skupině dobrovolníků. Tato studie dále pokračuje.

6 ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byly v rámci předložené práce studovány a validovány tři jednoduché a rychlé metody pro stanovení 13 psychofarmak z patientských vzorků séra. Metody se liší a pomocí první lze stanovit deset psychofarmak, druhá umožňuje sledovat dvě (flufenazin a flupentixol) a třetí jedno léčivo (haloperidol). Metody byly validovány podle FDA kritérií a následně byly použity pro analýzu těchto látek na oddělení klinické farmakologie FN Ostrava. Vyvinuté metody doplňují dřívější metodu klinické analýzy o nové látky a přispěly k rozšíření možností oddělení klinické farmakologie, kde se v současnosti stanovuje okolo 40 psychoaktivních látek. Stanovovaná psychofarmaka se v reálných vzorcích pohybují v koncentracích řádově desítek až stovek ng/ml, což je z pohledu citlivosti trojitého kvadrupolu dostatečné. Jednoduché a rychlé úpravy vzorků s rychlými chromatografickými analýzami dělají tyto metodu vhodné pro rutinní klinické laboratoře.

Z pohledu farmakologického je důležitá identifikace metabolitů léčiv, v předložené práci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů. Studována byla separace na různých kolonách, zkoumány vzorky lidských hepatocytů, ale rovněž reálných patientských vzorků krve a moči (práce zaměřené na metabolity agomelatinu v krvi a moči nebyly v literatuře nalezeny). V moči bylo zjištěno například sedm monohydroxy metabolitů. Získaná data naznačují, že počet metabolitů může být významně vyšší, než dosud v literatuře uváděný počet [25] [24]. Celkový počet metabolitů agomelatinu ve vzorcích moči lze odhadnout na 60-80, ale je nutné konstatovat, že je nezbytné ověření dalšími experimenty.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] P. Sistik, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednar, Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015), *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160 (2016) 39-53.
- [2] C. Hiemke, P. Baumann, N. Bergemann, A. Conca, O. Dietmaier, K. Egberts, M. Fric, M. Gerlach, C. Greiner, G. Grunder, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, E. Jaquenoud Sirot, H. Kirchherr, G. Laux, U.C. Lutz, T. Messer, M.J. Muller, 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*, 44 (2011) 195-235.
- [3] Ď. Jana, *Terapeutické monitorování léčiv v klinické praxi a výzkumu. Dizertační práce.*, Ostrava, 2011.
- [4] M.a.I.K. GRUNDMANN, *Úvod do farmakologie: studijní opora*. Vyd. 1., Ostrava, 2014.
- [5] C. Misl'anova, M. Hutta, Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography, *J Chromatogr B*, 797 (2003) 91-109.
- [6] E.M. Agency, *Assessment report- Asenapine*, European Medicines Agency, 2013.
- [7] J. Zohar, S. Stahl, H.-J. Moller, P. Blier, D. Kupfer, S. Yamawaki, H. Uchida, M. Spedding, G.M. Goodwin, D. Nutt, A review of the current nomenclature for psychotropic agents and an introduction to the Neuroscience-based Nomenclature, *European Neuropsychopharmacology*, 25 (2015) 2318-2325.
- [8] S.M. Stahl, *Prescriber's Guide: Stahl's Essential Psychopharmacology*, 5 ed., Cambridge University Press, New York, 2014.
- [9] S.M. Stahl, *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*, 4 ed., Cambridge University Press, New York, 2013.
- [10] T. Sumiyoshi, K. Jayathilake, H.Y. Meltzer, A comparison of two doses of melperone, an atypical antipsychotic drug, in the treatment of schizophrenia, *Schizophrenia Research*, 62 (2003) 65-72.
- [11] E. Richelson, T. Souder, Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds, *Life Sci*, 68 (2000) 29-39.
- [12] <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>, staženo 11.3.2017
- [13] https://www.ema.europa.eu/documents/referral/haldol-article-30-referral-assessment-report_en.pdf, staženo 8.9.2018
- [14] K.B. Hilal-Dandan R, Brunton L, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 2017.
- [15] <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC102644.pdf&type=spc&as=afluditen-spc>, staženo 8.4.2016
- [16] <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC98877.pdf&type=spc&as=fluvoxol-spc>, staženo 8.4.2016
- [17] Lexicomp, *Drug Information Handbook: A Comprehensive Resource for All Clinicians and Healthcare Professionals*, Lexi-Comp Incorporated 2013.
- [18] E.M. Agency, *Assessment Report- Agomelatine*, European Medicines Agency, 2013.
- [19] C. Hiemke, N. Bergemann, H.W. Clement, A. Conca, J. Deckert, K. Domschke, G. Eckermann, K. Egberts, M. Gerlach, C. Greiner, G. Grunder, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, G. Hefner, R. Helmer, G. Janssen, E. Jaquenoud, G. Laux, T. Messer, R. Mossner, M.J. Muller, M. Paulzen, B. Pfuhlmann, P. Riederer, A. Saria, B. Schoppek, G.

Schoretsanitis, M. Schwarz, M.S. Gracia, B. Stegmann, W. Steimer, J.C. Stingl, M. Uhr, S. Ulrich, S. Unterecker, R. Waschgl, G. Zernig, G. Zurek, P. Baumann, Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017, *Pharmacopsychiatry*, 51 (2018) 9-62.

[20] J. Matal, POROVNÁNÍ LIDSKÝCH A PRASEČÍCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ SE ZŘETELEM NA CYTOCHROMY P450 1A2, 2A19 A UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASU 1A6, Ústav Farmakologie, UP Olomouc, dizertační práce, Olomouc, 2009.

[21] N. Svobodová, Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, laboratoř růstových regulátorů, Olomouc, 2013.

[22] H. Tesfaye, TDM, farmakokinetika, farmakodynamika, inter, /intraindividuální variabilita, individualizace terapie, in: *Remedia* (Ed.), 2014.

[23] https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/valdoxan-epar-product-information_cs.pdf, staženo 26.5.2016

[24] X. Liu, Y.-F. Lu, X. Guan, M. Zhao, J. Wang, F. Li, Characterizing novel metabolic pathways of melatonin receptor agonist agomelatine using metabolomic approaches, *Biochemical Pharmacology*, 109 (2016) 70-82.

[25] J.J. Bogaards, E.M. Hissink, M. Briggs, R. Weaver, R. Jochemsen, P. Jackson, M. Bertrand, P.J. van Bladeren, Prediction of interindividual variation in drug plasma levels in vivo from individual enzyme kinetic data and physiologically based pharmacokinetic modeling, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 12 (2000) 117-124.

[26] I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, Clinical applications of fast liquid chromatography: A review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites, *Journal of Chromatography B*, 927 (2013) 54-79.

[27] W.M. Mullett, Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis, *J Biochem Biophys Methods*, 70 (2007) 263-273.

[28] S.L. Prabu, T.N.K. Suriyaprakash, Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, *Applied Biological Engineering – Principles and Practice*, InTech2012

[29] W.A. Korfmacher, Using mass spectrometry for drug metabolism studies, CRC Press2005.

[30] L. Patteet, K.E. Maudens, B. Sabbe, M. Morrens, M. De Doncker, H. Neels, High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, 429 (2014) 51-58.

[31] M. Di Rago, E. Saar, L.N. Rodda, S. Turfus, A. Kotsos, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC–MS/MS, *Forensic Science International*, 243 (2014) 35-43.

[32] D.S. Fisher, S.J. Partridge, S.A. Handley, L. Couchman, P.E. Morgan, R.J. Flanagan, LC-MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood, *Forensic Sci Int*, 229 (2013) 145-150.

[33] A.E. Steuer, M. Poetzsch, M. Koenig, E. Tingelhoff, S.N. Staeheli, A.T. Roemmelt, T. Kraemer, Comparison of conventional liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood, *Journal of Chromatography A*, 1381 (2015) 87-100.

[34] E.J.J. Berm, J. Paardekooper, E. Brummel-Mulder, E. Hak, B. Wilffert, J.G. Maring, A simple dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of the tricyclic

antidepressants amitriptyline, nortriptyline, imipramine, clomipramine, and their active metabolites using LC-MS/MS, *Talanta*, 134 (2015) 165-172.

[35] L. Patteet, K.E. Maudens, C.P. Stove, W.E. Lambert, M. Morrens, B. Sabbe, H. Neels, The use of dried blood spots for quantification of 15 antipsychotics and 7 metabolites with ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry, *Drug Test Anal*, (2014).

[36] U. Bhaumik, A. Ghosh, A.K. Sarkar, A. Bose, P.S. Selvan, P. Sengupta, U.S. Chakraborty, D. Ghosh, T.K. Pal, Determination of ranolazine in human plasma by LC-MS/MS and its application in bioequivalence study, *J Pharm Biomed Anal*, 48 (2008) 1404-1410.

[37] G. Vecchione, B. Casetta, A. Chiapparino, A. Bertolino, M. Tomaiuolo, F. Cappucci, R. Gatta, M. Margaglione, E. Grandone, A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 67-68 (2012) 104-113.

[38] N. Ansermot, M. Brawand-Amey, A. Kottelat, C.B. Eap, Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J Chromatogr A*, 1292 (2013) 160-172.

[39] T.S. Koo, S.J. Kim, J. Lee, D.J. Ha, M. Baek, H. Moon, Quantification of lurasidone, an atypical antipsychotic drug, in rat plasma with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 25 (2011) 1389-1394.

[40] Y.Q. Lei, W.Y. Zhang, H.D. Li, M.A. Yan, R.H. Zhu, Determination of Ziprasidone by UPLC-MS-MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study of Chinese Schizophrenics, *Chromatographia*, 72 (2010) 975-979.

[41] F. Liang, A.V. Terry, M.G. Bartlett, Determination of aripiprazole in rat plasma and brain using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 26 (2012) 1325-1332.

[42] D.P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, SPE-UPLC-MS/MS method for sensitive and rapid determination of aripiprazole in human plasma to support a bioequivalence study, *J Chromatogr B*, 925 (2013) 20-25.

[43] T. de Boer, E. Meulman, H. Meijering, J. Wieling, P. Dogterom, H. Lass, Quantification of asenapine and three metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with automated solid-phase extraction: application to a phase I clinical trial with asenapine in healthy male subjects, *Biomedical Chromatography*, 26 (2012) 156-165.

[44] T. de Boer, E. Meulman, H. Meijering, J. Wieling, P. Dogterom, H. Lass, Development and validation of automated SPE-HPLC-MS/MS methods for the quantification of asenapine, a new antipsychotic agent, and its two major metabolites in human urine, *Biomed Chromatogr*, 26 (2012) 1461-1463.

[45] V. Viette, D. Guillarme, R. Mylonas, Y. Mauron, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part I), *Clinical Biochemistry*, 44 (2011) 32-44.

[46] E. Choong, S. Rudaz, A. Kottelat, D. Guillarme, J.L. Veuthey, C.B. Eap, Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS, *J Pharm Biomed Anal*, 50 (2009) 1000-1008.

[47] O.Y. Al-Dirbashi, H.Y. Aboul-Enein, A. Al-Odaib, M. Jacob, M.S. Rashed, Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of ziprasidone in human plasma, *Biomedical Chromatography*, 20 (2006) 365-368.

- [48] M.H. Gschwend, P. Arnold, J. Ring, W. Martin, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831 (2006) 132-139.
- [49] M. Aravagiri, S.R. Marder, B. Pollock, Determination of ziprasidone in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level determination in schizophrenia patients, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 847 (2007) 237-244.
- [50] B. Dasandi, S. Shah, Shivprakash, Development and validation of a high throughput and robust LC-MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of diltiazem and its two metabolites in human plasma: Application to a bioequivalence study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 791-798.
- [51] S.N. Lin, L. Lamm, T.F. Newton, M.S. Reid, D.E. Moody, R.L. Foltz, A Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Aripiprazole in Human Plasma, *J Anal Toxicol*, 33 (2009) 237-242.
- [52] S.R. Patil, K.K. Nerurkar, A.M. Kalamkar, V. Pukale, K.V. Mangaonkar, S.G. Pingale, Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *J Mass Spectrom*, 47 (2012) 23-28.
- [53] X.L. Wang, D. Zhang, M. Liu, H.N. Zhao, A.H. Du, L.J. Meng, H.C. Liu, LC-MS/MS method for the determination of agomelatine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 218-222.
- [54] W.W. Sui, X.J. Yang, W.H. Yu, Y. Jin, X.Y. Luan, X.J. Wang, H.Y. Xu, A validated LC-MS/MS method for the rapid quantification of vilazodone in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98 (2014) 228-234.
- [55] M. Song, X. Xu, T. Hang, A. Wen, L. Yang, Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in human plasma, *Anal Biochem*, 385 (2009) 270-277.
- [56] V.B. Ambavaram, V. Nandigam, M. Vemula, G.R. Kalluru, M. Gajulapalle, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of urapidil and aripiprazole in human plasma and its application to human pharmacokinetic study, *Biomed Chromatogr*, (2013).
- [57] M.M. Jia, J. Li, X.M. He, M.Z. Liu, Y. Zhou, Y. Fan, W.Y. Li, Simultaneous determination of iloperidone and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B*, 928 (2013) 52-57.
- [58] A.V.B. Reddy, N. Venugopal, G. Madhavi, Simultaneous determination of asenapine and valproic acid in human plasma using LC-MS/MS: Application of the method to support pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3 (2013) 394-401.
- [59] K. Nozaki, I. Osaka, H. Kawasaki, R. Arakawa, Application of on-line electrochemistry/electrospray/tandem mass spectrometry to a quantification method for the antipsychotic drug zotepine in human serum, *Anal Sci*, 25 (2009) 1197-1201.
- [60] M. Caloro, L. Lionetto, I. Cuomo, A. Simonetti, D. Pucci, S. De Persis, B. Casolla, G.D. Kotzalidis, A. Sciarretta, S. De Filippis, M. Simmaco, P. Girardi, An improved simple LC-MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite, *J Pharm Biomed Anal*, 62 (2012) 135-139.
- [61] H. Kirchherr, W.N. Kuhn-Velten, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 843 (2006) 100-113.

[62] J. Hasselstrom, Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879 (2011) 123-128.

[63] R. Uřinová, M. Turjap, H. Brozmanová, M. Grundmann, Analytical methods for the determination of selected psychopharmaceuticals, *Čes. a slov. Farm.*, 59 (2010) 103-111.

[64] K. Nakashima, High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples, *J Health Sci*, 51 (2005) 272-277.

[65] G. Zhang, A.V. Terry, Jr., M.G. Bartlett, Determination of the lipophilic antipsychotic drug ziprasidone in rat plasma and brain tissue using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 22 (2008) 770-778.

[66] Y.J. Chae, T.S. Koo, K.R. Lee, A Sensitive and Selective LC-MS Method for the Determination of Lurasidone in Rat Plasma, Bile, and Urine, *Chromatographia*, 75 (2012) 1117-1128.

[67] S. Jamalapuram, P.K. Vuppala, C. Mesangeau, C.R. McCurdy, B.A. Avery, Determination of a highly selective mixed-affinity sigma receptor ligand, in rat plasma by ultra performance liquid chromatography mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 891-892 (2012) 1-6.

[68] L.-l. Zeng, L.-l. Sun, Q. Zou, F. Zhou, P. Wei, P.-k. Ouyang, Bioavailability comparison of a new form of vilazodone XVII to IV in beagles using liquid chromatography/mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 1738-1743.

[69] G. Zhang, A.V. Terry, M.G. Bartlett, Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue, *J Chromatogr B*, 858 (2007) 276-281.

[70] G. Zhang, A.V. Terry, Jr., M.G. Bartlett, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21 (2007) 920-928.

[71] K.Y. Li, Y.G. Zhou, H.Y. Ren, F. Wang, B.K. Zhang, H.D. Li, Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in in vitro samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 850 (2007) 581-585.

[72] M.C. Sampedro, N. Unceta, A. Gomez-Caballero, L.F. Callado, B. Morentin, M.A. Goicolea, J.J. Meana, R.J. Barrio, Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest, *Forensic Science International*, 219 (2012).

[73] K. Noh, Y.J. Jang, K.I. Kwon, E. Kim, T.C. Jeong, H.Y. Yun, W. Kang, Quantitative determination of amisulpride in rat plasma by HPLC-MS/MS, *Archives of pharmacal research*, 38 (2015) 63-67.

[74] R. Uřinová, H. Brozmanová, P. Sistik, P. Silhan, I. Kacířová, K. Lemr, M. Grundmann, 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.

[75] L. Williams, S. Merriman, H. Lodder, A. Howells, S. Jordan, C. Desbrow, M. Cleeve, R. Calverley, High throughput extraction of drugs from biological fluids using an improved supported liquid extraction plate, Biotage company, UK.

- [76] N. Raikos, K. Spagou, M. Vlachou, A. Pouliopoulos, E. Thessalonikeos, H. Tsoukali, Development of a Liquid-Liquid Extraction Procedure for the Analysis of Amphetamine in Biological Specimens by GC-FID, *The Open Forensic Science Journal*, 2 (2009) 12-15.
- [77] J. Chen, Y. Hsieh, Stabilizing drug molecules in biological samples, *Ther Drug Monit*, 27 (2005) 617-624.
- [78] R. Bakhtiar, T.K. Majumdar, Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55 (2007) 227-243.
- [79] D.S. Fisher, S.J. Partridge, S.A. Handley, R.J. Flanagan, Stability of some atypical antipsychotics in human plasma, haemolysed whole blood, oral fluid, human serum and calf serum, *Forensic Science International*, 229 (2013) 151-156.
- [80] E. Saar, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, J. Beyer, Assessment of the stability of 30 antipsychotic drugs in stored blood specimens, *Forensic Sci Int*, 215 (2012) 152-158.
- [81] FDA, 2011.
- [82] M. Kubo, Y. Mizooku, Y. Hirao, T. Osumi, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 822 (2005) 294-299.
- [83] J. Che, Q. Meng, Z. Chen, C. San, Y. Hou, Y. Cheng, Validation of a sensitive LC/MS/MS method for simultaneous quantitation of flupentixol and melitracen in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 785-792.
- [84] C. Fernandes, E. Van Hoeck, P. Sandra, F.M. Lancas, Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction, *Analytica Chimica Acta*, 614 (2008) 201-207.
- [85] S. Ulrich, F.P. Meyer, B. Bogerts, A capillary gas-liquid chromatographic method for the assay of the neuroleptic drug zotepine in human serum or plasma, *J Pharm Biomed Anal*, 14 (1996) 441-449.
- [86] H.C. Huang, C.H. Liu, T.H. Lan, T.M. Hu, H.J. Chiu, Y.C. Wu, Y.L. Tseng, Detection and quantification of aripiprazole and its metabolite, dehydroaripiprazole, by gas chromatography-mass spectrometry in blood samples of psychiatric patients, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 856 (2007) 57-61.
- [87] N. Djordjevic Filijovic, A. Pavlovic, K. Nikolic, D. Agbaba, Validation of an HPLC method for determination of aripiprazole and its impurities in pharmaceuticals. , *Acta Chromatographica*, 26 (2014) 13-28.
- [88] S. Jamalapuram, P.K. Vuppala, A.H. Abdelazeem, C.R. McCurdy, B.A. Avery, Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of AZ66, a sigma receptor ligand, in rat plasma and its application to in vivo pharmacokinetics, *Biomedical Chromatography*, 27 (2013) 1034-1040.
- [89] A.M. Moreno, M.J. Navas, A.G. Asuero, HPLC-DAD determination of CNS-acting drugs in human blood, plasma, and serum, *Critical reviews in analytical chemistry / CRC*, 44 (2014) 68-106.
- [90] C.R. Mitchell, Y. Bao, N.J. Benz, S. Zhang, Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 4133-4139.
- [91] V. Ascalone, M. Ripamonti, B. Malavasi, Stereospecific determination of amisulpride, a new benzamide derivative, in human plasma and urine by automated solid-phase extraction and liquid chromatography on a chiral column - Application to pharmacokinetics, *J Chromatogr B*, 676 (1996) 95-105.

- [92] H.H. Maurer, What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening?, *J Chromatogr A*, 1292 (2013) 19-24.
- [93] A. Bozovic, V. Kulasingam, Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins, *Clinical Biochemistry*, 46 (2013) 444-455.
- [94] EMA, 2017.
- [95] M.E. Monge, G.A. Harris, P. Dwivedi, F.M. Fernandez, Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization, *Chemical reviews*, 113 (2013) 2269-2308.
- [96] W.J. M, L. B.C, Desorption Electrospray Ionization (DESI) Mass Spectrometry: A brief introduction and overview, *Current Separations and Drug Development*.
- [97] M. Morelato, A. Beavis, P. Kirkbride, C. Roux, Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS), *Forensic Sci Int*, 226 (2013) 10-21.
- [98] B.R. Cody, J.A. Laramée, J.M. Nilles, H.P. Durst, Direct analysis in real time (DART) Mass spectrometry, *JEOL news*, 40 (2005) 8-12.
- [99] C. Rosting, S. Pedersen-Bjergaard, S.H. Hansen, C. Janfelt, High-throughput analysis of drugs in biological fluids by desorption electrospray ionization mass spectrometry coupled with thin liquid membrane extraction, *The Analyst*, 138 (2013) 5965-5972.
- [100] C. Yao, N. Na, L. Huang, D. He, J. Ouyang, High-throughput detection of drugs binding to proteins using desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 794 (2013) 60-66.
- [101] L. Novakova, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, *J Chromatogr A*, 1292 (2013) 25-37.
- [102] E. Chambers, D.M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J.R. Mazzeo, Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852 (2007) 22-34.
- [103] C. Chin, Z.P. Zhang, H.T. Karnes, A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine, *J Pharm Biomed Anal*, 35 (2004) 1149-1167.
- [104] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 2198-2207.
- [105] P.J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clinical Biochemistry*, 38 (2005) 328-334.
- [106] M.F. Poirier, O. Canceil, F. Bayle, B. Millet, M.C. Bourdel, C. Moatti, J.P. Olie, D. Attar-Levy, Prevalence of smoking in psychiatric patients, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26 (2002) 529-537.
- [107] W.K. Kennedy, M.W. Jann, E.C. Kutscher, Clinically significant drug interactions with atypical antipsychotics, *CNS Drugs*, 27 (2013) 1021-1048.
- [108] E. Llorente Fernandez, L. Pares, I. Ajuria, F. Bandres, B. Castanyer, F. Campos, C. Farre, L. Pou, J.M. Queralto, J. To-Figueras, State of the art in therapeutic drug monitoring, *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 48 (2010) 437-446.
- [109] F. Aucella, V. Lauriola, G. Vecchione, G.L. Tiscia, E. Grandone, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method as the golden standard for therapeutic drug monitoring in renal transplant, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86 (2013) 123-126.
- [110] K.E. Moeller, K.C. Lee, J.C. Kissack, Urine drug screening: practical guide for clinicians, *Mayo Clinic proceedings*, 83 (2008) 66-76.

- [111] A. Wilhelm, J.G. den Burger, E. Swart, Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions, *Clin Pharmacokinet*, 53 (2014) 961-973.
- [112] L. Zhang, P. Wu, Q. Jin, Z. Hu, J. Wang, Multi-residue analysis of sedative drugs in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1072 (2018) 305-314.
- [113] J.M. Juenke, P.I. Brown, F.M. Urry, K.L. Johnson-Davis, G.A. McMillin, Simultaneous UPLC–MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma, *Clinica Chimica Acta*, 423 (2013) 32-34.
- [114] A. Wojnicz, C. Belmonte, D. Koller, A. Ruiz-Nuño, M. Román, D. Ochoa, F. Abad-Santos, Effective phospholipids removing microelution-solid phase extraction LC-MS/MS method for simultaneous plasma quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole: Application to human pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151 (2018) 116-125.
- [115] Y. Sun, X. Lu, Y. Gai, C. Sha, G. Leng, X. Yang, W. Liu, LC-MS/MS method for the determination of the prodrug aripiprazole lauroxil and its three metabolites in plasma and its application to in vitro biotransformation and animal pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatography B*, (2018).
- [116] S. Odoardi, V. Valentini, N. De Giovanni, V.L. Pascali, S. Strano-Rossi, High-throughput screening for drugs of abuse and pharmaceutical drugs in hair by liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), *Microchemical Journal*, 133 (2017) 302-310.
- [117] J. Sim, E. Kim, W. Yang, S. Woo, S. In, An LC–MS/MS method for the simultaneous determination of 15 antipsychotics and two metabolites in hair and its application to rat hair, *Forensic Science International*, 274 (2017) 91-98.
- [118] A. Petruczynik, K. Wróblewski, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, H. Karakuła-Juchnowicz, J. Gajewski, J. Moryłowska-Topolska, M. Waksmundzka-Hajnos, Determination of some psychotropic drugs in serum and saliva samples by HPLC-DAD and HPLC MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127 (2016) 68-80.
- [119] J. Gradinaru, A. Vullioud, C.B. Eap, N. Ansermot, Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88 (2014) 36-44.
- [120] P. Sistik, R. Urinovska, H. Brozmanova, I. Kacirova, P. Silhan, K. Lemr, Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication, *Biomedical chromatography : BMC*, 30 (2016) 217-224.
- [121] L. Pichard, G. Gillet, I. Fabre, I. Dalet-Beluche, C. Bonfils, J.P. Thenot, P. Maurel, Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem, *Drug Metab Dispos*, 18 (1990) 711-719.
- [122] J.R. Tennant, Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability, *Transplantation*, 2 (1964) 685-694.
- [123] U.R.a.P.R. Klapková E, Vliv matricových efektu pri vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií., *Klinická Biochemie a metabolismus*, 19 (2011) 5-8.
- [124] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87 (2014) 12-25.
- [125]<https://www.separatedbyexperience.com/uhplc/calculator.html>, staženo 10.3.2017

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN – acetonitril

AGO – agomelatin

AMS – amisulprid

APCI – atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosferického tlaku

API – ionizace za atmosférického tlaku

ARP – aripiprazol

ASE – asenapin

AUC – area under curve, plocha pod křivkou

BEH – ethylene bridged hybrid

CAD – kolizně aktivovaná disociace

CE – collision energy, kolizní energie

CID – collision induced dissociation, kolizí indukovaná disociace

CNS – centrální nervová soustava

CV – coefficient of variation, variační koeficient

DAD – diode array detector, detektor diodového pole

DARP – dehydroaripiprazol

DART – přímá analýza v reálném čase

DBS – dried blood spot, metoda suché krevní kapky

DESI – ionizace desorpčním elektrosprejem

EMA – european medicines agency, evropská agentura pro léčivé přípravky

EMs – extenzivní metabolizátor

EPS – extrapyramidový syndrom

ESI – electrospray, elektrosprej

FA – formic acid, kyselina mravenčí

FDA – food and drug administration, úřad pro výživu a léky

FLF – flufenazin

FLP – flupentixol

FPE – first pass effect, efekt prvního průchodu

FT-ICR – fourier transform ion cyclotron resonance, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

GC – gas chromatography, plynová chromatografie

HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography, hydrofilní interakční chromatografie

HLM – lidské jaterní mikrosomy

HLP – haloperidol

HLP – haloperidol

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-UV – vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí

i. d. – internal diameter, vnitřní průměr

IA – ImmunoAssay

ILO – iloperidon

LLE – liquid-liquid extracion, extrakce kapalina-kapalina

LLOQ – lower limit of quantification, dolní limit kvantifikace

LOD – limit of detection, limit detekce

LOQ – limit of quantitation, limit kvantifikace

m/z – mass-to-charge, poměr hmotnosti a náboje

ME – matrix effect, matriční efekt

MeOH – methanol

MLP – melperon

MRM – multi-reaction monitoring, sledování více reakcí

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandem mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie

MTB – metabolity

NPD – nitrogen phosphorous detector, dusíko-fosforový detektor

NÚ – nežádoucí účinky

Pgp – p-glykoprotein

pK_a – disociační konstanta

PMs – pomalý metabolizátor

PPT – protein precipitation method, metoda srážení proteinů

Q₁ – jednoduchý kvadrupólový analyzátor

Q₃ – trojitý kvadrupólový analyzátor

QC – quality control, kontrola kvality

QqQ – triple quadrupole, trojitý kvadrupól

Q-TOF – quadrupole-time of flight, kvadrupól s průletovým analyzátozem

RE – recovery, výtěžnost

RSD – relative standard deviation, relativní směrodatná odchylka

RT příp. **t_r** – retention time, retenční čas

SIM – selected ion monitoring, režim selektivního monitorování iontů

SRM – selected reaction monitoring, monitorování vybraných reakcí

TOF – time of flight, průletový analyzátoz

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Pavel Šišťík
Adresa: Mánesova 468, Frýdek-Místek, 738 01
Email: pavel.sistik@fno.cz

VZDĚLÁNÍ

- 2010 – současnost
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie
- 2007 – 06/2009
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.
- 2002 – 08/2007
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.

STÁŽE

- 2008
Odborná stáž v laboratořích dědičných metablických poruch, FN Olomouc. Získání praktických zkušeností z elektroforézy
- 2009
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie.

- 2013
Vědeckovýzkumná stáž – aplikační demo laboratoř společnosti Waters, Vídeň.
Vedoucí: Dr. Jan Bohuslávek. Vývoj metody pro stanovení pesticidů a herbicidů z povrchových vod a půd metodou UPLC-MS/MS.
- 2014
Vědeckovýzkumná stáž – aplikační demo laboratoř společnosti Waters, Vídeň.
Vedoucí: Dr. Jan Bohuslávek. Vývoj metody pro stanovení polárních pesticidů pomocí UPLC-MS/MS.

ZAMĚSTNÁNÍ

- 1/2018-doposud
Waters, aplikační specialista se zaměřením na hmotnostní spektrometrií
Hietzinger Hauptstraße 145, 1130 Wien, Rakousko
- 10/2009-12/2017
Fakultní nemocnice Ostrava, oddělení klinické farmakologie,
17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba
- 9/2012-12/2017
Lékařská fakulta Ostravské univerzity, odborný asistent
Syllabova 19, 703 00 Ostrava-jih

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- výuka předmětů pro 2. ročníku Bc. oboru Zdravotní laborant:
 - Instrumentální metody v biochemii (21 vyučovacích hodin přednášek + 21 vyučovacích hodin cvičení za semestr)
 - analytické metody v biochemii (21 vyučovacích hodin přednášek + 21 vyučovacích hodin cvičení za semestr)
- výuka předmětu pro 1. ročník Bc. oboru Zdravotní laborant:

- základní výpočty a techniky ve zdravotnické laboratoři (7 vyučovacích hodin přednášek + 14 vyučovacích hodin cvičení za semestr)

PROJEKTY

Název projektu: Modernizace výuky předmětů v oblasti laboratorní diagnostiky pro studenty všeobecného lékařství a oboru zdravotní laborant, financován LF Ostravské univerzity

PUBLIKACE

- Urinovska, H. Brozmanova, **P. Sistik**, P. Silhan, I. Kacirova, K. Lemr, M. Grundmann, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 907 (2012) 101-107.
- **P. Sistik**, R. Urinovska, H. Brozmanova, I. Kacirova, P. Silhan, K. Lemr, Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication, *Biomedical chromatography : BMC*, 30 (2016) 217-224.
- **P. Sistik**, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednar, Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015), *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160 (2016) 39-53.
- H. Brozmanova, I. Kacirova, R. Urinovska, **P. Sistik**, M. Grundmann, New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal functions and comparison with results of polarization fluoroimmunoassay in light of varying creatinine concentrations, *Clin Chim Acta*, 469 (2017) 136-143.

PUBLIKOVANÁ ABSTRAKTA

- Uřinovská R., Brozmanová H., **Šištík 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

- Urinovska R., Brozmanova H., **Sistik P.**, Silhan P., Kacirova I., Grundmann M. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs, IATDMCT European Conference therapeutic drug monitoring, Personalised Pharmacotherapy, 28.-30.8. 2014, Praha, ISBN 978-80-260-6794-8
- **Šišťík P.**, Uřinovská R., Brozmanová H., Analýza nových psychofarmak ve FN Ostrava metodou kapalinové chromatografie, 7. Česko-slovenská conference klinické farmakologie, 11.-12.9. 2015 Olomouc
- Uřinovská R., **Šišťík P.**, Brozmanová H., Metoda kapalinové chromatografie pro monitorování hladin methotrexatu, 7. Česko-slovenská conference klinické farmakologie, 11.-12.9. 2015 Olomouc
- Urinovska R., **Sistik P.** Development of Liquid Chromatography Method Coupled With Mass Spectrometry for Analysis of the Vitamins in Human Serum, Clinical Therapeutics, 39, 2017. e 85
- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Lemr K.. Quantitative Analysis of Fluphenazine and Flupentixol in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Clinical Therapeutics, 39, 2017, e 85
- Brozmanova H., Urinovska R., **Sistik P.**, Kacirova I., Grundmann M., Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Gentamicin Concentrations and Comparison with Two Immunoassay Methods (Chemiluminiscent Assay a Polarization Fluoroimmunoassay), Clinical Therapeutics, 39, 8, 2017, e86
- Urinovska R., **Sistik P.**, Bacakova T., Brozmanova H., Kacirova I. Simultaneous Determination of Donepezil and its Two Metabolites in Human Serum by Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry, Clinical Therapeutics, 39, 2017, e83
- Urinovska R., **Sistik P.**, matlak P., Brozmanova H., Kacirova I. Validation Of LC-MS/MS Method for Monitoring of Methotrexate and its Metabolite 7-Hydroxymethotrexate Levels in Human Serum, Clinical Therapeutics, 39, 2017, e83

- Brozmanova H., Kacirova I., Urinovska R., **Sistik P.**, Grundmann M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Tdm of Vancomycin and Comparison with Results of Polarization Fluoroimmunoassay, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017, e86,
- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Lemr K.. Routine Therapeutic Drug Monitoring of Haloperidol in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Therapeutics*, 39, Issue 8, Supplement, August 2017, e84-e85
- Brozmanova H., Urinovska R., **Sistik P.**, Kacirova I., Grundmann M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Azole Antifugals in Human Serum, *Clinical Therapeutics*, 39, Issue 8, Supplement, August 2017, e85-e86,

PŘEDNÁŠKY/POUSTRY NA KONFERENCÍCH

- Uřinová R., Brozmannová H., **Šišťík 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
- Uřinová R., **Šišťík P.**, Brozmannová H., Kacířová I., Šilhán P., Grundmann M., Terapeutické monitorování psychofarmak, Biolab 2014, 25-27.5.2014, Ostrava
- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Silhan P., Lemr K. A fully validated method for therapeutic drug monitoring of two antidepressants, seven antipsychotics and one main metabolite in human serum by precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, IATDMCT European Conference therapeutic drug monitoring, Personalised Pharmacotherapy, 28.-30.8. 2014, Praha, ISBN 978-80-260-6794-8
- H.Brozmannová, R.Uřinová, **P.Šišťík**, I.Kacířová, M.Grundmann; Stanovení sérové koncentrace gentamicinu metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a porovnání se dvěma imunoanalytickými metodami

- R.Uřinová, **P.Šišťík**, T.Bačáková, H.Brozmanová , I.Kacířová; , Vývoj metody na stanovení sérové koncentrace donepezilu a jeho dvou metabolitů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí, 18. Česká konference klinické farmakologie, 22. Česká konference TDM, 20. Česká konference durg, Plzeň 8.-9.9.2016
- **P. Šišťík**, R. Uřinová, K. Lemr; Stanovení vitamínů v séru spojením kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou, 18. Česká konference klinické farmakologie, 22. Česká konference TDM, 20. Česká konference durg, Plzeň 8.-9.9.2016

PŘÍLOHA A: PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY

1. **P. Šišťík**, R. Uřinová, H. Brozmannová, I. Kacířová, P. Šilhán, K. Lemr, *Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication*, Biomed Chromatogr, 30 (2016) 217-224.
2. **P. Šišťík**, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednář, *Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015)*, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 160 (2016) 39-53.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
v analýze psychofarmak**

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Autor práce:

Mgr. Pavel Šišťík

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2018

SOUHRN

Dizertační práce se zabývá vývojem metod pro stanovení vybraných psychoaktivních látek v séru. Teoretická část dizertační práce je věnována terapeutickému monitorování, farmakologickým vlastnostem vybraných psychofarmak a metabolismu agomelatinu. Dále je pro tyto látky popsána problematika úpravy biologické matrice, jejich stabilita a analýza pomocí separačních technik se zaměřením na chromatografické metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Požadavky pro analýzu konkrétních psychofarmak vycházejí z potřeb terapeutického monitorování těchto látek na oddělení klinické farmakologie při Fakultní nemocnici v Ostravě. Pro nastavení vhodného dávkování léčiva, které zajistí koncentraci psychofarmaka v krvi zaručující požadovaný účinek a minimalizující riziko nežádoucích účinků, je třeba stanovovat jejich obsah v biologickém systému.

Vyvinuty a zavedeny do klinické praxe byly metody pro stanovení 12 psychofarmak a jednoho metabolitu v séru. Dnes jsou využívány pro potřeby terapeutického monitorování na oddělení klinické farmakologie ve Fakultní nemocnici v Ostravě. V návaznosti na dříve již vyvinutou metodu byly doplněny možnosti analýz, které jsou nabízeny oddělením a klinikám Fakultní nemocnice Ostrava a také ostatním centrům a ambulancím nacházející se nejen v ostravské spádové oblasti. V současnosti se na oddělení klinické farmakologie stanovuje kolem čtyřiceti psychoaktivních látek.

Z časového hlediska je proces úpravy vzorku, zejména v klinické laboratoři, velmi kritický. Cílem bylo použít minimálního objemu biologické matrice a současně jednoduchou a časově nenáročnou metodu úpravy vzorku. Pro analýzu bylo použito 200 μ l séra a jako postup úpravy vzorku byla zvolena metoda srážení proteinů. Pro detekci byly zvažovány a porovnávány dvě ionizační techniky, a to elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku. Pro všechna psychofarmaka: agomelatin, amisulprid, aripiprazol, dehydroaripiprazol, asenapin, haloperidol, flufenazin, flupentixol, iloperidon, melperon, vilazodon, ziprasidon a zotepin byla vybrána ionizace elektrosprejem. Limity detekce a kvantifikace byly pro všechny látky hluboko pod jejich terapeutickým rozmezím. Velkou výhodou bylo, že pro většinu analytů byly dodrženy podmínky úpravy vzorku, typ kolony a gradient mobilní fáze již na pracovišti používané. Pro analýzu haloperidolu bylo změněno složení mobilní fáze z důvodu nízké odezvy za stávajících podmínek. Výsledné metody byly validovány podle FDA kritérií a použity pro analýzu patientských vzorků v klinické laboratoři.

Další část práce byla zaměřena na identifikaci metabolitů agomelatinu v lidských hepatocytech. Po inkubaci dárcovských hepatocytů byla analýza provedena s využitím hmotnostních spektrometrů s vysokou rozlišovací schopností. Pro separaci byly testovány různé kolony. Výsledky analýz potvrdily dříve publikované metabolity. Nejlepší podmínky analýzy byly použity pro identifikaci metabolitů agomelatinu v patientských vzorcích krve a moči. Pro úpravu vzorků moči byly testovány čtyři postupy. Dříve publikované práce uvádějí čtyři hydroxy metabolity agomelatinu v jaterních mikrozomech. V námi analyzovaných patientských vzorcích moče bylo detekováno sedm hydroxy metabolitů agomelatinu. Vyvinutý postup bude využit pro analýzu dalších metabolitů agomelatinu.

SUMMARY

This dissertation thesis is focused on the development of methods for the determination of selected psychoactive drugs in human serum. The theoretical part of the dissertation describes the therapeutic drug monitoring, pharmacological properties of selected psychotropic drugs and the metabolism of agomelatine. The following text describes the problems of sample preparation from biological matrices, the stability of psychotropic drugs and their analysis by separation techniques focusing on chromatographic methods in combination with mass spectrometry detection. The requirements for the analysis of specific psychopharmaceuticals are based on the requirement of the Department of Clinical Pharmacology at the University Hospital Ostrava. In order to maximize the therapeutic effect and minimize the risk of adverse effects of the particular drug it is necessary to achieve the appropriate serum concentrations. Serum concentrations of the drug often correlate better with the therapeutic effect than the dose itself and therefore it is very useful to measure them.

The developed methods were used in clinical practice for the quantification of 12 psychotropic drugs and one metabolite in human serum. These methods are used for therapeutic monitoring purposes of the Department of Clinical Pharmacology at the University Hospital Ostrava. The previously developed method has been supplemented with new psychotropic drugs and the portfolio of established psychotropic drugs has been expanded. These analyses are offered by the departments and clinics at the Faculty Hospital in Ostrava as well as by other centers and outpatient clinics located not only in the Ostrava area. At present, around forty psychotropic drugs are quantified at the Department of Clinical Pharmacology.

Sample preparation step is a critical part of the analysis, because it is very time consuming. The aim was to use a minimum volume of the biological matrix for the analysis and to use a less time-consuming, simpler sample preparation method. 200 μ l of human serum was used for the analysis and the protein precipitation step was chosen as the sample preparation procedure. Two ionization techniques were tested and compared for the detection - electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mode. For all psychotropic drugs: agomelatine, amisulpride, aripiprazole, dehydroaripiprazole, asenapine, haloperidol, fluphenazine, flupentixol, iloperidone, melperon, vilazodone, ziprasidone and zotepine, electrospray ionization was chosen. The limits of detection and the limits of quantification

were under the therapeutic range for all selected drugs. The great advantage of the methods was that for most of the analytes, the sample preparation step, the type of the column and the gradient of elution was the same as in previously developed method. The composition of the mobile phase was changed for haloperidol because it had low response under the current conditions. The new developed methods were validated according to the FDA criteria and used for the analysis of patient samples in a clinical laboratory.

Another part of the doctoral thesis focused on the identification of metabolites of agomelatine in human hepatocytes. After the incubation of donor hepatocytes with agomelatine, the analysis was performed by high-resolution mass spectrometry. Various types of columns were tested for the chromatographic separation. The results of the analysis confirmed the presence of previously published metabolites. The analysis that gave the best results was used for the identification of agomelatine metabolites in patient blood and urine samples. We tested 4 sample preparation methods for urine samples. The previously published papers report four hydroxy metabolites of agomelatine in liver microsomes. In the patient samples we detected seven hydroxy metabolites of agomelatine. The developed procedure will be used for the analysis of additional metabolites of agomelatine.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. ANALÝZA PSYCHOFARMAK.....	2
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	4
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	5
4.1. SOUČASNÉ STANOVENÍ DESETI PSYCHOFARMAK PRO KLINICKOU PRAXI	5
4.2. STANOVENÍ HALOPERIDOLU, FLUFENAZINU A FLUPENTIXOLU V SÉRU	8
4.3. IDENTIFIKACE METABOLITŮ AGOMELATINU ZE VZORKŮ LIDSKÝCH HEPATOCYTŮ	10
4.4. IDENTIFIKACE METABOLITŮ AGOMELATINU Z PACIENTSKÝCH VZORKŮ KRVE A MOČI	17
5. ZÁVĚR	21
POUŽITÁ LITERATURA.....	22
ŽIVOTOPIS.....	26

1. ÚVOD

Vývoj a výroba nových léků a léčiv by se v dnešní době neobešla bez velmi citlivých analytických metod, které je dokáží identifikovat a kvantifikovat v nejrůznějších matricích. V této oblasti jednoznačně dominují separační metody a jejich spojení s nejrůznějšími typy detektorů. Jedním z nich je hmotnostní spektrometr, který díky své citlivosti a selektivitě umožňuje velmi rychlou analýzu širokého spektra látek.

Dizertační práce je zaměřena na vývoj nových metod pro stanovení vybraných psychofarmak v séru pro potřeby jejich terapeutického monitorování na oddělení klinické farmakologie při Fakultní nemocnici v Ostravě. Snahou bylo navázat na dříve již vyvinutou metodu, doplnit ji o nové látky a nabídnout ji oddělením a klinikám Fakultní nemocnice a také ostatním centrům a ambulancím nacházejícím se nejen ve spádové oblasti.

Záměrem bylo analyzovat minimální množství biologické matrice a současně použít jednoduchou a časově nenáročnou metodu úpravy vzorku. Výsledkem je validace metody a její použití v rutinní analýze patientských vzorků ve FN Ostrava.

Další část dizertační práce se zabývá identifikací metabolitů agomelatinu nejprve získaných kultivací s lidskými hepatocyty. Testovány byly různé experimentální podmínky a vyvinutá metoda byla následně použita pro identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích krve a séra pacientů.

Navržené postupy dokládají význam separačních metod a hmotnostní spektrometrie pro klinickou praxi.

2. ANALÝZA PSYCHOFARMAK

Terapeutické monitorování hladin léčiv (TDM) je metoda klinické farmakologie sledující hladinu léčiv v biologické matrici (séru, plazmě a plné krvi) za účelem udržení takové koncentrace účinné látky v krevním oběhu, která je příznivá pro její žádaný účinek [1]. Z klinického hlediska mají uvedená psychofarmaka: agomelatin, amisulprid, aripiprazol, dehydroaripiprazol, asenapin, haloperidol, flufenazin, flupentixol, iloperidon, melperon, vilazodon, ziprasidon a zotepin, některé z "požadovaných vlastností" pro TDM. Rutinní TDM výše uvedených léků není indikováno (s výjimkou amisulpridu a případně aripiprazolu a ziprasidonu), ale může být v určitých situacích zvažováno za účelem potvrzení neadherence nebo intoxikace a dalších případech.

Pokud jde o samotnou analýzu, klinické laboratoře mají dvě hlavní možnosti, jak analyzovat léčiva v biologických tekutinách: imunoanalýza nebo chromatografie. V současné době je kvantitativní analýza léků pro TDM založena především na imunoanalytických metodách (IA) [2]. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) se úspěšně používá pro kvantitativní analýzu léků ve farmakokinetických studiích a TDM.

Bez ohledu na vysokou selektivitu a spolehlivost HPLC/MS metod zůstává příprava vzorků rozhodující pro preciznost a přesnost výsledků. Autoři využili různé extrakční techniky pro stanovení antidepresiv a antipsychotik z plné krve, plazmy a moči. Extrakce krve byla buď provedena přímo z plné krve [3] [4] [5] [6] nebo pomocí metody suché krevní kapky (DBS) [7] [8]. Plazma byla přímo analyzována po vysrážení proteinů (PPT) [9-12] nebo po extrakci na pevné fázi (SPE) [13-19] či po extrakci kapalina-kapalina (LLE) [5, 16, 20-31]. Analýza psychofarmak ze séra byla provedena po PPT metodě [32],[33, 34] nebo SPE extrakci [35] nebo po LLE extrakci [3]. Metody využívající PPT jsou jednoduché a levné, ale produkují poměrně nečisté vzorky, které mohou zkrátit životnost chromatografických kolon, prodloužit čištění/údržbu hmotnostního spektrometru nebo vést k matricovým efektům. LLE a SPE jsou účinnější z pohledu čistoty extraktů a menšího rizika matricových efektů. Jsou však také pracnější a časově náročnější. Jsou obtížně automatizovatelné v klinických laboratořích (např. bez investice do potřebného zařízení pro automatizaci SPE).

UHPLC systémy umožnily výrazně zlepšit chromatografickou účinnost oproti konvenčním HPLC systémům. Zvyšuje se účinnost, chromatografické rozlišení, ale i citivost a rychlost separace. Bylo vyvinuto velké množství nových stacionárních fází na bázi sub-2 μm částic, které byly použity pro analýzu psychofarmak a jejich metabolitů v lidské plazmě. Bez ohledu na vývoj materiálů s různou selektivitou systémy obrácených fází stále nabízejí nejlepší platformu pro TDM studovaných psychofarmak a analýzu jejich metabolitů. Stanovení metabolitů psychofarmak v biologických matricích může být užitečné zejména pro zhodnocení lepšího terapeutického dávkování léků. Stále však ještě někteří autoři publikují analytické metody bez stanovení aktivních metabolitů (aripiprazol, citalopram, olanzapin, sertralin) [6].

Ionizace elektrosprejem s tandemovými hmotnostními spektrometry dominují mezi detektory pro LC/MS analýzu psychofarmak. Trojitý kvadrupól je nejčastěji používaným nástrojem pro analýzu psychotropních léků. Selektivní monitorování reakcí (alespoň dvou) je mód doporučovaný mezinárodními autoritami (FDA, EMEA) [36] [37].

Správná LC/MS kvantifikace je ovlivněna použitím vhodného interního standardu. Metody využívající pro analýzu psychofarmak izotopově značených vnitřních standardů poskytují mírně lepší preciznost oproti metodám s chemickými analogy. Izotopově značené standardy jsou obecně doporučovány FDA. Navzdory obtížnější komerční dostupnosti a vysokým cenám jsou v rutinních klinických laboratořích izotopově značené standardy používány.

Psychiatrickí pacienti jsou převážně léčeni kombinacemi psychofarmak nebo kombinací psychofarmak a jiných léků. Většina publikovaných metod se soustředila na analýzu jednoho [9, 13-15, 20-27, 32, 38-41] nebo méně jak sedmi psychofarmak [16, 17, 28-31, 33, 42-44]. U některých aplikací se psychotropní látky analyzují v kombinaci s jinými léčivy [4, 18]. Několik článků se také zaměřuje na stanovení většího počtu psychofarmak společně s jejich metabolity [3, 5, 6, 10, 11, 19, 34, 35, 45]. Obecně z hlediska účinku léčiv je třeba znát jeho metabolity a jejich účinek na organismus, což platí i pro psychofarmaka. Stanovení těchto metabolitů v biologických matricích může být výhodné i z klinického pohledu (lepší dávkování psychofarmak).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem doktorské práce byl vývoj metod pro stanovení vybraných psychofarmak v séru a identifikaci metabolitů agomelatinu spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Stanoveny byly tři cíle:

1. Rozšířit možnosti terapeutického monitorování léčiv na Oddělení klinické farmakologie FN Ostrava o možnost stanovení deseti psychofarmak v séru pacientů. Úkolem bylo vyvinout, validovat a zavést do praktického použití metodu pro stanovení vybraných antidepresiv (agomelatin, vilazodon) a antipsychotik (amisulprid, asenapin, aripiprazol a jeho metabolit, iloperidon, melperon, ziprasidon, zotepin).
2. Doplnit stávající metodu o další látky: haloperidol, flufenazin a flupentixol a použít tuto validovanou metodu v klinické laboratoři pro analýzu patientských vzorků séra.
3. Vyvinout a aplikovat metodu pro screening a identifikaci metabolitů agomelatinu po inkubaci lidských hepatocytů, v patientských vzorcích krve a moči.

S řešením cílů souvisí následující publikační výstupy:

P. Šišťík, R. Uřinová, H. Brozmannová, I. Kacířová, P. Šilhán, K. Lemr, *Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication*, Biomed Chromatogr, 30 (2016) 217-224. V seznamu literatury cit [46]

P. Šišťík, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednář, *Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015)*, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 160 (2016) 39-53. V seznamu literatury cit. [47].

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Současné stanovení deseti psychofarmak pro klinickou praxi

Pro terapeutické monitorování psychofarmak je nezbytná analytická metoda pro jejich stanovení. Metoda by obecně měla splňovat několik podmínek: měla by být rychlá, měla by 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 tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Metoda umožňuje stanovení agomelatinu, amisulpridu, aripiprazolu, dehydroaripiprazolu, asenapinu, iloperidonu, melperonu, vilazodonu, ziprasidonu a zotepinu.

Validace metody

Metoda byla validována podle kritérií US Food and Drug Administration [36] na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, preciznost, přesnost, matricový efekt.

Selektivita

Deset sér vzorků z krevního centra FN Ostrava od neužívajících dárců bylo analyzováno na možnou interferenci psychofarmaky a také s IS. Navíc k ověření možných interferencí s jinými běžnými léky (nejčastěji antiepileptiky) a / nebo jejich metabolity byly použity vzorky séra běžně dostupné v laboratoři z dřívějších rutinních TDM analýz. Vzorky obsahovaly antiepileptika stanovovaná na oddělení klinické farmakologie (lamotrigin, fenobarbital, rivotril, fenytoin, karbamazepin a jeho metabolit, levetiracetam). Uvedená antiepileptika však neovlivnila stanovené koncentrace psychofarmak.

Přesnost a preciznost

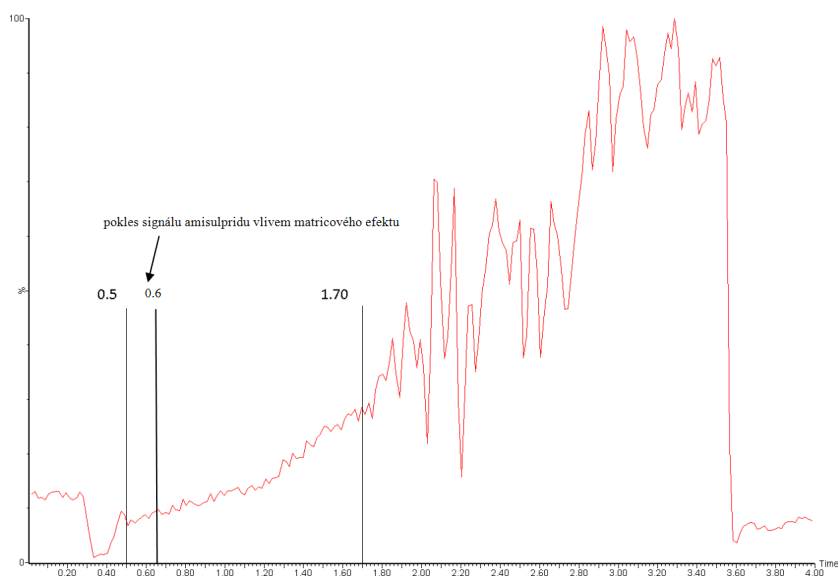
Standardní roztoky byly připraveny desetkrát pro hodnocení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti a měřeny buď ve stejný den anebo v různé dny. Ze získaných dat byla vypočítána směrodatná odchylka, průměr, recovery a variační koeficient pro každou látku a to analýzou tří koncentračních úrovní.

Přesnost a preciznost za podmínek opakovatelnosti byly pro validaci metody pro stanovení 10 psychofarmak ze séra v rozmezí 87,9-102,0% a 0,4-5,5%. Za podmínek mezilehlé preciznosti byla zjištěna přesnost v rozmezí 96,0-114,1%, zatímco preciznost byla mezi 0,6 a 8,2%. Preciznost a přesnost splňují doporučení US Food and Drug Administration [36].

Matricový efekt

Matricové efekty za použití ESI+ ionizace byly pro všechny analyty zanedbatelné v retenčním čase mezi 0,5 a 1,7 minuty (viz obr. 1). Pro amisulprid (látka s nejmenší retencí) byla hodnota matricového efektu 9% pro nízkou koncentraci a 13,8% pro vysokou koncentraci. Obě hodnoty matricového efektu jsou v přijatelném rozmezí.

Obr. 1: Post-kolonové zavádění roztoků psychofarmak při nástřiku séra bez sledovaných látek (po PPT bylo nastříknuto 10 μ l séra na kolonu). Na obrázku je označeno rozmezí s negativním matricovým efektem. Převzato z citace [46] a upraveno.



Analýza pacientských vzorků

Vilazodon, asenapin a iloperidon nebyly podávány pacientům, a proto se neobjevily ve studovaných reálných vzorcích. Všechny ostatní léky byly nalezeny ve vzorcích od pacientů psychiatrického oddělení Fakultní nemocnice v Ostravě. Vzorky krve byly odebírány před podáním léčiva a následně byly analyzovány koncentrace psychofarmak.

Po odběru byly patientské vzorky okamžitě odeslány do laboratoře, centrifugovány a analyzovány ve stejný den. Údaje jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Terapeutické rozmezí léků [1], poločas eliminace ($t_{1/2}$), počet vzorků a rozmezí naměřených koncentrací (ng/ml). Převzato z citace [46]

Látka	Terapeutické rozmezí (ng/ml)	$t_{1/2}$ (h)	Počet vzorků	Rozsah naměřených koncentrací (mg/ml)
Agomelatin	7-300	1-2	10	<0,25
Amisulprid	100-320	12-20	6	21,0-300,8
Aripiprazol	150-500	60-80	10	71,8-260,5
Asenapin	2-5	24	-	-
Dehydroaripiprazol	-	-	10	2,5-81,2
Iloperidon	5-10	18-33	-	-
Melperon	30-100	4-6	12	2,2-92,2
Vilazodon	28-63	-	-	-
Ziprasidon	50-200	6	8	15,2-154,9
Zotepin	10-150	13-16	6	7,4-27,2

Rozsah naměřených koncentrací se u amisupridu a aripiprazolu pohybovala v terapeutickém rozmezí. U melperonu, ziprasidonu a zotepinu byla u některých pacientů naměřena nižší hladina než se doporučuje pro terapeutické rozmezí.

4.2. Stanovení haloperidolu, flufenazinu a flupentixolu v séru

Podmínky HPLC separace a nastavení hmotnostně spektrometrické detekce bylo cíleno tak, aby bylo totožné s dříve publikovanými metodami [48] [46] pro stanovení psychofarmak v lidském séru. Snahou bylo převzít původní podmínky, aby bylo možné v jedné analýze stanovovat všechna psychofarmaka (jak starší, tak nově registrovaná léčiva), které jsou předmětem zájmu v naší klinické laboratoři. Analýza vzorků haloperidolu (HLP), flufenazinu (FLF) a flupentixolu (FLP) probíhala za použití ESI+ iontového zdroje. Nastavení iontového zdroje bylo totožné s již dříve publikovanými pracemi [48] [46]. SRM přechody a nastavení CV a CE pro HLP, FLF a FLP jsou uvedeny v tabulce č. 2. Parametry chromatografické kolony a složení mobilní fáze bylo pro FLF a FLP totožné jako pro stanovení vybraných psychofarmak. Haloperidol vykazoval nízkou odezvu a proto bylo změněno složení mobilní fáze obsahující kys. mravenčí ve vodě a v methanolu.

Metoda byla validována na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, preciznost, přesnost, matricový efekt.

Validace metody

Linearita

Linearita byla ověřena 9 bodovou kalibrační křivkou pro FLF a FLP a 11 bodovou kalibrační křivkou pro HLP. Hodnoty korelačního koeficientu v rozsahu 0,156 – 100 ng/ml byly 0,999 pro FLF a 0,998 pro FLP. Pro haloperidol s linearitou 0,078-100 ng/ml byl korelační koeficient 0,999.

Preciznost a přesnost

Preciznost za podmínek opakovatelnosti byla pro FLF a FLP v rozmezí 2,6% až 11,3%. Preciznost za podmínek mezilehlé preciznosti byla pro obě psychofarmaka v rozmezí 7,6% až 12,2%. Celková výtěžnost pro oba analyty byla mezi 87,2% a 101,1%. Preciznost za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti se pro HLP pohybovala v rozmezí od 1,4% do 4,5%. Celková výtěžnost (recovery) byla pro HLP v rozmezí 97,3% až 100%.

Přesnost metody byla pro HLP, FLF a FLP v rozmezí přijatelného intervalu $\pm 15\%$ (recovery v rozmezí 85-115%) pro všechny testované koncentrace za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti.

Analýza patientských vzorků

Tabulka 2 sumarizuje počet patientských vzorků za období 2015-2017. V dnešní době lze pozorovat trend nárůstu analýz na odd. klinické farmakologie FN Ostrava.

Tab. 2: Počet patientských vzorků séra pro stanovení HLP, FLF a FLP na oddělení klinické farmakologie za období 2015-2017

látka	Terapeutické rozmezí (ng/ml)	Počet patientských vzorků (za období 2015-2017)
Flufenazin	1 - 10	27
Flupentixol	1 - 10	71
Haloperidol	1 - 10	75

Závěr k současné analýze deseti psychofarmak a analýze flufenazinu, flupentixolu a haloperidolu

Úprava vzorku séra metodou srážením proteinů pomocí směsi acetonitril-methanol (40:60, v/v) za přítomnosti síranu zinečnatého byla dostačující. Tento postup je časově méně náročný a levnější než extrakce kapalina-kapalina nebo extrakce na pevné fázi.

Složky matrice mohou být problémem při analýze biologických vzorků. Jejich koeluce s analyty může výrazně ovlivnit odezvu. Mezi složky, které mohou interferovat nebo významně ovlivnit analýzu, patří lipidy a fosfolipidy, aditiva nebo polymery obsažené v plastových odběrových systémech [49] [11] [20]. Heparin nebo K₃EDTA, které se používají jako antikoagulanty při odběru vzorků krve, mohou také způsobit matricový efekt, a proto je vhodnější upřednostnit odběrové zkumavky bez jakýchkoli přísad [50].

Stabilita vzorků je důležitým parametrem pro přepravu vzorků séra z jiných laboratoří či nemocnic. Na základě našich zkušeností a experimentů jiných autorů [51] [52] [3] [25] [27, 34], byla stabilita vzorků po dobu delší než 24 hodin dostatečná, což je vhodná doba pro dodání a analýzu vzorků v klinické laboratoři.

Po validaci byly metody použity pro analýzu psychofarmak ve vzorcích séra dle požadavků psychiatrického oddělení Fakultní nemocnice Ostrava.

4.3. Identifikace metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů

Bylo provedeno deset izolací lidských hepatocytů od desíti multiorgánových dárců. Je nutné zmínit, že analýza médií a celulárního obsahu hepatocytů inkubovaných s agomelatinem probíhala na kolonách připojených k různým hmotnostním spektrometrům (viz tabulka 3).

Chromatografické chování agomelatinu a jeho metabolitů na různých stacionárních fázích

Optimalizace chromatografických parametrů je klíčová pro separaci a detekci izomerních metabolitů agomelatinu pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro tento účel byly otestovány různé typy HPLC a UHPLC chromatografických kolon. Testované HPLC kolony: Zorbax Eclipse XDB-Phenyl, Zorbax Eclipse XDB C₁₈ a testované UHPLC kolony: Waters BEH C₈, Waters BEH C₁₈, Waters BEH Phe.

Zachování vynikající opakovatelnosti retenčních časů je zásadní pro cílený i necílený analytický přístup [53]. Retenční časy agomelatinu a jeho metabolitů se směrodatnými odchylkami na různých kolonách jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3: Retenční časy agomelatinu a jeho metabolitů na různých kolonách. Analýza vzorků lidských hepatocytů pomocí hmotnostních spektrometrů Q-Tof Premier^b a Synapt G2-S^c. (SD byla určena z 10 izolací).

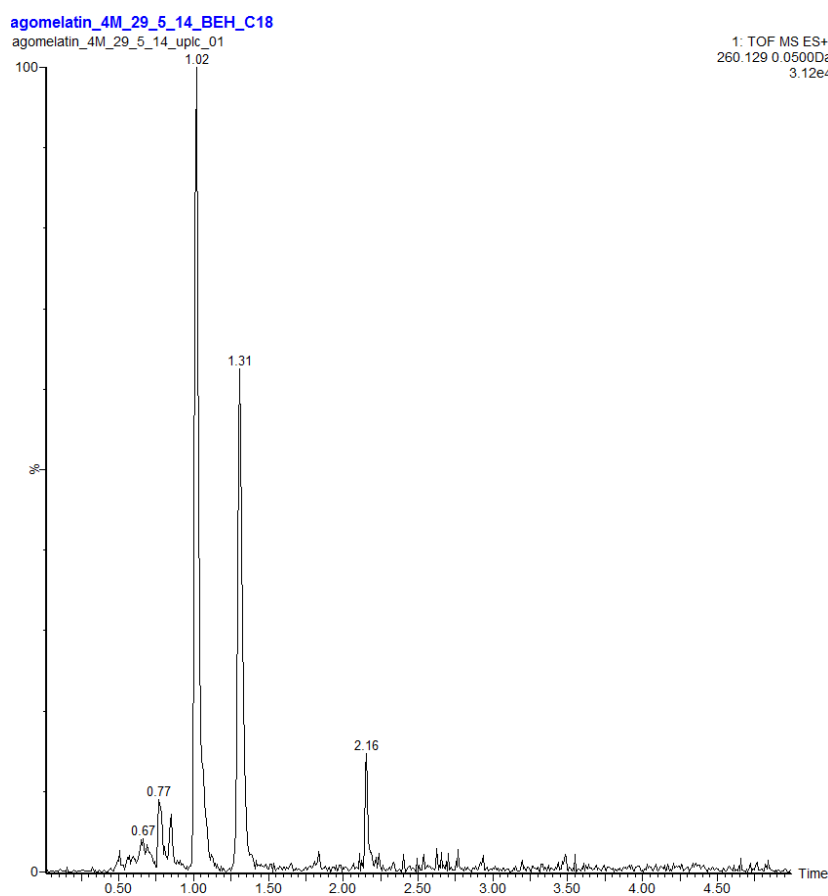
výchozí látka / metabolity	Retenční čas (min) ± SD.				
	Zorbax Eclipse XDB- Phenyl ^b	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ ^c	BEH C ₁₈ ^c	BEH C ₈ ^c	BEH-Phe ^c
agomelatin	5,91 ± 0,10	5,98 ± 0,01	2,82 ± 0,07	2,74 ± 0,02	2,72 ± 0,004
OH-Met. 1	1,39 ± 0,11	1,25 ± 0,01	1,02 ± 0,02	1,05 ± 0,01	1,07 ± 0,004
OH-Met. 2	1,69 ± 0,13	1,61 ± 0,02	1,31 ± 0,004	1,35 ± 0,01	1,39 ± 0,005
OH-Met. 3	4,22 ± 0,07	4,13 ± 0,01	2,17 ± 0,02	2,16 ± 0,01	2,16 ± 0,01
(-CH ₃) Met. 4	2,11 ± 0,25	1,92 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,63 ± 0,03	1,64 ± 0,01

Kolony HPLC a UHPLC vykazovaly vynikající opakovatelnost s výjimkou kolony Zorbax Phenyl, která vykazovala vyšší směrodatné odchylky. Termodynamika a kinetika chromatografické separace agomelatinu a jeho metabolitů na HPLC koloně Zorbax Eclipse

XDB Phenyl a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ byla při použití složení mobilní fáze a nastaveném gradientu mobilní fáze velmi podobná, což je patrné z tvaru píků a retenčních časů. Velmi podobně probíhala eluce také na UHPLC kolonách a typ stacionární fáze za výše uvedených experimentálních podmínek neměl výrazný vliv na změny retence agomelatinu a jeho metabolitů.

Volba typu kolony a stacionární fáze pro analýzu biologických vzorků krve a moči byla provedena na základě porovnání separace metabolitů agomelatinu na jednotlivých kolonách uvedených v tabulce 3. Na obrázku 2 je chromatogram hydroxy metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů separovaných na koloně BEH C₁₈. Kolona Waters BEH C₁₈ (150 x 2.1, 1.7 μm) vykazovala adekvátní retenci a nejlepší separaci z testovaných kolon všech identifikovaných metabolitů agomelatinu a proto byla vybrána pro následnou identifikaci metabolitů agomelatinu z biologické matrice.

Obr. 2: Chromatogram hydroxy metabolitů agomelatinu ve vzorku média inkubovaných s agomelatinem a separovaných na koloně BEH C₁₈.

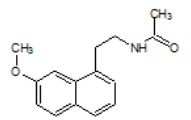
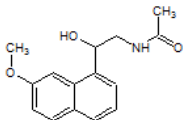
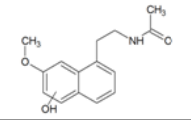
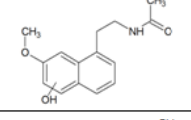
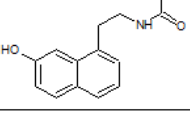


Identifikace metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů

Identifikace analytů ve vzorcích je založena na informaci o přesné hmotnosti odpovídajících iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro správnost (Δ ppm \leq 3). V kombinaci s elementárním složením iontů, je rovněž generována řada extrahovaných iontových chromatogramů (XICs), které jsou porovnávány mezi kontrolou a vzorkem.

Po inkubaci agomelatinu s lidskými hepatocyty byly pomocí MS^E analýzy detekovány tři metabolity vznikající procesem hydroxylace (Met.1-Met.3) a jeden procesem demethylace 7-desmethyl (Met.4). Metabolity byly označeny podle jejich retenčního pořadí. Tabulka 4 ukazuje předpokládané struktury metabolitů, jejich přesné molekulové hmotnosti, sumární vzorec, vypočtené hodnoty m/z, kritérium správnosti (v ppm) a ionty vznikající při kolizi indukované disociaci těchto metabolitů. Podrobná fragmentace agomelatinu a jeho metabolitů byla již publikována [54]. Po optimalizaci kolizní energie pro získání reprodukovatelných spekter metabolitů agomelatinu byla kolizní spektra čtyř metabolitů pořízena při kolizní energii 30 eV (nastavení Synaptu G2) a porovnána s agomelatinem a jinými metabolity.

Tab. 4: Základní hmotnostně-spektrometrické charakteristiky metabolitů identifikovaných po kultivaci agomelatinu s lidskými hepatocyty

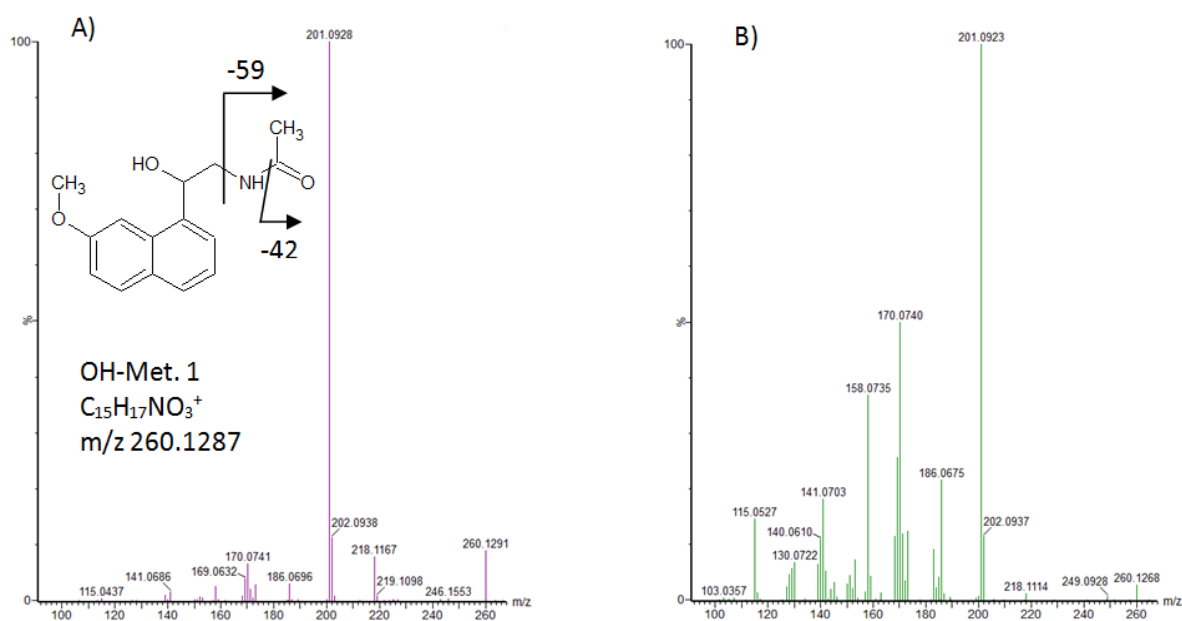
látka	Sumární vzorec	Předpokládaná struktura	MW	vypočtená hodnota m/z	ppm	MS ^E m/z (Da)
agomelatin	C ₁₅ H ₁₇ NO ₂		243,30 10	244,133 8	1.1	185,0989; 170,0739; 153,0762; 202,1149
OH-Met. 1	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,12 08	260,128 7	0.2	201,0916; 186,0681; 170,0732
OH-Met. 2	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,30 04	260,128 7	0.6	201,0891; 218,1270; 170,0720
OH-Met. 3	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃		259,30 04	260,128 7	0.9	201,0924; 218,1277; 170,0719
(-CH ₃) Met. 4	C ₁₄ H ₁₅ NO ₂		229,27 44	230,118 1	1.7	212,0992; 188,0981; 171,0788; 153,0678

Dřívější práce potvrdily existenci čtyř hydroxy metabolitů agomelatinu. V naší práci byly detekovány pouze tři. Polohy hydroxylových skupin je možné obecně dohledat pomocí specifických fragmentových iontů v MS/MS spektrech. Pokud je hydroxy skupina navázána na aromatický kruh, je v řadě případů určení její pozice problematické z důvodu nepřítomnosti charakteristických fragmentů v hmotnostním spektru. Z tandemových hmotnostních spekter nebylo možné jednoznačně určit, ve které poloze aromatického kruhu je hydroxy skupina vázána (Met. 2 a Met. 3). Naopak z MS/MS spekter u hydroxy metabolitu 1 byla pozice této skupiny identifikována.

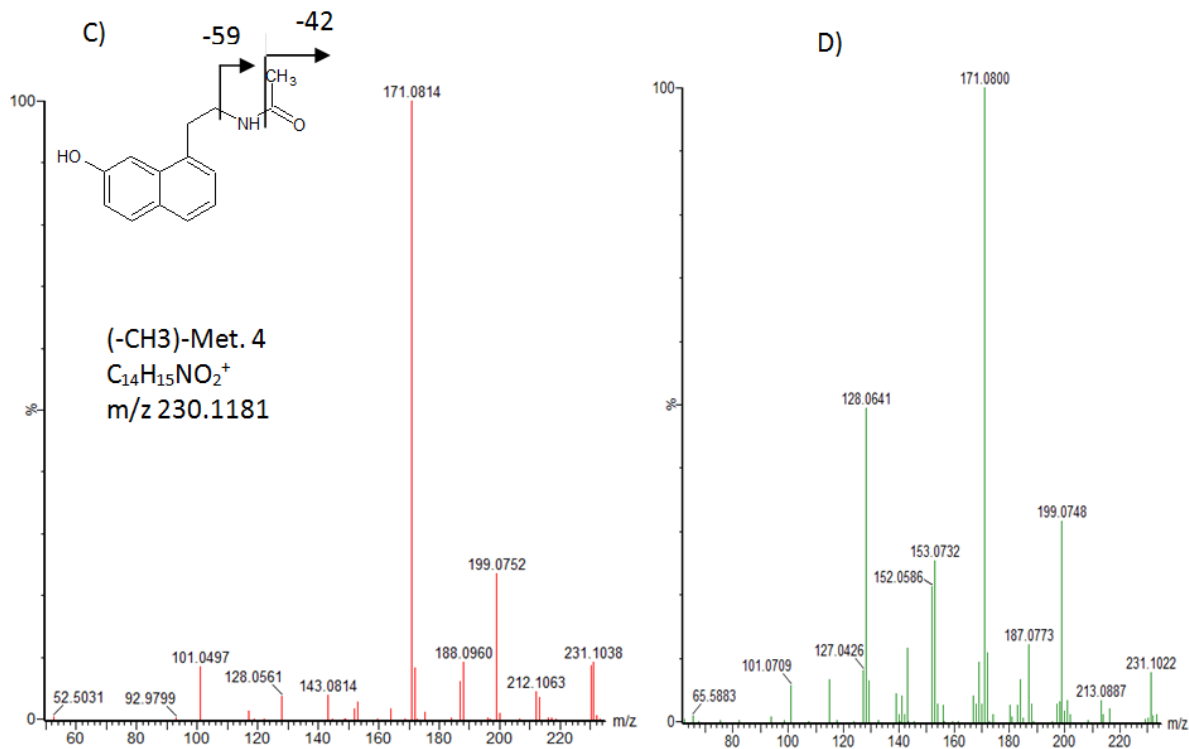
V hmotnostním spektru s nízkou kolizní energií byl pozorován protonizovaný ion a případné fragmenty vznikající při procesech v iontovém zdroji, v hmotnostních spektrech s vyšší kolizní energií potom fragmenty vzniklé kolizí indukovanou disociací. Mezi hlavní pozorované procesy v případě obou typů metabolitů byla neutrální ztráta C_2H_2O (ztráta 42) a C_2H_5NO (ztráta 59) (obrázek 3), kdy k fragmentaci dochází na chemické vazbě N-C. Pro OH-Met.1 metabolit následuje další fragmentace v podobě radikálového štěpení methylové skupiny, kdy byla pozorována fragmentace z $C_{13}H_{13}O_2^+$ (přesná hmota m/z 201,091) na $C_{12}H_{10}O_2^{*+}$ (přesná hmota m/z 186, 0675). Velmi důležitým iontem v kolizním spektru OH-Met.1 metabolitu je ion m/z 158,0735, ($C_{11}H_{10}O^{*+}$, Δppm 1.9), protonizovaný radikál methoxynaftalenu, potvrzující biotransformaci (hydroxylaci) mimo aromatickou část molekuly agomelatinu.

OH-Met. 1 byl eluován na různých kolonách v rozmezí retenčních časů od 1,02 do 1,39 min. a jeho protonovaná molekula poskytovala signál při m/z 260,1287 ($C_{15}H_{17}NO_3^+$). UHPLC-MS a UHPLC-MS^E záznamy hydroxy-metabolitu OH-Met. 1 jsou znázorněny na obr. 3A a 3B. Fragmentace tohoto metabolitu je uvedena ve schématu na obrázku 4.

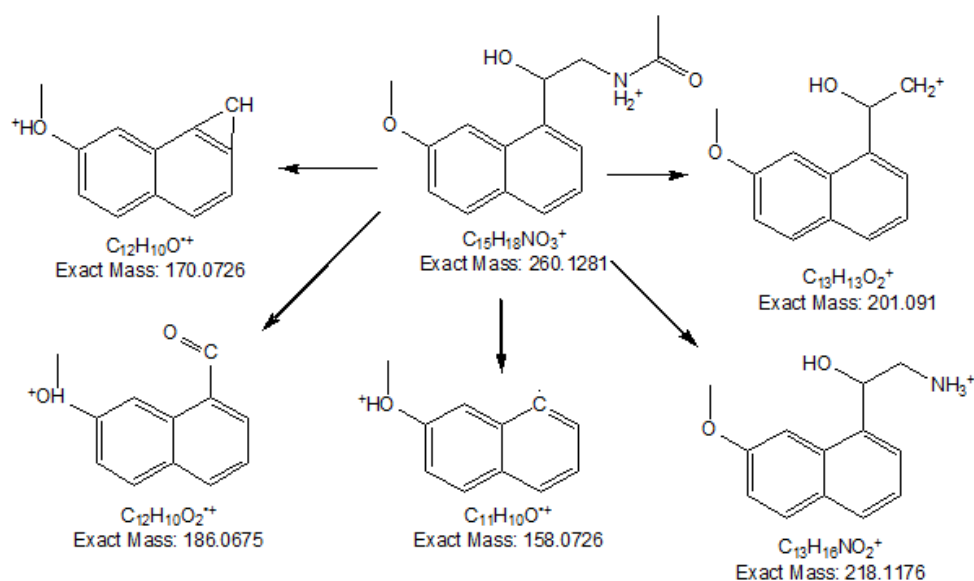
Obr. 3: A) UPLC-TOF-MS a B) UPLC-TOF-MS^E hydroxy metabolitu OH-Met. 1



Obr. 3: C) UPLC-TOF-MS a D) UPLC-TOF-MS^E desmethyl metabolitu (-CH₃)-Met. 4



Obr. 4: Fragmentační cesty OH-Met. 1 AGO (Rt = 2,26 min)



Met. 4 byl detekován na různých chromatografických kolonách v rozmezí retenčních časů od 1,55 do 2,11 min. Jeho protonovaná molekula ($C_{14}H_{15}NO_2^+$) při m/z 230,1181 vykazovala nepřítomnost methylové skupiny ve struktuře. V MS^E spektru můžeme vidět fragment při m/z 171,0810 vzniklý ztrátou C_2H_5NO . Ionty m/z 188,1075; 212,1075 vzniklé ztrátou C_2H_2O a vody vznikají termální fragmentací ve zdroji (obr. 3C a 3D). Ve spektru můžeme pozorovat také ion při m/z 153,0704, jehož elementární složení odpovídá $C_{12}H_9^+$.

U hydroxy metabolitů 2 a 3 nelze v hmotnostním spektru rozlišit pozici chemické vazby hydroxy skupiny na plně konjugovaný skelet. Retenční čas hydroxy metabolitu 2 na různých kolonách se pohyboval v rozmezí od 1,31 do 1,69 minuty. Pro hydroxy metabolit 3 byly retenční časy v rozmezí od 2,16 do 4,22 minuty.

Tabulka 4 shrnuje hmotnostně-spektrometrické výsledky metabolitů agomelatinu identifikovaných ve vzorcích lidských hepatocytů. Tabulka podává informace o sumárním vzorci, předpokládané struktuře, molekulové hmotnosti, vypočtené hodnotě m/z , chybě v ppm a fragmentech vznikajících při MS^E experimentech pro jednotlivé metabolity. Vypočtená hodnota m/z uvedená v tabulce byla kalkulována programem: kalkulátor molekulové hmotnosti, který je součástí programu: MassLynx (verze 4.1, Waters). Experimentální naměřené hodnoty nejsou uvedeny v tabulce, ale tato hodnota se svou chybou nelišila o více jak 2 ppm. Chybu v ppm oproti vypočtené hodnotě pro agomelatin a jeho metabolity můžete vidět v tabulce 4. Tabulka také shrnuje fragmentaci agomelatinu a jeho metabolitů při MS^E experimentech.

Metabolity agomelatinu byly dříve publikovány [55] [54] a uvedená data jen potvrzují správnost nalezených metabolitů. Játra, která byla použita pro identifikaci metabolitů agomelatinu pocházela z 10 izolací. V současné medicíně je snahou játra v rámci dárcovství orgánů použít pro pacienty. Přestože viabilita hepatocytů byla ověřena, metabolická transformace na nich probíhala podprůměrně. Podařilo se nám identifikovat 3 hydroxy metabolity agomelatinu a 1 desmethyl metabolit, ale dřívější práce publikovala 4 hydroxy metabolity agomelatinu nalezených ve vzorcích lidských jaterních mikrozomech [54].

4.4. Identifikace metabolitů agomelatinu z patientských vzorků krve a moči

Pro analýzu biologických vzorků byly odebírány vzorky krve a moči v různých časech od 10 dárců ve FN Ostrava (2 muži a 8 žen).

Pro testování extrakčních výtěžků byl v rámci vývoje metody agomelatin přidán do moče (50 ng/m) a následně byly otestovány celkem čtyři postupy úpravy vzorků moči. Pro vzorky moče byl testován jeden PPT postup úpravy a tři SPE extrakce na různých SPE kolonkách. SPE extrakce pomocí Strata C18-U (postup 1) a Strata X-Drug B (postup 2) byly z důvodu nízkého extrakčního výtěžku vyřazeny z experimentu s reálnými vzorky moči. Pro identifikaci metabolitů agomelatinu v moči byl nakonec použit postup využívající enzymatickou hydrolýzu s následnou SPE extrakcí (SPE pomocí B-Gone kolonek) (postup 3) a postup používající PPT moči (postup 4). Pacientské vzorky séra byly pro analýzu zpracovány PPT postupem krve.

Jako jeden z možných postupů úpravy moči pro identifikaci metabolitů se využívá enzymatická hydrolýza (pomocí β -glukuronidázy) a je doporučovaná výrobcem (Phenomenex) a také často využíván na toxikologickém oddělení FN Ostrava pro uvolnění látek z vazby na kyselině glukuronové. To byl také důvod, proč jsme tento experiment zařadili mezi postupy úpravy vzorků moče.

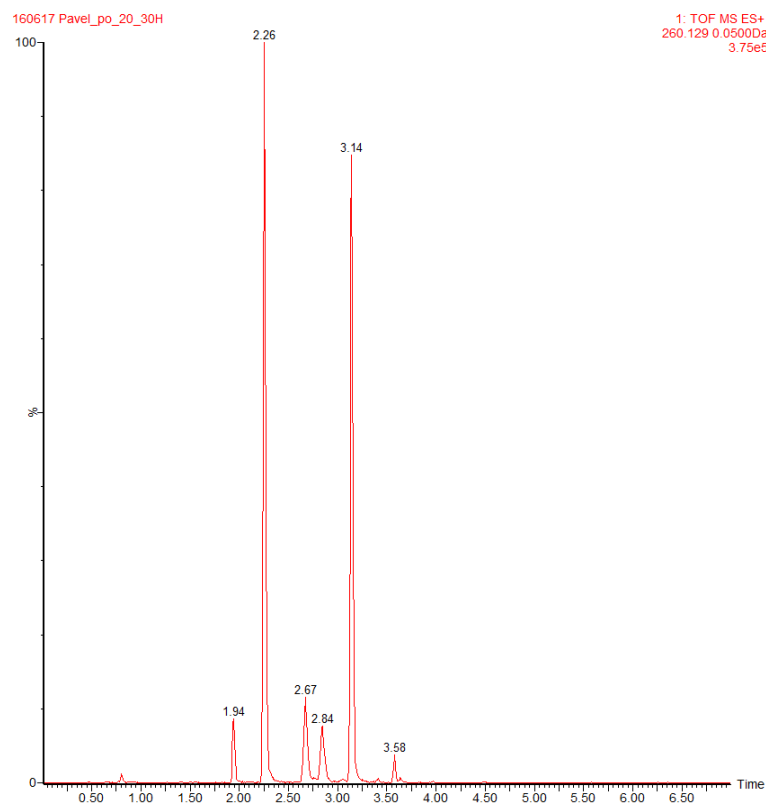
Metoda úpravy vzorku séra nebyla testována během vývoje metody a postup byl převzat na základě našich zkušeností s analýzou agomelatinu ve vzorcích séra na oddělení klinické farmakologie ve FN Ostrava. Jako metoda úpravy vzorku byl vybrán pro analýzu moči postup číslo 2, 3 a 4 (viz experimentální část), protože při postupu č.1 agomelatin nevykazoval prakticky žádnou retenci na SPE kolonkách Strata C18-U za uvedených podmínek.

Složení mobilní fáze bylo zvoleno na základě naší zkušenosti s analýzou agomelatinu a dalších psychofarmak na oddělení klinické farmakologie v Ostravě. Stejně složení mobilní fáze bylo použito pro identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů.

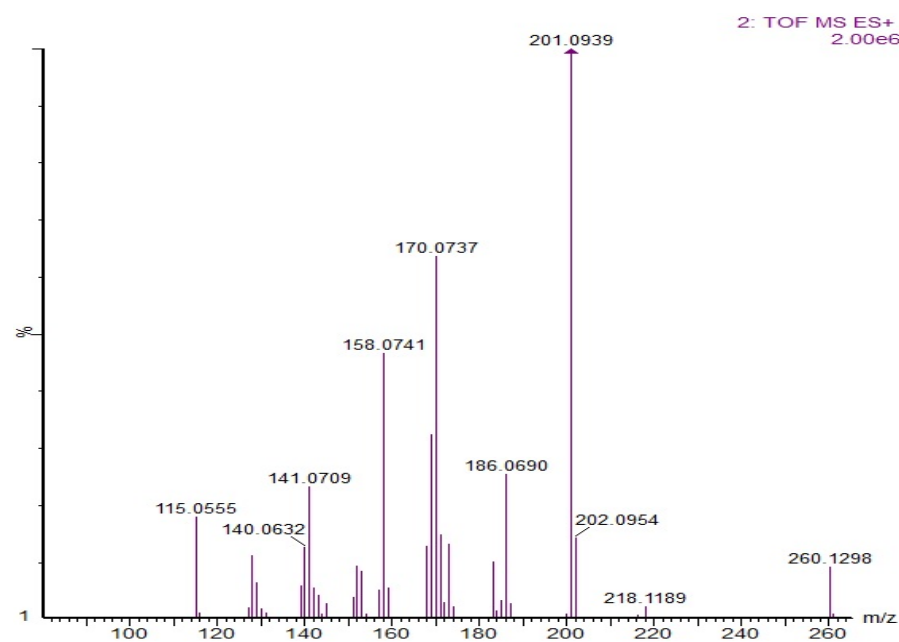
Dřívější práce identifikovaly čtyři hydroxy metabolity agomelatinu v lidských mikrozomech a jeden metabolit agomelatinu v myši moči a fekáliích. V naší studii jsme identifikovali celkem sedm hydroxymetabolitů agomelatinu. Potvrzení konkrétní pozice hydroxylace by vyžadovalo další experimenty (např. syntéza standardů a porovnání hmotnostních spekter). Retenční časy těchto hydroxy metabolitů agomelatinu (v min) jsou:

1,94; 2,26; 2,67; 2,84; 3,14; 3,58; 3,64 (obr. 5). Obrázek 6 zahrnuje MS^E spektrum hydroxy metabolitu agomelatinu (Rt= 2.26).

Obr. 5: UHPLC/MS separace hydroxy metabolitů agomelatinu ze vzorků lidské moči připravované postupem 3 (enzymatická hydrolyza).



Obr. 6: MS^E spektrum hydroxy metabolitu agomelatinu (Rt= 2.26)



Enzymatickou hydrolyzou moči pomocí β -glukuronidázy (postupem 3) došlo k uvolnění hydroxy metabolitů agomelatinu z vazby na kyselinu glukuronovou. To se projevilo navýšením ploch píků hydroxy metabolitů ve srovnání s postupem úpravy moči, který využíval její srážení (postup 4).

Podle našeho zjištění se jedná o první práci popisující metabolity agomelatinu ze vzorků krve a moči. Na vyhodnocení dat se v současnosti stále pracuje.

Závěr k identifikaci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů a v patientských vzorcích krve a moči

Ve vzorcích lidských hepatocytů byly nalezeny tři hydroxy metabolity a jeden desmethyl metabolit agomelatinu. Dříve publikované práce však potvrdily čtyři hydroxy metabolity agomelatinu [54, 55]. Pro získání validních výsledků se provedlo celkově deset izolací. Identifikace metabolitů byla provedena pomocí dvou hmotnostních spektrometrů (Q-ToF Premier a Synapt G2-S) připojených k UHPLC systémům. Pro separaci metabolitů agomelatinu byly testovány dvě HPLC a tři UHPLC kolony. Z pohledu rychlosti a účinnosti chromatografické separace, byla pro analýzu patientských vzorků vybrána UHPLC kolona BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m). Identifikace metabolitů agomelatinu byla provedena na základě přesných hmot a fragmentačních spekter. U hydroxy metabolit 2 a hydroxy metabolitu 3 agomelatinu identifikované ve vzorcích lidských hepatocytů nebylo možné určit polohu hydroxylové skupiny (vazba hydroxy skupiny na aromatické jádro ve srovnání s hydroxy metabolitem 1).

Pro identifikaci metabolitů agomelatinu byly použity vzorky krve a moči od 10 pacientů odebíraných v různých časových intervalech. Analýza probíhala na Synapt G2-S připojeného k UHPLC systému. Pro separaci byla použita kolona, která se osvědčila v předchozí analýze metabolitů agomelatinu ze vzorků lidských hepatocytů. Celkově byly testovány čtyři procesy úpravy vzorku pro analýzu moči. Byla testována moč s přídavkem agomelatinu (50 ng/ml). Porovnáním extrakčních výtěžků agomelatinu byl jako vhodný způsob extrakce metabolitů z moči vybrán postup 3 a postup 4. Postup 1 a 2 byl vyloučen z důvodu nízkého extrakčního výtěžku (menší jak 30%). Postup úpravy vzorku séra byl vybrán na základě našich předchozích zkušeností s analýzou agomelatinu v patientských vzorcích ve FN Ostrava. V současnosti ještě dále pracujeme na vyhodnocení nalezených dat. Oproti dříve publikovaným pracím jsme však našli sedm hydroxy metabolitů agomelatinu v patientských vzorcích moče. Dále byla provedena analýza hlavních komponent k nalezení potenciálních statisticky významných odlišností v metabolitech agomelatinu mezi skupinami

mužů a žen. Byl pozorován trend preference tvorby hydroxyderivátů ve skupině mužů (pouze 2 pacienti z celkově 10 pacientů). Významněji probíhala demethylace agomelatinu u žen. Jedná se však o pozorovaný trend a s určitostí to nelze tvrdit bez ověření na podstatně větší skupině dobrovolníků. Tato studie dále pokračuje.

5. ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byly v rámci předložené práce studovány a validovány tři jednoduché a rychlé metody pro stanovení 13 psychofarmak z patientských vzorků séra. Metody se liší a pomocí první lze stanovit deset psychofarmak, druhá umožňuje sledovat dvě (flufenazin a flupentixol) a třetí jedno léčivo (haloperidol). Metody byly validovány podle FDA kritérií a následně byly použity pro analýzu těchto látek na oddělení klinické farmakologie FN Ostrava. Vyvinuté metody doplňují dřívější metodu klinické analýzy o nové látky a přispěly k rozšíření možností oddělení klinické farmakologie, kde se v současnosti stanovuje okolo 40 psychoaktivních látek. Stanovovaná psychofarmaka se v reálných vzorcích pohybují v koncentracích řádově desítek až stovek ng/ml, což je z pohledu citlivosti trojitého kvadrupólu dostatečné. Jednoduché a rychlé úpravy vzorků s rychlými chromatografickými analýzami dělají tyto metody vhodné pro rutinní klinické laboratoře.

Z pohledu farmakologického je důležitá identifikace metabolitů léčiv, v předložené práci metabolitů agomelatinu ve vzorcích lidských hepatocytů. Studována byla separace na různých kolonách, zkoumány vzorky lidských hepatocytů, ale rovněž reálných patientských vzorků krve a moči (práce zaměřené na metabolity agomelatinu v krvi a moči nebyly v literatuře nalezeny). V moči bylo zjištěno například sedm monohydroxy metabolitů. Získaná data naznačují, že počet metabolitů může být významně vyšší, než dosud v literatuře uváděný počet [55] [54]. Celkový počet metabolitů agomelatinu ve vzorcích moči lze odhadnout na 60-80, ale je nutné konstatovat, že je nezbytné ověření dalšími experimenty.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] C. Hiemke, P. Baumann, N. Bergemann, A. Conca, O. Dietmaier, K. Egberts, M. Fric, M. Gerlach, C. Greiner, G. Grunder, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, E. Jaquenoud Sirot, H. Kirchherr, G. Laux, U.C. Lutz, T. Messer, M.J. Muller, B. Pfuhlmann, B. Rambeck, P. Riederer, B. Schoppek, J. Stingl, M. Uhr, S. Ulrich, R. Waschgler, G. Zernig, AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011, *Pharmacopsychiatry*, 44 (2011) 195-235.
- [2] E. Llorente Fernandez, L. Pares, I. Ajuria, F. Bandres, B. Castanyer, F. Campos, C. Farre, L. Pou, J.M. Queralto, J. To-Figueras, State of the art in therapeutic drug monitoring, *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 48 (2010) 437-446.
- [3] L. Patteet, K.E. Maudens, B. Sabbe, M. Morrens, M. De Doncker, H. Neels, High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, 429 (2014) 51-58.
- [4] M. Di Rago, E. Saar, L.N. Rodda, S. Turfus, A. Kotsos, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC–MS/MS, *Forensic Science International*, 243 (2014) 35-43.
- [5] D.S. Fisher, S.J. Partridge, S.A. Handley, L. Couchman, P.E. Morgan, R.J. Flanagan, LC-MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood, *Forensic Sci Int*, 229 (2013) 145-150.
- [6] A.E. Steuer, M. Poetzsch, M. Koenig, E. Tingelhoff, S.N. Staeheli, A.T. Roemmelt, T. Kraemer, Comparison of conventional liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood, *Journal of Chromatography A*, 1381 (2015) 87-100.
- [7] E.J.J. Berm, J. Paardekooper, E. Brummel-Mulder, E. Hak, B. Wilffert, J.G. Maring, A simple dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of the tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline, imipramine, clomipramine, and their active metabolites using LC-MS/MS, *Talanta*, 134 (2015) 165-172.
- [8] L. Patteet, K.E. Maudens, C.P. Stove, W.E. Lambert, M. Morrens, B. Sabbe, H. Neels, The use of dried blood spots for quantification of 15 antipsychotics and 7 metabolites with ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry, *Drug Test Anal*, (2014).
- [9] U. Bhaumik, A. Ghosh, A.K. Sarkar, A. Bose, P.S. Selvan, P. Sengupta, U.S. Chakraborty, D. Ghosh, T.K. Pal, Determination of ranolazine in human plasma by LC-MS/MS and its application in bioequivalence study, *J Pharm Biomed Anal*, 48 (2008) 1404-1410.
- [10] G. Vecchione, B. Casetta, A. Chiapparino, A. Bertolino, M. Tomaiuolo, F. Cappucci, R. Gatta, M. Margaglione, E. Grandone, A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 67-68 (2012) 104-113.
- [11] N. Ansermot, M. Brawand-Amey, A. Kottelat, C.B. Eap, Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J Chromatogr A*, 1292 (2013) 160-172.
- [12] T.S. Koo, S.J. Kim, J. Lee, D.J. Ha, M. Baek, H. Moon, Quantification of lurasidone, an atypical antipsychotic drug, in rat plasma with high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 25 (2011) 1389-1394.

- [13] Y.Q. Lei, W.Y. Zhang, H.D. Li, M.A. Yan, R.H. Zhu, Determination of Ziprasidone by UPLC-MS-MS and Its Application to a Pharmacokinetic Study of Chinese Schizophrenics, *Chromatographia*, 72 (2010) 975-979.
- [14] F. Liang, A.V. Terry, M.G. Bartlett, Determination of aripiprazole in rat plasma and brain using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 26 (2012) 1325-1332.
- [15] D.P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P.S. Shrivastav, SPE-UPLC-MS/MS method for sensitive and rapid determination of aripiprazole in human plasma to support a bioequivalence study, *J Chromatogr B*, 925 (2013) 20-25.
- [16] T. de Boer, E. Meulman, H. Meijering, J. Wieling, P. Dogterom, H. Lass, Quantification of asenapine and three metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with automated solid-phase extraction: application to a phase I clinical trial with asenapine in healthy male subjects, *Biomedical Chromatography*, 26 (2012) 156-165.
- [17] T. de Boer, E. Meulman, H. Meijering, J. Wieling, P. Dogterom, H. Lass, Development and validation of automated SPE-HPLC-MS/MS methods for the quantification of asenapine, a new antipsychotic agent, and its two major metabolites in human urine, *Biomed Chromatogr*, 26 (2012) 1461-1463.
- [18] V. Viette, D. Guillarme, R. Mylonas, Y. Mauron, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part I), *Clinical Biochemistry*, 44 (2011) 32-44.
- [19] E. Choong, S. Rudaz, A. Kottelat, D. Guillarme, J.L. Veuthey, C.B. Eap, Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS, *J Pharm Biomed Anal*, 50 (2009) 1000-1008.
- [20] O.Y. Al-Dirbashi, H.Y. Aboul-Enein, A. Al-Odaib, M. Jacob, M.S. Rashed, Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of ziprasidone in human plasma, *Biomedical Chromatography*, 20 (2006) 365-368.
- [21] M.H. Gschwend, P. Arnold, J. Ring, W. Martin, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831 (2006) 132-139.
- [22] M. Aravagiri, S.R. Marder, B. Pollock, Determination of ziprasidone in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level determination in schizophrenia patients, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 847 (2007) 237-244.
- [23] B. Dasandi, S. Shah, Shivprakash, Development and validation of a high throughput and robust LC-MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of diltiazem and its two metabolites in human plasma: Application to a bioequivalence study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 791-798.
- [24] S.N. Lin, L. Lamm, T.F. Newton, M.S. Reid, D.E. Moody, R.L. Foltz, A Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Aripiprazole in Human Plasma, *J Anal Toxicol*, 33 (2009) 237-242.
- [25] S.R. Patil, K.K. Nerurkar, A.M. Kalamkar, V. Pukale, K.V. Mangaonkar, S.G. Pingale, Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *J Mass Spectrom*, 47 (2012) 23-28.
- [26] X.L. Wang, D. Zhang, M. Liu, H.N. Zhao, A.H. Du, L.J. Meng, H.C. Liu, LC-MS/MS method for the determination of agomelatine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 218-222.

- [27] W.W. Sui, X.J. Yang, W.H. Yu, Y. Jin, X.Y. Luan, X.J. Wang, H.Y. Xu, A validated LC-MS/MS method for the rapid quantification of vilazodone in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98 (2014) 228-234.
- [28] M. Song, X. Xu, T. Hang, A. Wen, L. Yang, Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in human plasma, *Anal Biochem*, 385 (2009) 270-277.
- [29] V.B. Ambavaram, V. Nandigam, M. Vemula, G.R. Kalluru, M. Gajulapalle, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of urapidil and aripiprazole in human plasma and its application to human pharmacokinetic study, *Biomed Chromatogr*, (2013).
- [30] M.M. Jia, J. Li, X.M. He, M.Z. Liu, Y. Zhou, Y. Fan, W.Y. Li, Simultaneous determination of iloperidone and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B*, 928 (2013) 52-57.
- [31] A.V.B. Reddy, N. Venugopal, G. Madhavi, Simultaneous determination of asenapine and valproic acid in human plasma using LC-MS/MS: Application of the method to support pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3 (2013) 394-401.
- [32] K. Nozaki, I. Osaka, H. Kawasaki, R. Arakawa, Application of on-line electrochemistry/electrospray/tandem mass spectrometry to a quantification method for the antipsychotic drug zotepine in human serum, *Anal Sci*, 25 (2009) 1197-1201.
- [33] M. Caloro, L. Lionetto, I. Cuomo, A. Simonetti, D. Pucci, S. De Persis, B. Casolla, G.D. Kotzalidis, A. Sciarretta, S. De Filippis, M. Simmaco, P. Girardi, An improved simple LC-MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite, *J Pharm Biomed Anal*, 62 (2012) 135-139.
- [34] H. Kirchherr, W.N. Kuhn-Velten, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 843 (2006) 100-113.
- [35] J. Hasselstrom, Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879 (2011) 123-128.
- [36] <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>, staženo 13.7.2015
- [37] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, staženo 9.3.2017.
- [38] G. Zhang, A.V. Terry, Jr., M.G. Bartlett, Determination of the lipophilic antipsychotic drug ziprasidone in rat plasma and brain tissue using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 22 (2008) 770-778.
- [39] Y.J. Chae, T.S. Koo, K.R. Lee, A Sensitive and Selective LC-MS Method for the Determination of Lurasidone in Rat Plasma, Bile, and Urine, *Chromatographia*, 75 (2012) 1117-1128.
- [40] S. Jamalapuram, P.K. Vuppala, C. Mesangeau, C.R. McCurdy, B.A. Avery, Determination of a highly selective mixed-affinity sigma receptor ligand, in rat plasma by ultra performance liquid chromatography mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 891-892 (2012) 1-6.
- [41] L.-l. Zeng, L.-l. Sun, Q. Zou, F. Zhou, P. Wei, P.-k. Ouyang, Bioavailability comparison of a new form of vilazodone XVII to IV in beagles using liquid chromatography/mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 1738-1743.

- [42] G. Zhang, A.V. Terry, M.G. Bartlett, Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue, *J Chromatogr B*, 858 (2007) 276-281.
- [43] G. Zhang, A.V. Terry, Jr., M.G. Bartlett, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21 (2007) 920-928.
- [44] K.Y. Li, Y.G. Zhou, H.Y. Ren, F. Wang, B.K. Zhang, H.D. Li, Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in in vitro samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 850 (2007) 581-585.
- [45] M.C. Sampedro, N. Unceta, A. Gomez-Caballero, L.F. Callado, B. Morentin, M.A. Goicolea, J.J. Meana, R.J. Barrio, Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest, *Forensic Science International*, 219 (2012).
- [46] P. Sistik, R. Urinovska, H. Brozmanova, I. Kacirova, P. Silhan, K. Lemr, Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication, *Biomedical chromatography : BMC*, 30 (2016) 217-224.
- [47] P. Sistik, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednar, Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015), *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160 (2016) 39-53.
- [48] R. Urinovska, H. Brozmanova, P. Sistik, P. Silhan, I. Kacirova, K. Lemr, M. Grundmann, 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.
- [49] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 2198-2207.
- [50] C. Chin, Z.P. Zhang, H.T. Karnes, A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine, *J Pharm Biomed Anal*, 35 (2004) 1149-1167.
- [51] D.S. Fisher, S.J. Partridge, S.A. Handley, R.J. Flanagan, Stability of some atypical antipsychotics in human plasma, haemolysed whole blood, oral fluid, human serum and calf serum, *Forensic Science International*, 229 (2013) 151-156.
- [52] E. Saar, D. Gerostamoulos, O.H. Drummer, J. Beyer, Assessment of the stability of 30 antipsychotic drugs in stored blood specimens, *Forensic Sci Int*, 215 (2012) 152-158.
- [53] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, R.S. Plumb, I.D. Wilson, Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87 (2014) 12-25.
- [54] X. Liu, Y.-F. Lu, X. Guan, M. Zhao, J. Wang, F. Li, Characterizing novel metabolic pathways of melatonin receptor agonist agomelatine using metabolomic approaches, *Biochemical Pharmacology*, 109 (2016) 70-82.
- [55] J.J. Bogaards, E.M. Hissink, M. Briggs, R. Weaver, R. Jochemsen, P. Jackson, M. Bertrand, P.J. van Bladeren, Prediction of interindividual variation in drug plasma levels in vivo from individual enzyme kinetic data and physiologically based pharmacokinetic modeling, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 12 (2000) 117-124.

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Pavel Šišťík
Adresa: Mánesova 468, Frýdek-Místek, 738 01
Email: pavel.sistik@fno.cz

VZDĚLÁNÍ

- 2010 – současnost
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie
- 2007 – 06/2009
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.
- 2002 – 08/2007
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.

STÁŽE

- 2008
Odborná stáž v laboratořích dědičných metablických poruch, FN Olomouc. Získání praktických zkušeností z elektroforézy
- 2009
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie.
- 2013
Vědeckovýzkumná stáž – aplikační demo laboratoř společnosti Waters, Vídeň. Vedoucí: Dr. Jan Bohuslávek. Vývoj metody pro stanovení pesticidů a herbicidů z povrchových vod a půd metodou UPLC-MS/MS.

- 2014
Vědeckovýzkumná stáž – aplikační demo laboratoř společnosti Waters, Vídeň.
Vedoucí: Dr. Jan Bohuslávek. Vývoj metody pro stanovení polárních pesticidů pomocí UPLC-MS/MS.

ZAMĚSTNÁNÍ

- 1/2018-doposud
Waters, aplikační specialista se zaměřením na hmotnostní spektrometrii
Hietzinger Hauptstraße 145, 1130 Wien, Rakousko
- 10/2009-12/2017
Fakultní nemocnice Ostrava, oddělení klinické farmakologie,
17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba
- 9/2012-12/2017
Lékařská fakulta Ostravské univerzity, odborný asistent
Syllabova 19, 703 00 Ostrava-jih

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- výuka předmětů pro 2. ročníku Bc. oboru Zdravotní laborant:
 - Instrumentální metody v biochemii (21 vyučovacích hodin přednášek + 21 vyučovacích hodin cvičení za semestr)
 - analytické metody v biochemii (21 vyučovacích hodin přednášek + 21 vyučovacích hodin cvičení za semestr)
- výuka předmětu pro 1. ročník Bc. oboru Zdravotní laborant:
 - základní výpočty a techniky ve zdravotnické laboratoři (7 vyučovacích hodin přednášek + 14 vyučovacích hodin cvičení za semestr)

PROJEKTY

Název projektu: Modernizace výuky předmětů v oblasti laboratorní diagnostiky pro studenty všeobecného lékařství a oboru zdravotní laborant, financován LF Ostravské univerzity

PUBLIKACE

- Urinovska, H. Brozmanova, **P. Sistik**, P. Silhan, I. Kacirova, K. Lemr, M. Grundmann, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 907 (2012) 101-107.
- **P. Sistik**, R. Urinovska, H. Brozmanova, I. Kacirova, P. Silhan, K. Lemr, Fast simultaneous LC/MS/MS determination of 10 active compounds in human serum for therapeutic drug monitoring in psychiatric medication, *Biomedical chromatography: BMC*, 30 (2016) 217-224.
- **P. Sistik**, M. Turjap, A.M. Iordache, H.M. Saldanha, K. Lemr, P. Bednar, Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015), *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 160 (2016) 39-53.
- H. Brozmanova, I. Kacirova, R. Urinovska, **P. Sistik**, M. Grundmann, New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal functions and comparison with results of polarization fluoroimmunoassay in light of varying creatinine concentrations, *Clin Chim Acta*, 469 (2017) 136-143.

PUBLIKOVANÁ ABSTRAKTA

- Uřinová R., Brozmannová H., **Šistik 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

- Urinovska R., Brozmanova H., **Sistik P.**, Silhan P., Kacirova I., Grundmann M. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs, IATDMCT European Conference therapeutic drug monitoring, Personalised Pharmacotherapy, 28.-30.8. 2014, Praha, ISBN 978-80-260-6794-8
- **Šišťik P.**, Uřinová R., Brozmanová H., Analýza nových psychofarmak ve FN Ostrava metodou kapalinové chromatografie, 7. Česko-slovenská conference klinické farmakologie, 11.-12.9. 2015 Olomouc
- Uřinová R., **Šišťik P.**, Brozmanová H., Metoda kapalinové chromatografie pro monitorování hladin methotrexatu, 7. Česko-slovenská conference klinické farmakologie, 11.-12.9. 2015 Olomouc
- Urinovska R., **Sistik P.** Development of Liquid Chromatography Method Coupled With Mass Spectrometry for Analysis of the Vitamins in Human Serum, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017. e 85
- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Lemr K.. Quantitative Analysis of Fluphenazine and Flupentixol in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017, e 85
- Brozmanova H., Urinovska R., **Sistik P.**, Kacirova I., Grundmann M., Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Gentamicin Concentrations and Comparison with Two Immunoassay Methods (Chemiluminiscent Assay a Polarization Fluoroimmunoassay), *Clinical Therapeutics*, 39, 8, 2017, e86
- Urinovska R., **Sistik P.**, Bacakova T., Brozmanova H., Kacirova I. Simultaneous Determination of Donepezil and its Two Metabolites in Human Serum by Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017, e83
- Urinovska R., **Sistik P.**, matlak P., Brozmanova H., Kacirova I. Validation Of LC-MS/MS Method for Monitoring of Methotrexate and its Metabolite 7-Hydroxymethotrexate Levels in Human Serum, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017, e83
- Brozmanova H., Kacirova I., Urinovska R., **Sistik P.**, Grundmann M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Tdm of Vancomycin and Comparison with Results of Polarization Fluoroimmunoassay, *Clinical Therapeutics*, 39, 2017, e86,

- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Lemr K. Routine Therapeutic Drug Monitoring of Haloperidol in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Clinical Therapeutics*, 39, Issue 8, Supplement, August 2017, e84-e85
- Brozmanova H., Urinovska R., **Sistik P.**, Kacirova I., Grundmann M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Azole Antifungals in Human Serum, *Clinical Therapeutics*, 39, Issue 8, Supplement, August 2017, e85-e86

PŘEDNÁŠKY/POUSTRY NA KONFERENCÍCH

- Uřinová R., Brozmannová H., **Šišťík 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
- Uřinová R., **Šišťík P.**, Brozmannová H., Kacířová I., Šilhán P., Grundmann M., Terapeutické monitorování psychofarmak, Biolab 2014, 25-27.5.2014, Ostrava
- **Sistik P.**, Urinovska R., Brozmanova H., Kacirova I., Silhan P., Lemr K. A fully validated method for therapeutic drug monitoring of two antidepressants, seven antipsychotics and one main metabolite in human serum by precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, IATDMCT European Conference therapeutic drug monitoring, Personalised Pharmacotherapy, 28.-30.8. 2014, Praha, ISBN 978-80-260-6794-8
- H.Brozmannová, R.Uřinová, **P.Šišťík**, I.Kacířová, M.Grundmann; Stanovení sérové koncentrace gentamicinu metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a porovnání se dvěma imunoanalytickými metodami
- R.Uřinová, **P.Šišťík**, T.Bačáková, H.Brozmannová , I.Kacířová; , Vývoj metody na stanovení sérové koncentrace donepezilu a jeho dvou metabolitů metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí, 18. Česká konference klinické farmakologie, 22. Česká konference TDM, 20. Česká konference durg, Plzeň 8.-9.9.2016

- **P. Šišťík**, R. Uřinová, K. Lemr; Stanovení vitamínů v séru spojením kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou, 18. Česká konference klinické farmakologie, 22. Česká konference TDM, 20. Česká konference durg, Plzeň 8.-9.9.2016