

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



MULTI ANALÝZA VYBRANÝCH LÉČIV V SÉRU POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Kateřina Krátká

Vedoucí práce:

Mgr. Pavel Šišťík, PhD.

Konzultant práce:

RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2023

Žádost o sběr dat pro studijní účely

Jméno a příjmení, titul:	Kateřina Krátká, Bc.
Kontaktní údaje:	Vnitřní 729, Orlová 735 14
Jste zaměstnancem FNO?	<input type="checkbox"/> ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Pokud ano, na jakém pracovišti ve FNO pracujete: _____
Pokud jste zaměstnancem jiné organizace než FNO, uveďte jaké?	_____
Název vysoké / vyšší odborné školy	<input type="checkbox"/> Ostravská univerzita <input checked="" type="checkbox"/> Jiná vysoká / vyšší odborná škola Adresa jiné vysoké / vyšší odborné školy: _____ 17. listopadu 1192, 779 00 Olomouc
Název fakulty:	Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Název studovaného oboru:	Analytická chemie
Ročník studia:	II. ročník
Sběr dat je za účelem	<input type="checkbox"/> bakalářské práce <input type="checkbox"/> absolventské práce <input checked="" type="checkbox"/> diplomové práce <input type="checkbox"/> rigorózní práce <input type="checkbox"/> dizertační práce <input type="checkbox"/> jiný typ práce: upřesnění jiného typu práce: _____
Název práce:	Multi analýza vybraných léčiv v séru pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
Jméno a příjmení vedoucího odborné práce:	Mgr. Pavel Šišťák, PhD.
Název pracoviště FNO, kde má být sběr dat proveden:	Oddělení klinické farmakologie
Termín zahájení a ukončení sběru dat:	1.3.2023 - 30.6.2023 22.09.2021-30.06.2023

Datum: 23.02.2023

podpis žadatele

podpis vedoucího odborné práce nebo ved. katedry

Vyjádření FNO: souhlasím nesouhlasím

Datum: 3.3.2023

FAKULTNÍ NEMOCNICE OSTRAVA
PhDr. Andrea Polanská, MBA
náměstkyňka ředitelky pro ošetrovatelskou péči
podpis a razítko

Povinné přílohy žádosti:

1. Potvrzení o studiu

23-02-2023

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
STUDIJNÍ ODDĚLENÍ
ř. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc

datum, razítko a podpis studijního oddělení

2. Stručná anotace odborné práce

3. V případě dotazníkového šetření vzor dotazníku, v případě rozhovoru návrh otázek

Žádost potvrzenou studentem i vedoucím odborné práce zašlete ve 2 originálech pro nelékařské obory na sekretariát náměstkyně pro ošetrovatelskou péči, nebo pro lékařské obory na sekretariát náměstka pro léčebnou péči, Fakultní nemocnice Ostrava (Domov sester), 17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velmi poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Mgr. Pavlu Šíštíkoví, Ph.D a konzultantce paní RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D za jejich odborné vedení práce, mnoho cenných rad a postřehů, trpělivost a zejména značnou podporu v průběhu celého zpracování této práce.

Dále bych taktéž chtěla poděkovat všem pracovníkům na oddělení klinické farmakologie Fakultní nemocnice Ostrava za jejich přátelský a vstřícný přístup a za mnoho užitečných rad.

A v neposlední řadě taktéž vedení katedry analytické chemie Univerzity Palackého za možnost vypracovávání této diplomové práce s externím vedoucím v Ostravské fakultní nemocnici.

Bibliografická identifikace

Autor	Bc. Kateřina Krátká
Název práce	Multi analýza vybraných léčiv v séru pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Mgr. Pavel Šišťík, PhD.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt Tato práce je zaměřena na vývoj metody pro stanovení více druhů léčiv v patientských vzorcích séra pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Cílem bylo stanovení vybraných antipsychotik, antiepileptik, antimykotik, antivirotik, benzodiazepinů, bronchodilatancí a cytostatik v jedné analýze z patientských vzorků séra. Během vývoje metody byly optimalizovány podmínky kapalinové chromatografie a hmotnostního detektoru. Testovány byly také různé postupy úpravy vzorků séra. Vyvinutá metoda byla validována dle vybraných kritérií FDA.

Klíčová slova	kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, analýza léčiv, sérum
Počet stran	176
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Bc. Kateřina Krátká
Title	Multi analysis of selected drugs in human serum by liquid chromatography with mass spectrometry detection
Type of thesis	Master's
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	Mgr. Pavel Šišťík, PhD.
The year of presentation	2023

Abstract This work is focused on the development of a method for the determination of multiple types of drugs in patient serum samples by liquid chromatography with mass spectrometry detection. The aim of this thesis was focused to determine selected antipsychotics, antiepileptics, antifungals, antivirals, benzodiazepines, bronchodilators, and cytostatics in one analysis from patient serum samples. During the method development, the conditions of liquid chromatography and mass detector were optimized, and various procedures for serum sample preparation were tested. The developed method was validated according to selected FDA criteria.

Keywords	liquid chromatography, tandem mass spectrometry, drug analysis, serum
Number of pages	176
Language	Czech

Obsah

Seznam zkratk	9
Seznam tabulek	12
Seznam obrázků	17
Seznam grafů	17
Seznam chromatogramů	17
Úvod	18
Teoretická část	19
1 Terapeuticky významná farmaka	19
1.1 Psychofarmaka	19
1.1.1 Antidepresiva	19
1.1.1.1 Dělení antidepresiv	20
1.1.1.1.1 Tricyklické antidepresiva (TCA)	20
1.1.1.1.2 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)	21
1.1.1.1.3 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI)	21
1.1.1.1.4 Inhibitory monoaminoxidázy (I-MAO)	21
1.1.1.1.5 Atypická antidepresiva	21
1.1.1.2 Struktura vybraných antidepresiv	21
1.1.2 Antipsychotika	23
1.1.2.1 Dělení antipsychotik	24
1.1.2.2 Struktura vybraných antipsychotik	24
1.2 Antiepileptika	26
1.2.1 Dělení antiepileptik	27
1.2.2 Struktura vybraných antiepileptik	27
1.3 Antiarytmika	29
1.3.1 Dělení Antiarytmik	30
1.3.2 Struktura vybraných antiarytmik	30
1.4 Anxiolytika	30
1.4.1 Struktura vybraných anxiolytik	31
1.5 Antimykotika	32
1.5.1 Dělení antimykotik	33
1.5.2 Struktura vybraných antimykotik	33
1.6 Bronchodilatancia	34
1.6.1 Dělení bronchodilatancí	34
1.6.2 Struktura vybraného bronchodilatancia	35

1.7	Cytostatika	35
1.7.1	Struktura vybraných cytostatik	35
1.8	Antivirotika	36
1.8.1	Struktura vybraných antivirotik	36
2	Terapeutické monitorování léčiv (TDM)	38
2.1	TDM vybraných farmak	38
3	Úprava biologické matrice	42
4	Chromatografické metody	47
4.1	Stacionární fáze v kapalinové chromatografii	47
5	Hmotnostní spektrometrie	50
5.1	Trojité kvadrupól	50
5.1.1	Skenovací módy	50
6	Validace	53
Experimentální část		54
7	Nastavení kapalinového chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro simultánní analýzu léčiv ze séra	54
7.1	Přístroj	54
7.2	Chemikálie	54
7.3	Koncentrace zásobních standardů (STD)	54
7.4	Koncentrace vnitřních standardů	56
7.5	Seznam komerčních QC kontrol	59
7.6	Ostatní materiál	64
7.7	Kolona	64
7.8	Mobilní fáze	64
7.9	Nastavení chromatografických podmínek	64
7.10	Nastavení MS	65
7.11	Příprava zásobních roztoků pro validaci	65
7.11.1	Kalibrační standardy	67
7.11.2	Kalibrační standardy	67
7.12	Úprava vzorku	69
8	Výsledky a diskuze	70
8.1	Nastavení parametrů	70
8.1.1	Nastavení MRM přechodů	70
8.1.2	Nastavení hmotnostního analyzátoru	74
8.1.2.1	Experiment napětí na kapiláře	75
8.1.2.2	Experiment nastavení desolvatační teploty	79

8.1.2.3	Experiment nastavení průtoku plynu.....	82
8.1.3	Nastavení podmínek kapalinové chromatografie.....	89
8.1.3.1	Výběr mobilní fáze.....	89
8.1.3.2	Nastavení gradientu.....	94
8.1.3.3	Testování kolon.....	97
8.2	Testování úpravy vzorků.....	106
8.3	Validace metody.....	112
8.3.1	Selktivita.....	112
8.3.2	Linearita.....	112
8.3.3	Opakovatelnost a mezilehlá preciznost.....	113
8.3.3.1	Opakovatelnost.....	114
8.3.3.2	Mezilehlá preciznost.....	130
8.4	Analýza komerčních QC kontrol a reálných patientských vzorků.....	146
	Závěr.....	148
	Seznam literatury.....	151
	Seznam literatury – tabulka.....	153
	Seznam příloh.....	155

Seznam zkratek

7-OH-MTX	7-hydroxy methotrexát
8-OH-ACV	8-hydroxy acyklovir
ACV	acyklovir
AGPN	Německá skupina Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Syndrom získaného imunitního selhání
ALPRA	Alprazolam
AM	Amiodaron
AMS	Amisulprid
ARP	Aripiprazol
BRIV	Brivaracetát
BROMA	Bromazepam
CE	Kolizní energie
CID	Kolizí indukovaná disociace
CIT	Citalopram
CLB	Klobazam
CLO	Klonazepam
CLZ	Klozapin
CMZ	Karbamazepin
CV	Napětí na kónu
d-AM	Desmethyl amiodaron
d-ARP	Dehydro aripiprazol
d-CIT	N-desmethyl citalopram
d-CLZ	N-desmethyl klozapin
DDD	Definovaná denní dávka
DIA	Diazepam
DLLME	Disperzní mikro extrakce z kapaliny do kapaliny
d-OLA	N-desmethyl olanzapin
DPH	Fenytoin
d-RIS	9-hydroxy risperidon
d-SER	N-desmethyl sertralin
d-VEN	O-desmethyl venlafaxin
EPO-CMZ	Epoxykarbamazepin
ESI	Elektrosprej
ESLI-CMZ	Eslikarbamazepin
FDA	Food and Drug Administration
FLF	Flufenazin
FLP	Flupentixol
FLUKO	Flukonazol
FNO	Fakultní nemocnice Ostrava
GABA	Kyselina Gama-aminomáslená
GABAP	Gabapentin

HLP	Haloperidol
I-MAO	Inhibitory monoaminoxidázy
IS	Vnitřní standard
ITRA	Itrakonazol
LAKO	Lakosamid
LAM	Lamotrigin
LEV	Levetiracetam
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
LOQ	Limit kvantifikace
LORA	Lorazepam
MF	Mobilní fáze
MRM	Multi reaction monitoring
MRT	Mirtazapin
MTX	Methotrexát
N-CLB	N-desmethyl klobazam
N-DIA	N-desmethyl diazepam
OLA	Olanzapin
PAR	Paroxetin
PB	Fenobarbital
PD	Primidon
PERAM	Perampanel
POSA	Posakonazol
PPT	Proteinová precipitace
PREGA	Pregabalin
QUE	Kvetiapin
RIS	Risperidon
RUFIN	Rufinamid
SER	Sertralin
SF	Stacionární fáze
SLE	Extrakce pevná fáze-kapalina
SNRI	Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SPE	Extrakce na pevné fázi
SSRI	Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
STD	Standard
STIRI	Stiripentol
SUL	Sulthiam
TCA	Tricyklická antidepresiva
TDM	Terapeutické monitorování léčiv
TEO	Theofylin
TOP	Topiramát
TRZ	Trazodon
VEN	Venlafaxin
VORI	Vorikonazol
VPA	Kyselina valproová
VTX	Vortioxetin

ZIP
ZNA

Ziprasidon
Zonisamid

Seznam tabulek

Tabulka 1 Seznam vybraných antidepresiv a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	20
Tabulka 2 Struktury vybraných antidepresiv. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	22
Tabulka 3 Seznam vybraných antipsychotik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	23
Tabulka 4 Struktury vybraných antidepresiv. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	24
Tabulka 5 Seznam vybraných antiepileptik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	26
Tabulka 6 Struktury vybraných antiepileptik. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	28
Tabulka 7 Seznam vybraných antiarytmik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	29
Tabulka 8 Struktury vybraných antiarytmik. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	30
Tabulka 9 Seznam vybraných anxiolytik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5], *Léčivo temerol je v české republice registrováno, nicméně se momentálně aktivně nevyskytuje na Českém trhu.	31
Tabulka 10 Struktury vybraných anxiolytik a jejich hlavních metabolitů. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	31
Tabulka 11 Seznam vybraných antimykotik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	32
Tabulka 12 Struktury vybraných antimykotik. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.	33
Tabulka 13 Vybrané bronchodilatancium a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	34
Tabulka 14 Struktura vybraného bronchodilatancia. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.	35
Tabulka 15 Vybrané cytostatikum a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	35
Tabulka 16 Struktura vybraných cytostatik. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.	35
Tabulka 17 Vybrané antivirotikum a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]	36
Tabulka 18 Struktury vybraných antivirotik. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.	37
Tabulka 19 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antidepresiv [10][11][12][13][14][15][16]. *Společné terapeutické referenční rozmezí pro dehydro aripiprazol a aripiprazol. n.u. – není uvedeno	38
Tabulka 20 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antipsychotik [10][17][19][20][21][22].	39
Tabulka 21 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antiepileptik [10][23][24][25][26], *Léčivo se neváže na proteiny	39
Tabulka 22 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antiarytmik [30]. n.u. – není uvedeno, * Společné terapeutické referenční rozmezí pro amiodaron a desmethyl amodaron	40
Tabulka 23 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných anxiolytik [9][10][27], *klonazepam může být taktéž indikován při léčbě epilepsie a má tudíž 2 referenční rozmezí [10]. V tabulce je uvedeno terapeutické rozmezí využívané k léčbě epilepsie. Pro jiné indikace je terapeutické referenční rozmezí 20-80 ng/ml.	40
Tabulka 24 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antimykotik [28][29][30], *Terapeutické referenční rozmezí pro profylaxi, a) terapeutické referenční rozmezí	

při léčbě závažné infekce je 2-6 µg/mL, b) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je 1-4 µg/mL, c) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je >1 µg/mL, d) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je >70 µg/mL, n.u. – není uvedeno.	41
Tabulka 25 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraného bronchodilatancia[30][31], *dospělý nekuřák, n.u. – není uvedeno	41
Tabulka 26 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných cytostatik, *u pacientů s rakovinou, pokud se jedná o zdravého jedince je udávána vaznost až 50 %	41
Tabulka 27 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antivirotik. *Hodnota acykloviru po podání je ≤ 20,3 µg/mL, n.u. – není uvedeno	41
Tabulka 28 <i>Přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných farmak z biologické matrice. SLE – extrakce pevná fáze-kapalina, LLE – extrakce kapalina-kapalina, PPT – proteinová precipitace.</i> 43	
Tabulka 29 Přehled koncentrací zásobních standarů látek (mg/mL) a jejich výrobce. Analyty byly rozpuštěny v methanolu s výjimkou Sulthiamu, který byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu	55
Tabulka 30 Přehled koncentrací vnitřních standardů(ng/mL)v methanolu ve směsném zásobním roztoku.	57
Tabulka 31 Seznam analytů a jejich vnitřních standardů použitých pro jejich kvantifikaci.	57
Tabulka 32 Seznam komerčních kontrol.....	59
Tabulka 33 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PREGA, LEV, GABAP.....	60
Tabulka 34 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – THEO, ZNA.....	60
Tabulka 35 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – BRIV, PD	60
Tabulka 36 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CMZ, RUFIN	60
Tabulka 37 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – LAKO, DPH, EPO-CMZ	60
Tabulka 38 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – STIRI, ESLI-CMZ, LAM	61
Tabulka 39 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-VEN, MRT, N-DIA.....	61
Tabulka 40 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – VEN, DIA, N-CLB	61
Tabulka 41 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-SER, d-OLA, VTX	61
Tabulka 42 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CLB, SER, ALPRA	61
Tabulka 43 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-CIT, d-CLZ, OLA.....	62
Tabulka 44 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – BROMA, CLO, LORA.....	62
Tabulka 45 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CIT, CLZ, PAR	62
Tabulka 46 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PERAM, RIS, AMS	62
Tabulka 47 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – TRZ, HLP, QUE	62

Tabulka 48 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – ZIP, d-RISP, FLF	63
Tabulka 49 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – FLP, d-ARP, ARP.....	63
Tabulka 50 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – POSA, ITRA, FLUKO	63
Tabulka 51 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – SUL, VPA.....	63
Tabulka 52 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – VORI, TOP	63
Tabulka 53 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PB .	64
Tabulka 54 Složení použité mobilní fáze C a mobilní fáze D.....	64
Tabulka 55 Nastavení chromatografických podmínek	64
Tabulka 56 Nastavení gradientu mobilní fáze C a mobilní fáze D	65
Tabulka 57 Nastavení hmotnostního analyzátoru: napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu pro elektrosprej v pozitivním módu (ESI+) a v negativní (ESI-)	65
Tabulka 58 Rozdělení látek do jednotlivých zásobních roztoků (skupin) podle terapeutického rozmezí předpokládané koncentrace v reálných vzorcích	66
Tabulka 59 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro LOW a MEDIUM koncentrační hladinu. Kalibrační standardy jsou v MeOH.....	67
Tabulka 60 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro HIGH a MEGA HIGH koncentračních hladinu. Kalibrační standardy jsou v MeOH.	68
Tabulka 61 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro VPA koncentrační hladinu. Kalibrační standardy jsou v MeOH.....	68
Tabulka 62 Nastavení hmotnostního analyzátoru dle aplikačního listu firmy Waters. [37]	71
Tabulka 63 Seznam vybraných analytů a jejich MRM přechodů společně s nastavením napětí na kónu (CV) a kolizní energií (CE), zvýrazněné přechody jsou přechody kvantifikační.	71
Tabulka 64 Vybrané parametry nastavení MS: napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu pro daný analyt. ● - Antiepileptika, ● – Bronchodilatancia, ● – Antivirotika, ● - Antipsychotika, ● - Benzodiazepiny, ● - Antimykotika, ● - Cytostatika, ● - Antiarytmika	87
Tabulka 65 Nastavení vybraných parametrů hmotnostního spektrometru.....	89
Tabulka 66 Mobilní fáze převzata z aplikačního listu firmy Waters	89
Tabulka 67 Mobilní fáze převzata z oddělení klinické farmakologie	89
Tabulka 68 Nastavení podmínek gradientu mobilní fáze	94
Tabulka 69 Přehled a specifikace použitých kolon	97
Tabulka 70 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon ..	99
Tabulka 71 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon	102
Tabulka 72 Postup přípravy vzorků séra.....	108
Tabulka 73 Porovnání průměrných ploch piků vybraných analytů pro jednotlivé postupy přípravy vzorků séra	109
Tabulka 74 Výsledky opakovatelnosti měření pregabalínu, levetiracetamu, gabapentinu. MH. – mega high, H – high, M – medium	114
Tabulka 75 Výsledky opakovatelnosti měření theofylinu, zonisamidu, brivaracetátu. MH. – mega high, H – high, M – medium	115
Tabulka 76 Výsledky opakovatelnosti měření karbamazepinu, rufinamidu, lakosamidu. MH. – mega high, H – high, M – medium	116
Tabulka 77 Výsledky opakovatelnosti měření fenytoinu, epoxykarbamazepinu, stiripentolu. MH. – mega high, H – high, M – medium	117

Tabulka 78 Výsledky opakovatelnosti měření eslikarbamazepinu, lamotriginu, O-desmethyl venlafaxinu. MH. – mega high, H – high, L – low	118
Tabulka 79 Výsledky opakovatelnosti měření mirtazapinu, N-desmethyl diazepam, venlafaxinu. L – low	119
Tabulka 80 Výsledky opakovatelnosti měření diazepam, N-desmethyl klobazamu, sulthiamu. H – high, M – medium, L – low	120
Tabulka 81 Výsledky opakovatelnosti měření N-desmethyl olanzapinu, vortioxetinu, klobazamu. L – low	121
Tabulka 82 Výsledky opakovatelnosti měření sertralinu, flukonazolu, alrpazolamu. MH. – mega high, H – high, L – low	122
Tabulka 83 Výsledky opakovatelnosti N-desmethyl citalopramu, N-desmethyl klozapinu, olanzapinu., M – medium, L – low	123
Tabulka 84 Výsledky opakovatelnosti měření citalopramu, klozapinu, perampanelu. M – medium, L – low	124
Tabulka 85 Výsledky opakovatelnosti měření topiramátu, trazodonu, haloperidolu. H – high, M – medium, L – low	125
Tabulka 86 Výsledky opakovatelnosti měření kvetiapinu, risperidonu, ziprasidonu. L – low	126
Tabulka 87 Výsledky opakovatelnosti měření 9-hydroxy risperidonu, flupentixolu, flufenazinu. L – low	127
Tabulka 88 Výsledky opakovatelnosti měření dehydro aripiprazolu, aripiprazolu, posakonazolu. M – medium, L – low	128
Tabulka 89 Výsledky opakovatelnosti měření itrakonazolu, kyseliny valproové, fenobarbitalu. VPA – kyselina valproová MH. – mega high, H – high, M – medium	129
Tabulka 90 Výsledky mezilehlé preciznosti měření pregabalínu, levetiracetamu, gabapentinu. MH. – mega high, H – high, M – medium	130
Tabulka 91 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření theofylinu, zonisamidu, brivaracetátu. MH. – mega high, H – high, M – medium	131
Tabulka 92 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření karbamazepinu, rufinamidu, lakosamidu. MH. – mega high, H – high, M – medium	132
Tabulka 93 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření fenytoinu, epoxykarbamazepinu, stiripentolu. MH. – mega high, H – high, M – medium	133
Tabulka 94 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření eslikarbamazepinu, lamotriginu, O-desmethyl venlafaxinu. MH. – mega high, H – high, L – low	134
Tabulka 95 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření mirtazapinu, N-desmethyl diazepam, venlafaxinu. L – low	135
Tabulka 96 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření diazepam, N-desmethyl klobazamu, sulthiamu. H – high, M – medium, L – low	136
Tabulka 97 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření N-desmethyl olanzapinu, vortioxetinu, klobazamu. L – low	137
Tabulka 98 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření sertralinu, flukonazolu, alrpazolamu. MH. – mega high, H – high, L – low	138
Tabulka 99 Výsledky mezilehlé preciznosti i N-desmethyl citalopramu, N-desmethyl klozapinu, olanzapinu., M – medium, L – low	139
Tabulka 100 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření citalopramu, klozapinu, perampanelu. M – medium, L – low	140
Tabulka 101 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření topiramátu, trazodonu, kvetiapinu. H – high, M – medium, L – low	141

Tabulka 102 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření haloperidolu, risperidonu, ziprasidonu. L – low.....	142
Tabulka 103 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření 9-hydroxy risperidonu, flupentixolu, flufenazinu. L– low	143
Tabulka 104 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření dehydro aripiprazolu, aripiprazolu, posakonazolu. M – medium, L – low.....	144
Tabulka 105 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření itrakonazolu, kyseliny valproové, fenobarbitalu. VPA – kyselina valproová MH. – mega high, H – high, M – medium	145

Seznam obrázků

Obrázek 1 Struktura C18 stacionární fáze	47
Obrázek 2 Struktura C8 stacionární fáze	48
Obrázek 3 Struktura fenylové stacionární fáze.....	48
Obrázek 4 Struktura bifenylové stacionární fáze.....	49
Obrázek 5 Struktura kyano stacionární fáze.....	49
Obrázek 6 Struktura diolové stacionární fáze.....	49
Obrázek 7 Schéma tandemového uspořádání hmotnostního spektrometru typu – trojitého kvadrupólu	50
Obrázek 8 Skenovací módy v tandemové hmotnostní spektrometrii. Obrázek převzat a upraven z [36]	52

Seznam grafů

Graf 1 Závislost nastavení napětí na kapiláře na odezvě analytů – graf 1 až 10.	75
Graf 2 Závislost nastavení změny desolvatační teploty na odezvě analytů – graf 11 až 19.	79
Graf 3 Závislost nastavení hodnoty průtoku plynu na odezvě analytů – graf 20 až 32.	82

Seznam chromatogramů

Chromatogram 1 TIC záznam metabolitu acyklovir za použití odlišných MF	91
Chromatogram 2 Overlay chromatogram MF aplikační list Waters (C:D).....	92
Chromatogram 3 Overlay chromatogram MF FNO (A:B)	93
Chromatogram 4 Overlay chromatogram – záznam gradientu mobilní fáze C:D.	95
Chromatogram 5 Overlay chromatogram – záznam gradientu mobilní fáze C:D.	96
Chromatogram 6 Stanovení levetiracetamu v patientském vzorku séra.....	147

Úvod

Farmakologická léčba patří v současné době mezi jednu z nejčastějších forem léčby využívanou v medicíně. Sledování změn koncentrace léků umožňuje kontrolu účinnosti léčby v průběhu času a detekovat změny v terapeutické odpovědi. Pokud pacient neodpovídá na léčbu, může být terapeutické monitorování léčiv (TDM) použito k identifikaci příčiny problému a k upravení léčby. Výsledkem TDM je tedy lepší terapeutická účinnost, minimalizace vedlejších a nežádoucích účinků a zvýšená bezpečnost pacientů. TDM přispívá k úspěšné klinické efektivitě léčby a umožňuje lékařům poskytnout pacientům přesnou a individualizovanou léčbu.

Monitorování léčiv z biologické matrice (krev) je nejčastěji prováděno pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s UV-VIS či v dnešní době s již více častou hmotnostní spektrometrií. Díky vysoké citlivosti hmotnostní spektrometrie, je tato technika schopna analyzovat léčiva vyskytující se i ve velmi nízkých koncentracích např. benzodiazepiny či některé antipsychotika, která se nacházejí v reálných vzorcích krve v koncentracích v ng/mL. Jiná skupina látek, např. některá antiepileptika mají terapeutické koncentrace překračující několik desítek $\mu\text{g/mL}$ v biologické matrici. Rozsah očekávaných koncentrací nejrůznějších skupin léčiv může být ve velmi širokém koncentračním rozmezí. Problém v analýze by mohl nastat v případě, pokud se látky liší svou strukturou, a tedy fyzikálně chemickými vlastnostmi.

Na oddělení klinické farmakologie Fakultní nemocnice Ostrava, je momentálně několik samostatných metod pro stanovení různých skupin léčiv např. antiepileptika, antidepresiva, antipsychotika, antimykotika a jiné. Každá metoda má své vlastní nastavení hmotnostního analyzátoru, vlastní nastavení chromatografie a svou unikátní přípravu vzorku.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat metodu, která by umožnila simultánní stanovení vybraných antipsychotik, antidepresiv, antimykotik, antiepileptik, benzodiazepinů, bronchodilatancí, antivirotik, benzodiazepinů a cytostatik pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií v jediné analýze za použití jedné úpravy zpracování vzorku.

Úspěšné dokončení vývoje této metod by do značné míry zjednodušil a zefektivnil analýzu patientských vzorků na oddělení klinické farmakologie, Ústavu laboratorní medicíny ve fakultní nemocnici Ostrava.

Teoretická část

1 Terapeuticky významná farmaka

Na oddělení klinické farmakologie, Ústavu laboratorní medicíny Fakultní nemocnice Ostrava (FNO) byl prováděn vývoj metody pro stanovení vybraných farmakoterapeuticky významných látek u patientských vzorků séra pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Analyty byly vybrány kvůli jejich doporučení pro jejich terapeutické monitorování a dnes jsou již na oddělení klinické farmakologie stanovovány.

1.1 Psychofarmaka

Psychofarmaka jsou léčiva používaná zejména pro léčbu různých psychických a neurologických onemocnění. Látky spadající do této skupiny jsou schopné působit na centrální nervový systém a tím ovlivňovat funkci mozku a nervového systému.

Je možné rozlišit několik typů psychofarmak, které se používají k léčbě různých poruch, mezi které patří deprese, schizofrenie, bipolární porucha, ADHD a další. Každý typ léčiva je schopen ovlivnit specifickou neurochemickou dráhu v mozku a má své vlastní použití.

Mezi nejčastěji předepisovaná psychofarmaka patří: antidepressiva, antipsychotika, anxiolytika.[1][2]

1.1.1 Antidepressiva

Jedná se o léčiva předepisovaná primárně k léčbě depresivních poruch, mohou být však také aplikována u pacientů trpících úzkostnými stavy. Odhadem 5 % dospělé populace v produktivním věku trpí tímto onemocněním. Adekvátně léčena bývá pouze 1/3 diagnostikovaných.

V České republice za posledních 20 let rapidně stoupla spotřeba těchto látek, a to z 10 denních doporučených dávek (DDD) na 66. Jedná se o extrémní nárůst, který nebyl v jiných zemích zaznamenán.

Nedostatečná, popřípadě zcela chybějící léčba může vyústit až k sebevražedným sklonům. Mortalita se při absenci léčby pohybuje okolo 50 %.

Mezi nejužívanější antidepressiva patří například sertralin, citalopram nebo také venlafaxin. [2][3][4]

Tabulka č. 1 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraných antidepresiv a jejich účinných látek dostupných v ČR (údaj k 01.02.2023).

Tabulka 1 Seznam vybraných antidepresiv a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
citalopram	citalec/citalopram +pharma/citalopram orion/citalopram teva/citalopram vitabalans/pram/seropram/citalopram aurovitas
N-desmethyl citalopram	metabolit
sertralin	adjuvin/asentra/sertivan/sertralin actavis/sertralin apotex/sertralin aurovitas/sertralin mylan/sertralin vipfarm/sertraline accord/setaloft/stimulon/zoloft
N-desmethyl sertralin	metabolit
trazodon	azoneurax/trittico ac/trittico prolong
venlafaxin	argofan/efectin er/elify/olwexya/velaxin/venlafaxin mylan
O-desmethyl venlafaxin	metabolit
vortioxetin	brintellix
mirtazapin	esprital/mirtazapin sandoz/mirtazapin mylan/mirtazapin +phrama/mirzaten oro tab/mirzaten

1.1.1.1 Dělení antidepresiv

Antidepresiva se obecně dělí do 5 hlavních kategorií, a to na:

- Tricyklická antidepresiva
- Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
- Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
- Inhibitory monoaminoxidázy
- Atypická antidepresiva

1.1.1.1.1 Tricyklické antidepresiva (TCA)

Jedná se o první generaci antidepresiv. Mechanismus účinku je založen na inhibici transportéru pro zpětné vychytávání noradrenalinu a serotoninu, což následně vede ke zvýšené koncentraci těchto látek v synaptické štěrbině.

Mezi TCA patří klomipramin nebo amitriptylin. [2][3]

1.1.1.1.2 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)

SSRI jsou léčiva tzv. první volby při terapii depresivní poruchy. Látky spadající do této kategorie jsou jedny z nejrozšířenějších a nejpoužívanějších antidepresiv. Jejich funkce je založena na inhibici transportéru zpětného vychytávání serotoninu. Tato inhibice následně vede ke zvyšování koncentrace serotoninu v synaptické štěrbině.

Mezi antidepresiva fungující na základě SSRI patří například citalopram, escitalopram nebo sertralin. [2][3]

1.1.1.1.3 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI)

Druhou nejčastěji užívanou skupinou antidepresiv jsou SNRI. Mechanismus účinku je obdobný jako u SSRI, nicméně zde navíc dochází k inhibici transportéru pro zpětné vychytávání noradrenalinu a následnému zvyšování jeho koncentrace v synaptické štěrbině.

Venlafaxin je jedním z nejčastěji užívaných SNRI antidepresiv v ČR. [2][3]

1.1.1.1.4 Inhibitory monoaminoxidázy (I-MAO)

Jedná se o unikátní druh antidepresiv, které na rozdíl od TCA, SSRI nebo SNRI blokují funkci enzymů zodpovědných za biodegradaci monoaminů (serotonin, noradrenalin aj.), čímž zvyšují jejich koncentraci.

Do této skupiny léčiv spadá například tyramin, rasagilin nebo moklobemid. [2][3]

1.1.1.1.5 Atypická antidepresiva

Skupina antidepresiv, která se svým funkčním mechanismem nedá zařadit do žádné ze 4 předchozích kategorií. Látky zařazené do této skupiny jsou schopny ovlivňovat hladiny dopaminu, serotoninu nebo noradrenalinu v závislosti na typu látky.

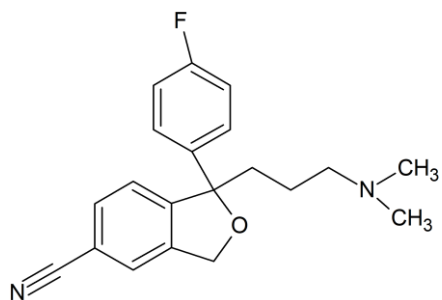
Mezi atypická antidepresiva řadíme agomelatin, trazodon nebo vortioxetin. [2][3]

1.1.1.2 Struktura vybraných antidepresiv

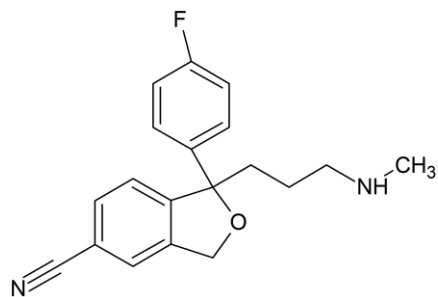
V tabulce č. 2 jsou přehledně uvedeny strukturální vzorce daných antidepresiv.

Tabulka 2 Struktury vybraných antidepresiv. Vzorci byly vytvořeny v programu ChemSketch.

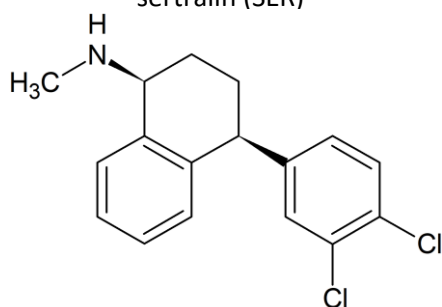
citalopram (CIT)



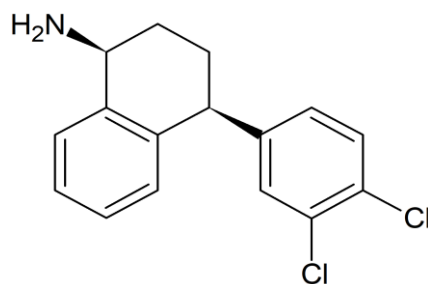
N-desmethyl citalopram (d-CIT)



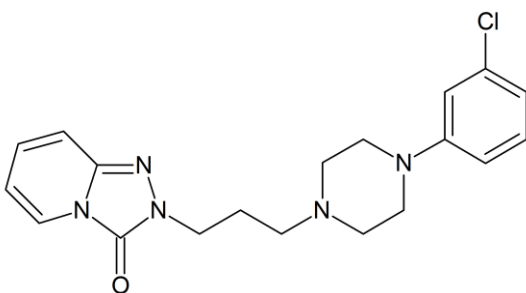
sertralín (SER)



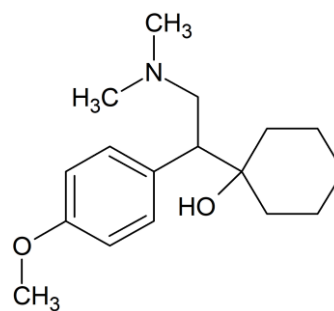
N-desmethyl sertralín (d-SER)



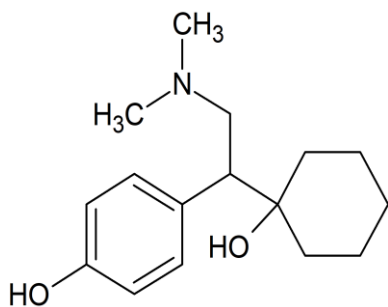
Trazodon (TRZ)



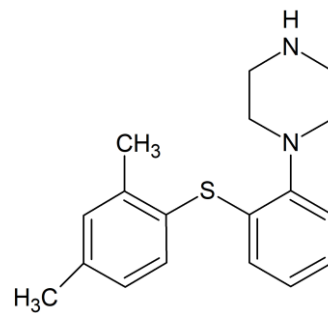
venlafaxin (VEN)



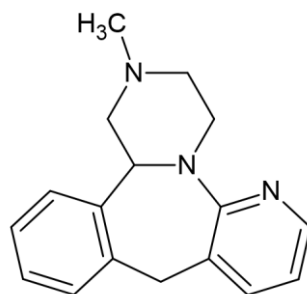
O-desmethyl venlafaxin (d-VEN)



Vortioxetin (VTX)



Mirtazapin (MRT)



1.1.2 Antipsychotika

Antipsychotika, jiným názvem neuroleptika, jsou látky určené zejména k léčbě různých druhů psychóz, z nichž nejvýznamnější je schizofrenie, kterou trpí odhadem až 20 milionů lidí celosvětově. Z tohoto celkového počtu přibližně 5 % jedinců spáchá sebevraždu. Pacienti trpící tímto druhem psychózy velmi často zažívají různé druhy halucinací, bludů nebo paranoii.

Léčiva z této skupiny blokují či snižují aktivitu receptorů dopaminu v mozku a tím napomáhají tlumit příznaky psychózy. [2][3][6]

Tabulka č. 3 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraných antipsychotik a jejich účinných látek dostupných v ČR (údaj k 01.02.2023).

Tabulka 3 Seznam vybraných antipsychotik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
aripirazol	abilify/abilify maintena/aricogan/aripirazol +pharma/aripirazol apotex/aripirazol glenmark/aripirazole accord healthcare/aripirazole neuraxpharm/aripirazole sandoz/aripirazole teva/aripirazole zentiva/aryzalera/asduter/explemend/restigulin/zykalor
haloperidol	haloperidol decanoat-richter/haloperidol-richter
klozapin	clozapin desitin/leponex/
N-desmethyl klozapin	metabolit
kvetiapin	derin/derin prolong/hedonin/hedonin prolong/ketilept/ketilept prolong/kventiax/kventiax prolong/questax/questax prolong/quetiapin mylan/quetiapin neuraxpharm/quetiapin teva retard/quetiapine accord/quetiapine polpharma
olanzapin	aedon/egolanza/nykob/olanzapin actavis/olanzapin apotex/olanzapin mylan/olanzapin snadoz/olanzapin teva/olanzapine aurovitas/olazax/olazax disperzi/olpinat/stygapon/zalasta/zypadhera/zyprexa/zyprexa velotab
N-desmethyl olanzapin	metabolit
risperidon	medorisper/rileptid/rispen/risperdal/rispedal consta/risperidon actavis/risperidon farmax/risperidon orion/risperidon vipharma/rorendo oro tab
9 – hydroxy risperidon	metabolit
paroxetin	parolex/arketis/paroxetin +pharma/remood/seroxat/paroxinor
amisulprid	deniban/amuslprid generics/aktiprol/solian/amilia
ziprasidon	zypsilan/zeldox/ziprasidon aurobindo
flufenazín	afluditen
flupentixol	Fluanxol/fluanxol depot

1.1.2.1 Dělení antipsychotik

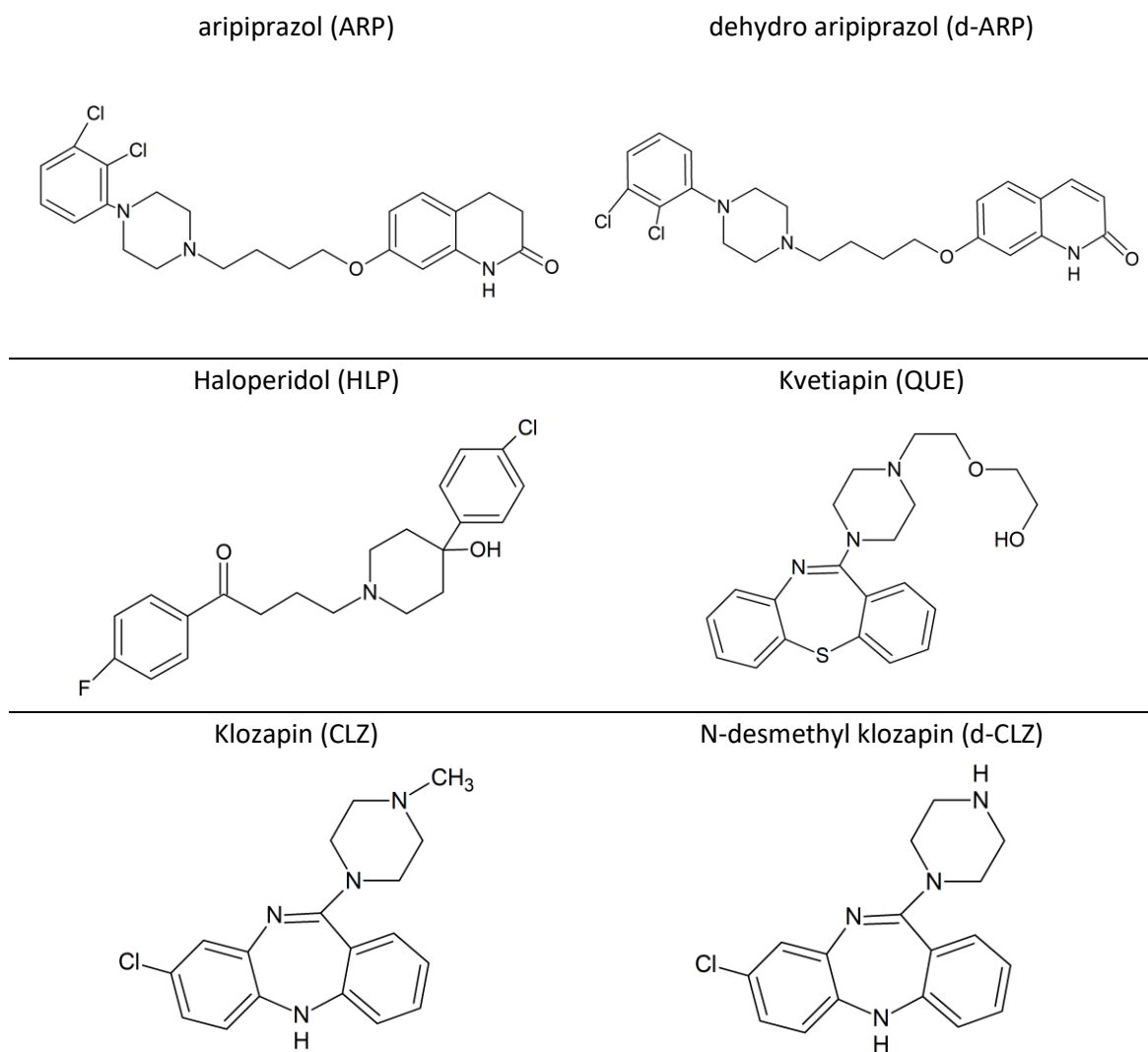
Antipsychotická farmaka můžeme rozčlenit do tří základních skupin a to na:

- I. generaci – klasická antipsychotika (haloperidol)
- II. generaci – atypická antipsychotika (risperidon, paliperidon, klozapin, olanzapin, kvetiapin aj.)
- III. generaci – dopaminergní stabilizátory (aripirazol) [2][3]

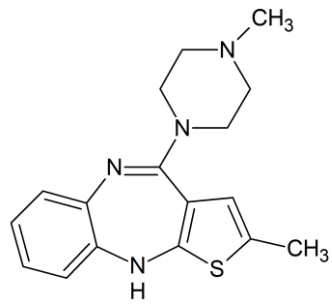
1.1.2.2 Struktura vybraných antipsychotik

V tabulce č. 4 jsou přehledně uvedeny strukturální vzorce daných antipsychotik.

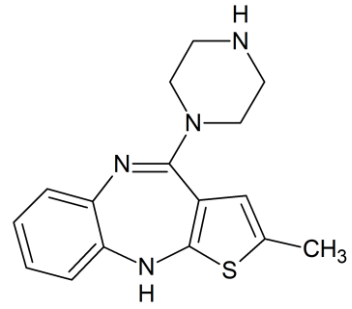
Tabulka 4 Struktury vybraných antidepresiv. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.



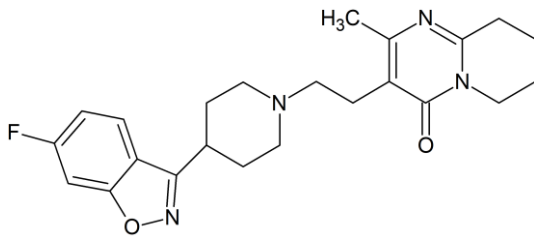
Olanzapin (OLA)



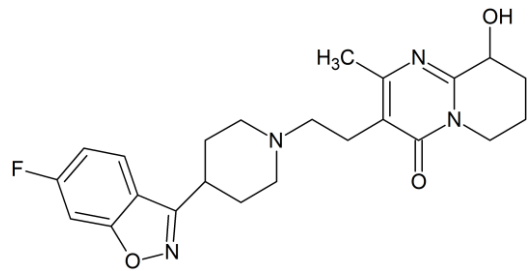
N-desmethyl olanzapin (d-OLA)



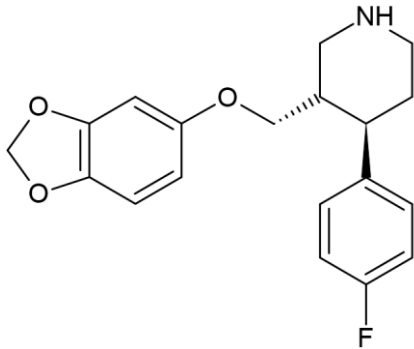
Risperidon (RIS)



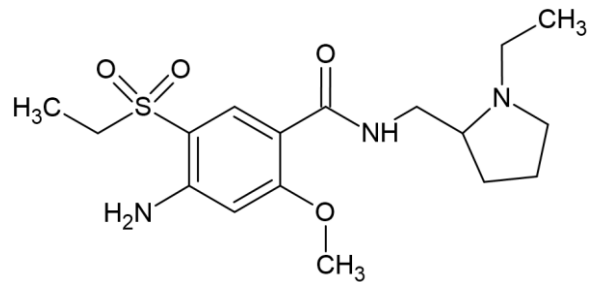
9-hydroxy risperidon (d-RIS)



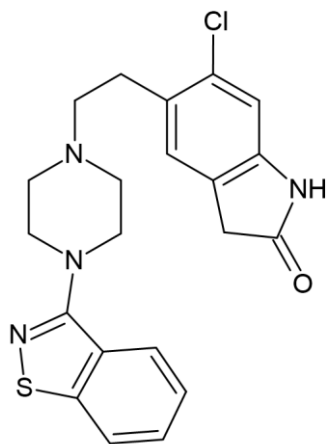
Paroxetin (PAR)



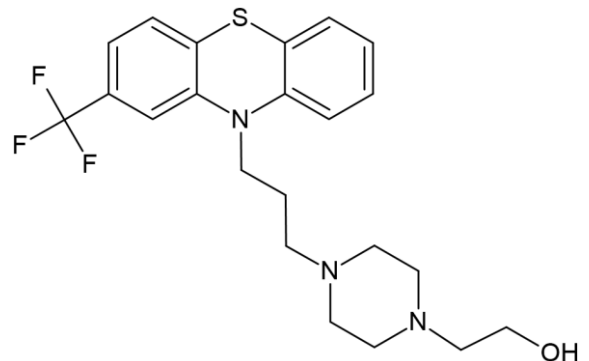
Amisulprid (AMS)

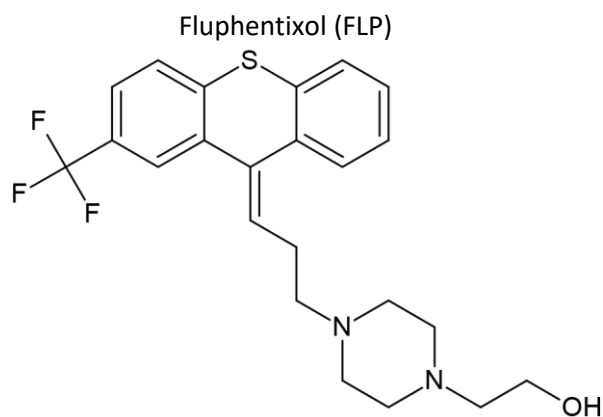


Ziprasidon (ZIP)



Flufenazin (FLF)





1.2 Antiepileptika

Medikamenty spadající do této skupiny se používají zejména k terapii epileptických záchvatů. Mezi další indikace pro jejich předepisování patří např.: bipolární porucha, neuropatická bolest, prevence migrény a další. Antiepileptika nejsou zaměřena na vyléčení epilepsie, ale spíše na kontrolu a snížení frekvence epileptických záchvatů.

Léky fungují na podkladě ovlivňování různých neurotransmiterů v mozku, jako je kyselina gama-aminomáselná (GABA), která snižuje aktivitu neuronů v mozku a pomáhá snižovat křeče. Kromě toho mohou antiepileptika také ovlivňovat různé iontové kanály v neuronu, což pomáhá snižovat excitabilitu neboli dráždivost neuronů a zabraňují tak vzniku křečí.

V závislosti na druhu léčiva se podstatně liší mechanismus účinku, který může být založen na ovlivňování sodíkových, draslíkových a kalciových kanálů, či na podkladě schopnosti inhibičně působit na GABAergní systém (barbituráty, benzodiazepiny) nebo glutamátovou transmissi (topiramát). [2][3]

Tabulka č. 5 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraných antiepileptik a jejich účinných látek dostupných v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 5 Seznam vybraných antiepileptik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
brivaracetam	briviact
eslikarbamazepin	eslibon/zebinix
etosuximid	petinimid
fenobarbital	phenaemal/phenaemaletten
fenytoin	epilan d gerot

Pokračování tabulky 5 Seznam vybraných antiepileptik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
gabapentin	gabagama/gabanox/gabapentin aurovitas/gabapentin teva/gordius/grimodin/neurontin
karbamazepin	biston/neurotop/neurotop retard/tegretol cr/timonil retard
karbamazepin epoxid	metabolit
lakosamid	arkvimma/kanilad/lacosamide accord/lacosamide glenmark/midza/trelema/vimpat
lamotrigin	lamictal/lamotrigin actavis/lamotrigin aurovitas/lamotrigine farmax/lamotrix/plexxo
levetiracetam	dretacen/epiletam/keppra/levelanz/levetiracetam accord/levetiracetam actavis/lvevetiracetam aurovitas/levetiracetam g.l. pharma/levetiracetam stada/levetiracetam UCB
perampanel	fycompa
pregabalin	kartesada/lyrica/naxalgan/pragiola/preato/pregabalin accord/pregabalin apotex/pregabalin mylan/pregabalin sandoz/pregabalin stada/pregabalin teva/pregabalin zentiva/pregabalin zentiva k.s./pregamid/preglenix/prelica/siranalen
primidon	liskantin
rufinamid	inovelon
stiripentol	diacomit
sultiam	ospolot
topiramát	topamax/topilex/topimark/topiramát accord/topiramát actavis/topiramát mylan/topiramát sandoz/topiramate neuraxpharm
Kyselina valproová	convulex
zonisamid	ersittin/zonegran/zonibon/zonisamid sandoz

1.2.1 Dělení antiepileptik

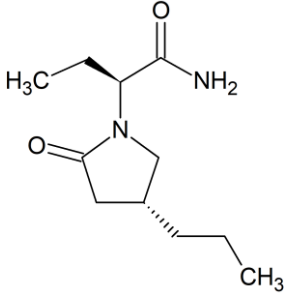
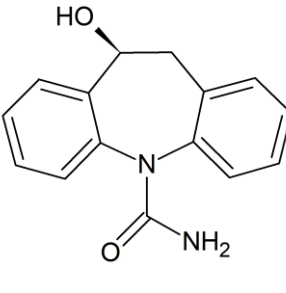
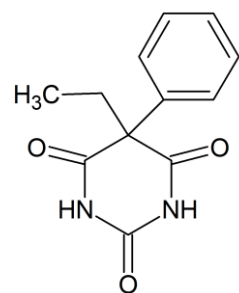
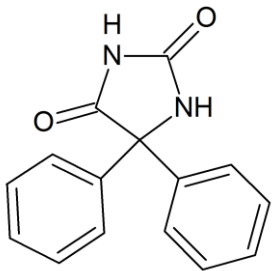
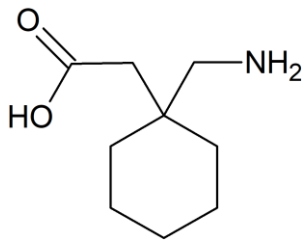
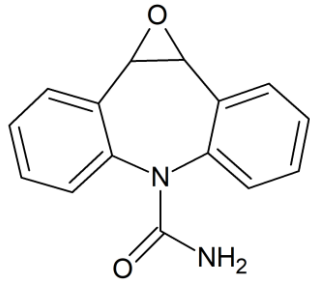
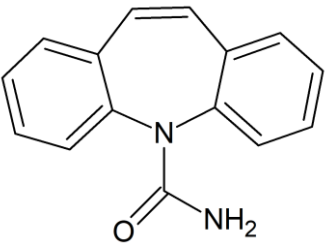
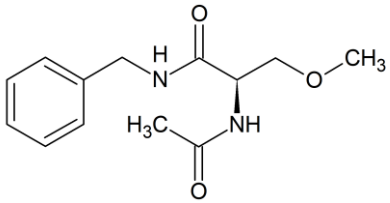
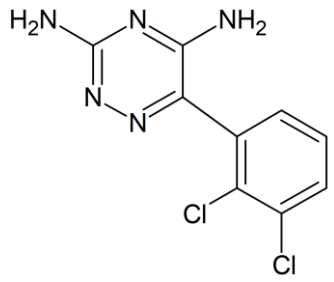
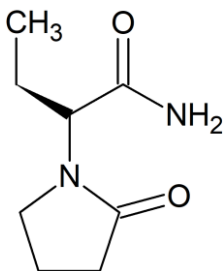
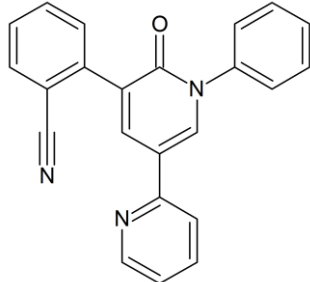
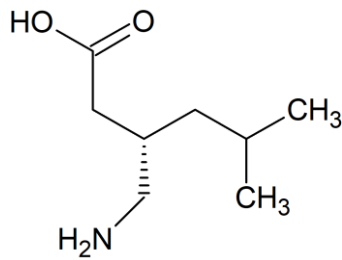
Historicky se antiepileptika člení do tří generací, a to na základě roku zavedení daného léčiva do praxe:

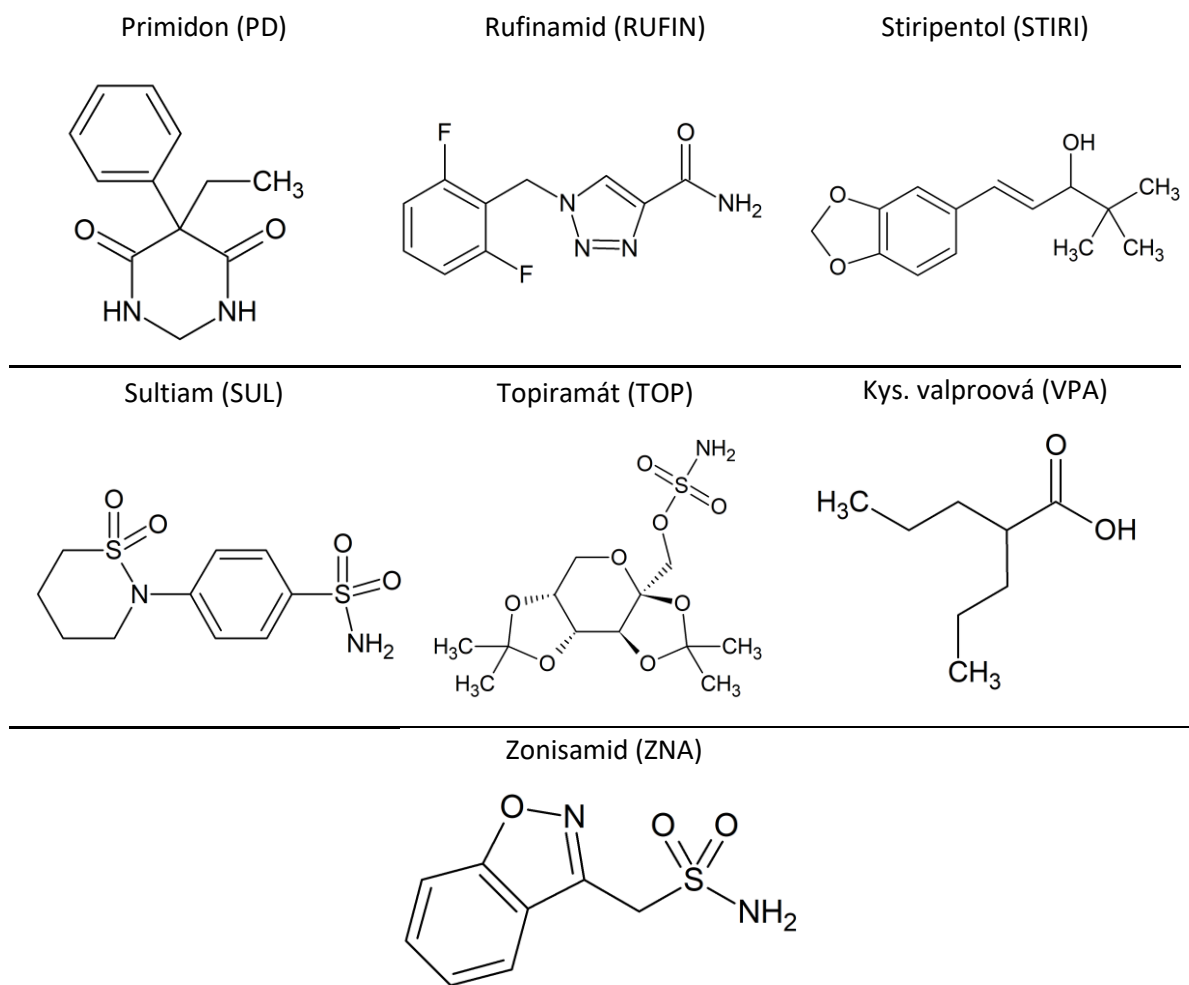
- I. generace – fenobarbital, fenytoin, etosuximid
- II. generace – karbamazepin, kyselina valproová, benzodiazepiny
- III. generace – levetiracetam, topiramát, lakosamid, gabapentin, pregabalin a další

1.2.2 Struktura vybraných antiepileptik

V tabulce č. 6 jsou přehledně uvedeny struktury vybraných antiepileptik.

Tabulka 6 Struktury vybraných antiepileptik. Vzorci byly vytvořeny v programu ChemSketch.

<p>brivaracetam (BRIV)</p> 	<p>Eslikarbamazepin (ESLI-CMZ)</p> 	<p>Fenobarbital (PB)</p> 
<p>Fenytoin (DPH)</p> 	<p>Gabapentin (GABAP)</p> 	<p>Karbamazepin (CMZ)</p> 
<p>Karbamazepin epoxid (EPO-CMZ)</p> 	<p>Lakosamid (LAKO)</p> 	<p>Lamotrigin (LAM)</p> 
<p>Levetiracetam (LEV)</p> 	<p>Perampanel (PERAM)</p> 	<p>Pregabalin (PREGA)</p> 



1.3 Antiarytmika

Porucha srdečního rytmu neboli arytmie je jedno z nejčastějších srdečních onemocnění. Ve většině případů je toto onemocnění léčeno farmakologicky pomocí antiarytmik, které mohou být využívány jak k samotné léčbě, tak k preventivním účelům. Mechanismus působení antiarytmik je různorodý podle typu účinné látky. [2][3]

Tabulka č. 7 zobrazuje komerční názvy léčiv, které obsahují účinnou látku amiodaron (nejběžněji podávané antiarytmikum). Hlavním účinným aktivním metabolitem amiodaronu je N-desmethyl amiodaron.

Tabulka 7 Seznam vybraných antiarytmik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
amiodaron	amiodaron hameln/amiokordin/cordarone/rivodaron/sedacoron
N-desmethyl amiodaron	metabolit

1.3.1 Dělení Antiarytmik

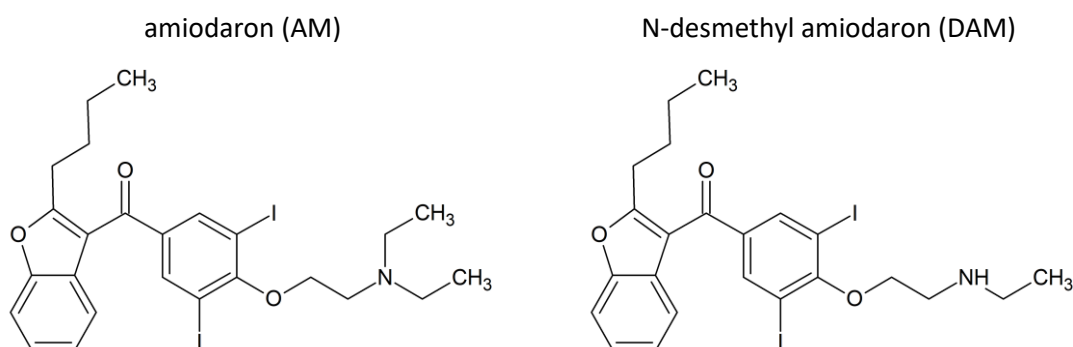
Podle mechanismu působení na srdeční tkáň jsou antiarytmika rozdělena do kategorií dle Vaughan-Williamse:

- I. třída – Inhibitory rychlého sodíkového kanálu (lidokain, propafenon)
- II. třída – betablokátory (bisprolol, metoprolol)
- III. třída – inhibitory draslíkového kanálu (amiodaron)
- IV. třída – inhibitory kalciového kanálu (verapamil)

1.3.2 Struktura vybraných antiarytmik

V tabulce č. 8 je přehledně uveden strukturní vzorec amiodaronu a jeho účinného metabolitu.

Tabulka 8 Struktury vybraných antiarytmik. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.



1.4 Anxiolytika

Anxiolytika jsou látky vhodné zejména k terapii úzkostných stavů. Mezi anxiolytika lze řadit mnoho různých druhů léčiv od antidepresiv z kategorie SSRI, přes benzodiazepiny až po některé druhy antiepileptik.

Historicky prvními léky spadajícími do této skupiny byly barbituráty. Tyto látky byly hojně užívány v průběhu 20. století. Nicméně kvůli vysoké toxicitě a vedlejším účinkům byly postupně nahrazeny bezpečnější variantou, benzodiazepiny.

Dnes jsou nejvíce předepisována SSRI antidepresiva, a to zejména kvůli vysokému riziku vzniku syndromu závislosti a výskytu rebound symptomů při užívání benzodiazepinů.

Tabulka č. 9 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraných anxiolytik a jejich účinných látek a hlavních metabolitů dostupných v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 9 Seznam vybraných anxiolytik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5], *Léčivo temerol je v české republice registrováno, nicméně se momentálně aktivně nevyskytuje na Českém trhu.

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
alprazolam	alprazolam aurovitas/alprox/frontin/helex retard/neurol/xanax/xanax sr
bromazepam	lexaurin
diazepam	apaurin/diazepam desitin/diazepam slovakofarm
N-desmethyl diazepam	metabolit
klobazam	frisium
N-desmethyl klobazam	metabolit
klonazepam	rivotril
lorazepam	temerol*

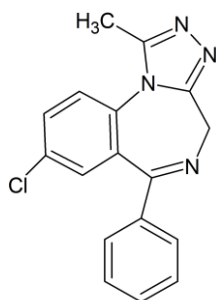
1.4.1 Struktura vybraných anxiolytik

Všechna vybraná anxiolytika spadají do skupiny benzodiazepinů. Základem těchto látek je diazepinový kruh, na který jsou dále připojena benzenová jádra a určité substituenty, které poskytují specifické chemické a farmakologické vlastnosti. [9]

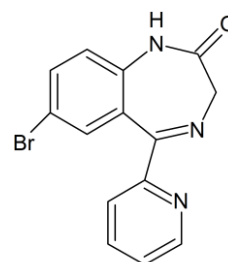
V tabulce č. 10 jsou přehledně uvedeny strukturní vzorce vybraných anxiolytik a jejich hlavních metabolitů.

Tabulka 10 Struktury vybraných anxiolytik a jejich hlavních metabolitů. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.

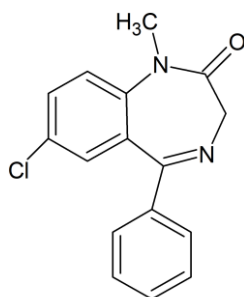
alprazolam (ALPRA)



bromazepam (BROMA)

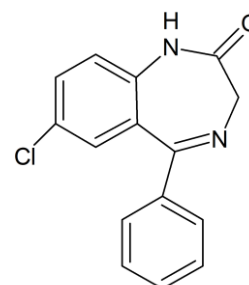


diazepam (DIA)

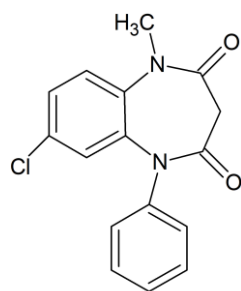


klobazam (CLB)

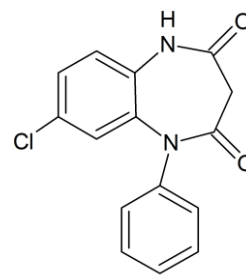
N-desmethyl diazepam (N-DIA)



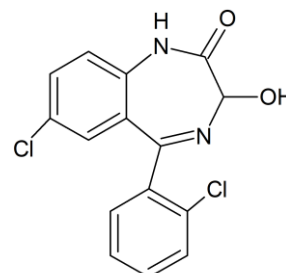
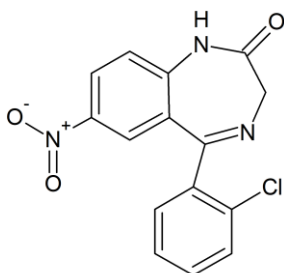
N-desmethyl klobazam (N-CLB)



klonazepam (CLO)



lorazepam (LORA)



1.5 Antimykotika

Léčiva, která mají silný fungicidní a fungistatický účinek. Jsou předepisována zejména k léčbě mykóz. Jedná se o onemocnění vyvolané mikromycetami neboli mikroskopickými houbami. Ty nejčastěji napadají povrchové vrstvy kůže a sliznice, kde mohou způsobovat lokální zarudnutí, svědění a pálení. Méně časté, ale závažnější mohou být případy systémových mykóz napadajících vnitřní orgány. Ty se vyskytují zejména u pacientů s oslabenou imunitou v důsledku jiných chorob např. syndromu získaného selhání imunity (AIDS).

Tabulka č. 11 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraných antimykotik a jejich účinných látek dostupných v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 11 Seznam vybraných antimykotik a registrovaných názvů léčivých přípravků užívaných v České republice. Tento seznam je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
vorikonazol	vfend/voriconazole accord/voriconazole fresenius kabi/voriconazole olikla/voriconazole teva/vorikonazol accordpharma/vorikonazol mylan/vorikonazol sandoz/
itrakonazol	conisor/prokanazol/sporanox
posakonazol	gudivin/noxafil/posaconazole accord/posaconazole ahcl
flukonazol	difluctan/fluconazol kabi/fluconazole aurovitas/fluconazol sandoz/mycomax/

1.5.1 Dělení antimykotik

Antimykotika lze dle jejich mechanismu účinku rozdělit do čtyř skupin a to na:

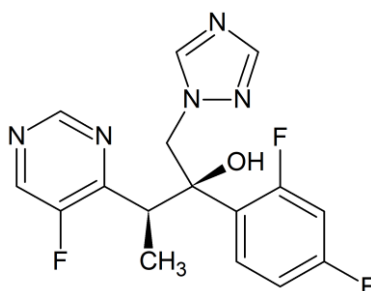
- Inhibitory syntézy ergosterolu – itrakonazol, flukonazol, posakonazol a další
- Inhibitory 1,3- β -D-glukanu – kapsfungin, mikafungin
- Intracelulární antimykotika – griseofulvin
- Ostatní – ciklopiroxolamin

1.5.2 Struktura vybraných antimykotik

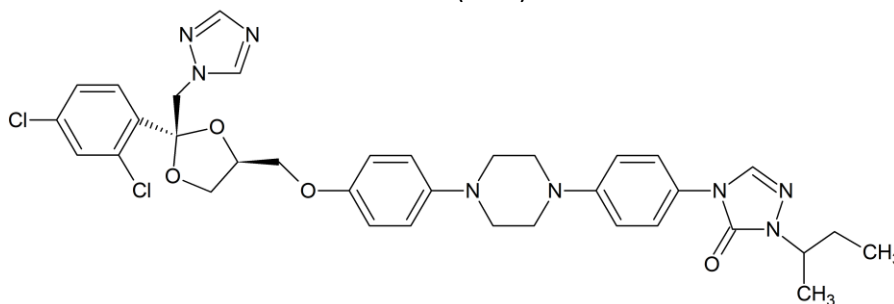
V tabulce č. 12 jsou přehledně uvedeny strukturální vzorce vybraných antimykotik.

Tabulka 12 Struktury vybraných antimykotik. Vzorce byly vytvořeny v programu ChemSketch.

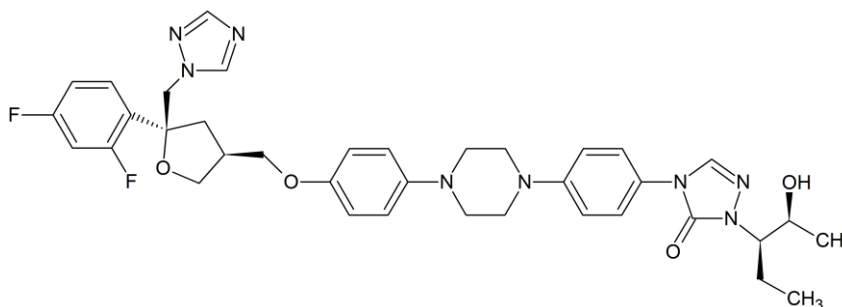
vorikonazol (VORI)



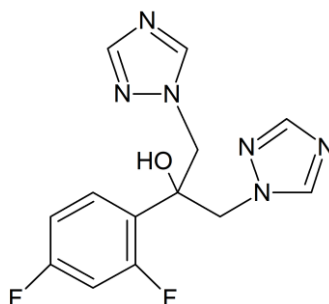
itrakonazol (ITRA)



posakonazol (POSA)



flukonazol (FLUKO)



1.6 Bronchodilatancia

Bronchodilatancia jsou látky, které dilatují dýchací cesty a zlepšují tak průchodnost vzduchu do plic. Využití nacházejí zejména při léčbě chronické obstrukční plicní nemoci nebo při akutním astmatickém záchvatu.

Tabulka č. 13 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraného bronchodilatancia a jeho účinné látky dostupné v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 13 Vybrané bronchodilatancium a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
Teofylin	afonilum sr/euphyllin cr n

1.6.1 Dělení bronchodilatancí

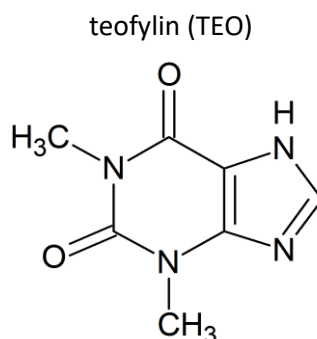
Bronchodilatancia se rozdělují na základě jejich mechanismu účinku a to na:

- β_2 -agonisty – stimulují β_2 -adrenergní receptory, díky čemuž dochází k relaxaci hladké svaloviny
- antagonisty muskarinových receptorů – kompetitivně působí na M_3 receptory v bronších, což vede v bronchodilataci
- teofylin a deriváty – relaxuje hladkou svalovinu na podkladě inhibice fosfodiesterázy a ovlivněním adenosinových receptorů A1, A2 a A3. [3][8]

1.6.2 Struktura vybraného bronchodilatancia

V tabulce č. 14 je uveden strukturní vzorec vybraného bronchodilatancia.

Tabulka 14 Struktura vybraného bronchodilatancia. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.



1.7 Cytostatika

Mezi cytostatika jsou obecně řazeny látky rostlinného původu, které mají schopnost zastavit růst či úplně zničit rakovinotvorné buňky. Využití nachází zejména při léčbě karcinogenních onemocnění.

Tabulka č. 15 shrnuje komerční názvy léčiv, které obsahují účinnou látku methotrexát. Je zde taktéž uveden hlavní metabolit methotrexátu a to 7-hydroxy-methotrexát dostupné v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 15 Vybrané cytostatikum a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

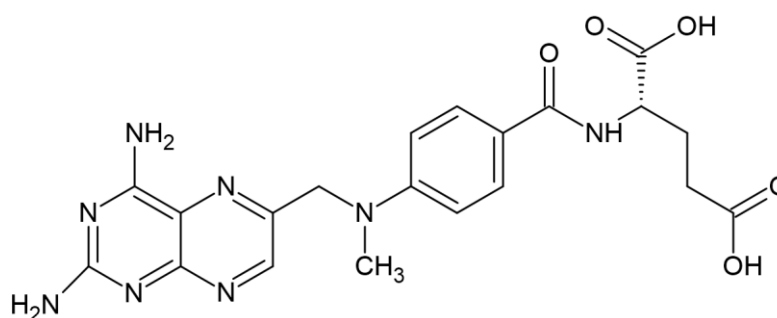
Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
Methotrexát	methotrexat accor/methotrexat ebewe
7-hydroxy-methotrexát	metabolit

1.7.1 Struktura vybraných cytostatik

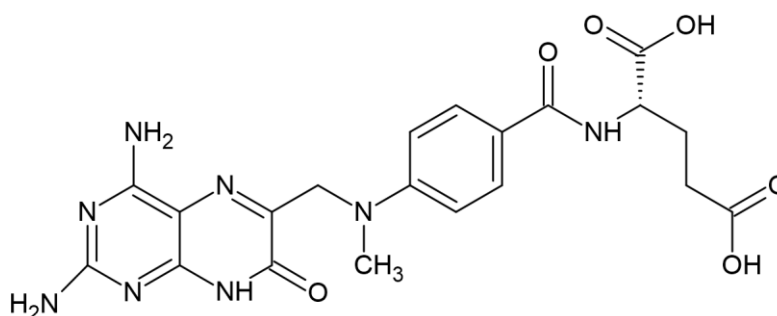
V tabulce č. 16 jsou uvedeny strukturní vzorce vybraných cytostatik.

Tabulka 16 Struktura vybraných cytostatik. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.

Methotrexát (MTX)



7-hydroxy-methotrexát (7-OH-MTX)



1.8 Antivirotika

Látky vhodné k léčbě virových onemocnění, mezi které patří například rýma, chřipka, herpes virus aj. Léčba virových onemocnění probíhá zejména u imunokompromitovaných pacientů, jejichž imunitní systém nezvládne sám efektivně bojovat proti viru. Dle mechanismu účinku jsou antivirotika schopna inhibovat syntézu RNA či DNA viru, nebo blokovat jeho pronikání skrz buněčnou membránu do buněk.

Tabulka č. 17 shrnuje registrované názvy léčivých přípravků vybraného antivirotika a účinné látky dostupné v ČR (údaj ke dni 01.02.2023).

Tabulka 17 Vybrané antivirotikum a registrovaný název léčivého přípravku užívaného v České republice. Tento údaj je aktuální ke dni 01.02.2023. [5]

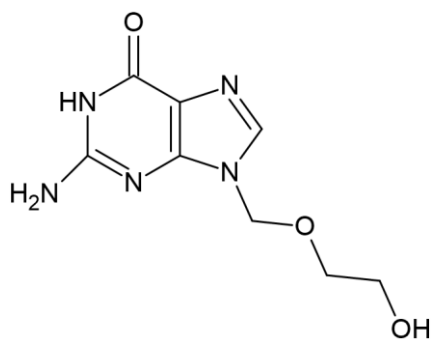
Účinná látka	Registrovaný název léčivého přípravku
Acyklovir	zivirin/herpesin/zovirax/provirsan/aciclovir aurovitas
8-hydroxy-acyklovir	metabolit

1.8.1 Struktura vybraných antivirotik

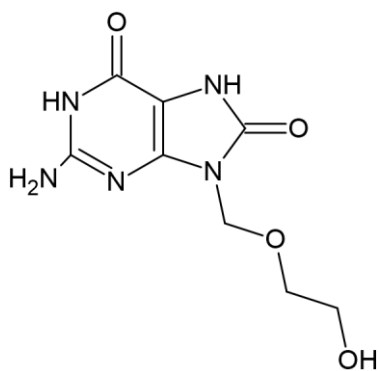
V tabulce č. 18 jsou uvedeny strukturální vzorce vybraných antivirotik.

Tabulka 18 Struktury vybraných antivirotik. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch.

Acyklovir (ACV)



8-hydroxy-acyklovir (8-OH-ACV)



2 Terapeutické monitorování léčiv (TDM)

Kapitola zabývající se terapeutickým monitorováním léčiv a výběrem léčiv vhodných k terapeutickému monitorování je blíže popsána v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

2.1 TDM vybraných farmak

Obrovský přínos přináší TDM obzvláště u látek, které díky svým farmakokinetickým vlastnostem spadají do první či druhé třídy doporučení pro TDM. Toto doporučení opakovaně publikuje Německá skupina „Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie“ (AGNP), která se zaměřuje na doporučené postupy pro optimální využití terapeutického monitorování. Na podkladě užitečnosti využití TDM v klinické praxi pro daná farmaka byla léčiva rozčleněna do 4 skupin [9][10]:

- I. Důrazně doporučeno
- II. Doporučeno
- III. Užitečné
- IV. Potenciálně užitečné

V následujících tabulkách č. 19-21 jsou přehledně shrnuty dané farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných léčiv.

Popis farmakologických parametrů obsažených v tabulkách č. 19-21 je blíže popsán v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

Tabulka 19 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antidepresiv [10][11][12][13][14][15][16].
*Společné terapeutické referenční rozmezí pro dehydro aripiprazol a aripiprazol. n.u. – není uvedeno

Antidepresiva					
Léčivo	Terap. referenční rozmezí (ng/mL)	Eliminační poločas t _{1/2} (h)	Kritická koncentrace (ng/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
aripiprazol	100-350	60-80	1000	2	99
dehydro aripiprazol	150-500*	60-80	1000	2	99
haloperidol	1-10	12-36	15	1	90
klozapin	350-600	12-16	1000	1	95
N-desmethyl klozapin	350-600	12-16	1000	1	90
kvetapin	100-500	6-11	1000	2	83
olanzapin	20-80	30-60	100	1	93
N-desmethyl olanzapin	20-80	30-60	100	1	n.u.

Pokračování tabulky 19 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antidepresiv [10][11][12][13][14][15][16].

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (ng/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace (ng/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
risperidion	20-60	2-4	120	2	90
9 – hydroxy risperidon	20-60	17-23	120	2	77
paroxetin	20-60	12-44	120	3	95
amisulprid	100-320	12-20	640	1	17
ziprasidon	50-200	4-8	400	2	99
flufenazin	0,5-5	20-40	15	2	90
fluphenthixol	1-10	16	15	1	99

Tabulka 20 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antipsychotik [10][17][19][20][21][22]

Antipsychotika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (ng/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace (ng/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
citalopram	50-110	38-48	220	1	80
N-desmethyl citalopram	50-110	38-48	220	1	80
sertralin	10-150	22-36	300	2	98
N-desmethyl sertralin	10-150	59-120	300	2	90
trazodon	700-1000	4-11	1200	2	90
venlafaxin	100-400	14-18	800	2	27±2
O-desmethyl venlafaxin	100-400	10-17	800	2	30±12
vortioxetin	10-40	57-66	80	2	98
mirtazapin	30-80	20-40	160	2	85

Tabulka 21 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antiepileptik [10][23][24][25][26], *Léčivo se neváže na proteiny

Antiepileptika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
brivaracetam	0,5-0,9 µg/mL	7-11	1,8 µg/mL	3	≤20
eslikarbamazepin	10-35 µg/mL	20-40	70 µg/mL	3	<40
etosuximid	40-100 µg/mL	33-55	120 µg/mL	3	22
fenobarbital	10-40 µg/mL	80-120	50 µg/mL	1	40-60
fenytoin	10-20 µg/mL	20-60	25 µg/mL	1	90
gabapentin	2-20 µg/mL	5-7	25 µg/mL	3	*
karbamazepin	4-12 µg/mL	10-20	20 µg/mL	1	70-80

Pokračování tabulky 21 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antiepileptik [10][23][24][25][26]

karbamazepin epoxid	4-12 µg/mL	10-20	20 µg/mL	1	50
lakosamid	1-10 µg/mL	10-15	20 µg/mL	3	14
lamotrigin	3-15 µg/mL	14-104	20 µg/mL	2	55
levetiracetam	20-40 µg/mL	6-8	50 µg/mL	4	<10
perampanel	180-980 ng/mL	48-105	1000 ng/mL	3	95
pregabalin	2-5 µg/mL	6	10 µg/mL	3	*
primidon	5-10 µg/mL	14-15	25 µg/mL	2	20
rufinamid	5-30 µg/mL	6-10	40 µg/mL	2	34
stiripentol	1-10 µg/mL	4-13	15 µg/mL	2	99
sultiam	2-8 µg/mL	3-30	12 µg/mL	2	29
topiramát	2-10 µg/mL	19-23	16 µg/mL	3	20
valproát	50-100 µg/mL	17-30	120 µg/mL	1	90-95
zonisamid	10-40 µg/mL	49-77	40 µg/mL	2	40-50

Tabulka 22 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antiarytmik [30]. n.u. – není uvedeno, * Společné terapeutické referenční rozmezí pro amiodaron a desmethyl amodaron

Antiarytmika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (µg/mL)	Eliminační poločas t _{1/2} (h)	Kritická koncentrace (µg/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
Amiodaron	1-2,5*	5-68	n.u.	n.u.	96
Desmethyl amiodaron	1-2,5*	n.u.	n.u.	n.u.	96

Tabulka 23 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných anxiolytik [9][10][27], *klonazepam může být taktéž indikován při léčbě epilepsie a má tudíž 2 referenční rozmezí [10]. V tabulce je uvedeno terapeutické rozmezí využívané k léčbě epilepsie. Pro jiné indikace je terapeutické referenční rozmezí 20-80 ng/ml.

Anxiolytika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (ng/mL)	Eliminační poločas t _{1/2} (h)	Kritická koncentrace (ng/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
alprazolam	20-40	12-15	100	3	80
bromazepam	50-200	15-35	300	4	70
diazepam	100-2500	24-48	3000	4	99
N-desmethyl diazepam	100-2500	80-103	3000	4	98
klobazam	30-300	36-42	500	3	85
N-desmethyl klobazam	300-3000	71-82	5000	3	85
klonazepam	4-80*	19-30	100	3	85
lorazepam	30-100	12-16	300	4	90

Tabulka 24 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antimykotik [28][29][30], *Terapeutické referenční rozmezí pro profylaxi, a) terapeutické referenční rozmezí při léčbě závažné infekce je 2-6 µg/mL, b) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je 1-4 µg/mL, c) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je >1 µg/mL, d) terapeutické referenční rozmezí při léčbě infekce je >70 µg/mL, n.u. – není uvedeno.

Antimykotika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (µg/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
vorikonazol	1-5,5 * ^a	6-24	n.u.	n.u.	60
itrakonazol	0,5-4 * ^b	35-64	n.u.	n.u.	99
posakonazol	0,7 * ^c	25-35	n.u.	n.u.	90
flukonazol	4 * ^d	22-31	n.u.	n.u.	11

Tabulka 25 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraného bronchodilatancia[30][31], *dospělý nekuřák, n.u. – není uvedeno

Bronchodilatancia

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (µg/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace (µg/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
teofylin	8-20	8*	>20	n.u.	58-82

Tabulka 26 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných cytostatik, *u pacientů s rakovinou, pokud se jedná o zdravého jedince je udávána vaznost až 50 %

Cytostatika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (µg/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace (µg/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
methotrexát	Sleduje se pokles <0,25 µM/L	n.u.	n.u.	n.u.	32,3*
7-hydroxy-methotrexát	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Tabulka 27 Farmakokinetické parametry a terapeutické rozmezí vybraných antivirotik. *Hodnota acykloviru po podání je ≤ 20,3 µg/mL, n.u. – není uvedeno

Antivirotika

Léčivo	Terap. referenční rozmezí (µg/mL)	Eliminační poločas t1/2 (h)	Kritická koncentrace (µg/mL)	Třída doporučení pro TDM	Vazba na proteiny (%)
acyklovir	0,1-10,8*	n.u.	50	n.u.	n.u.
8-hydroxy-acyklovir	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

3 Úprava biologické matrice

Kapitola zabývající se úpravou biologické matrice je blíže popsána v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

V tabulce č. 28 jsou přehledně zpracovány vybrané publikace zabývající se multi analýzou (stanovení více látek v jediné analýze) vybraných skupin léčiv z biologické matrice pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tabulka obsahuje názvy stanovovaných látek, princip úpravy vzorku a nastavení podmínek chromatografické analýzy (typ a specifikace kolony, složení MF a typ eluce mobilní fáze).

Autoři publikací uvedených v literatuře (1), (2), (3) v tabulce č. 28 se zabývali stanovením vybraných psychofarmak. Publikace uvedené v tabulce č. 28 pod označením literatury (4) a (5) jsou zaměřeny na analýzu antiepileptik. Kvantifikací benzodiazepinů z krve pomocí LC-MS se věnovali autoři v literatuře (7) a (8). Analýza amiodaronu a jeho aktivního metabolitu je uvedena v tabulce pod číslem literatury 6. Antimykotika a teofylin je uveden v tabulce pod označením literatury (9), (10) a (11).

Tabulka 28 Přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných farmak z biologické matrice. SLE – extrakce pevná fáze-kapalina, LLE – extrakce kapalina-kapalina, PPT – proteinová precipitace

Analyty	Vzorek (objem)	Interní standard	Extrakční výtěžek [%]	Úprava vzorků	Složení MF Typ eluce	Kolona, doba chromatografické analýzy	Detekční systém	Literatura
Sertralin, Citalopram, Trazodon, Klozapin a dalších 9 analytů	Krev (500 µL)	Citalopram-d6	84,4-101,5	SLE (Isolute SLE + cartridge) eluováno 2 mL ethyl acetátu, vysušeno a reziduum rozpuštěno v 50 µL MF	Mobilní fáze A - 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B – acetonitril, Gradientová eluce	kolona Waters BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 µm), 15 minut	UPLC-MS/MS	(1)
Sertralin, Citalopram, Escitalopram, Trazodon, Aripiprazol, Risperidon a dalších 32 analytů	Krev (200 µL)	Mirtazapin-d3 Venlafaxin-d6 Risperidon-d4 Quetiapin-d8 Citalopram-d6 Fluoxetin-d5	50,6-121,5 kromě některých analytů *	LLE (100 µL TRIS roztoku [2 mol/L, pH 10,5] extrahováno do směsi cyklohexanu:ethyl-acetátu [1:1, v/v]	Mobilní fáze A – 5mM vodný mravenčan amonný s 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě, mobilní fáze B – acetonitril, Gradientová eluce	kolona Acquity UPLC BEH Phenyl (100x2,1 mm; 1,7 µm) s předkolonou Acquity UPLC BEH Phenyl VanGuard (5x2,1 mm; 1,7 µm), 24 minut	UPLC-MS/MS	(2)
Aripiprazol, Klozapin, Olanzapin, Risperidon a další 4 analyty	Sérum (50 µL)	Aripiprazol-d8 Klozapin-d4 Halopridol-d4 Olanzapin-d8 Paliperidon-d4 Quetiapin-d8 Risperidon-d4 Zisprasidon-d8	88,1-107	PPT (150 µL methanolu)	Mobilní fáze A – 2mM mravenčan amonný ve vodě, mobilní fáze B – methanol, Gradientová eluce	kolona KINETEX C18 (50x3 mm; 5µm), 3,3 minut	LC-MS/MS	(3)

Pokračování tabulky 28 Přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných farmak z biologické matrice. PPT – proteinová precipitace, SPE – extrakce na pevné fázi, n.u. – není uvedeno

Analyty	Vzorek (objem)	Interní standard	Extrakční výtěžek [%]	Úprava vzorků	Složení MF Typ eluce	Kolona, doba chromatografické analýzy	Detekční systém	Literatura
Gabapentin, Pregabalin, Lamotrigin, Levetiracetam a dalších 8 analytů	Sérum (200 µL)	Chlorzoxazon Fenacetin	90,80-114,0	PPT (800 µL acetonitrilu)	Mobilní fáze A – 10mM mravenčan amonný ve vodě, mobilní fáze B – 10mM mravenčan amonný v methanolu, Gradientová eluce	kolona Acquity UPLC BEH Phenyl (100x2,1 mm; 1,7 µm), 9 minut	UPLC-MS/MS	(4)
Gabapentin, Pregabalin, Topiramát, Levetiracetam a dalších 20 analytů	Plazma (200 µL)	Trimipramine-d3 Topiramate-d12	92,4-114,8	PPT (700 µL acetonitrilu)	Mobilní fáze A – 10mM mravenčan amonný ve vodě s přídavkem 0,2 % kyseliny mravenčí, mobilní fáze B – 10mM mravenčan amonný v acetonitrilu s přídavkem 0,2 % kyseliny mravenčí, Gradientová eluce	kolona Kinetex XB-C18 (50x3,0 mm; 2,6 µm), 11 minut	LC-MS/MS	(5)
Amiodaron, Desmethyলামiodaron	Plazma (100 µL)	Amiodaron-d4 Desethylamiodaron-d4	92,6–107,7 (AM) 80,0–94,7 (DAM)	SPE (Oasis MCX cartridges) kondiciováno methanolem a HCl (0,1 mol/L), promyto HCl (0,1 mol/L) a methanolem, eluováno 1 ml methanolu s obsahem 1 % amoniaku	n.u. Gradientová eluce	Phenomenex LC/MS cartridge (20x2 mm; 2,5 µm, 4 minuty)	LC-MS/MS	(6)

Pokračování tabulky 28 Přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných farmak z biologické matrice. n.u. – není uvedeno, LLE – extrakce kapalina-kapalina, DLLME – disperzní mikro extrakce z kapaliny do kapaliny, PPT – proteinová precipitace

Analyty	Vzorek (objem)	Interní standard	Extrakční výtěžek [%]	Úprava vzorků	Složení MF Typ eluce	Kolona, doba chromatografické analýzy	Detekční systém	Literatura
Alprazolam, Bromazepam, Diazepam, Lorazepam a dalších 23 analytů	Krev (500 µL)	Diazepam-d5	81,0-106,7	LLE (200 µL uhličitánového pufru + 1 mL ethyl acetátu) odpaření a rozpuštěno v 100 µL směsi acetonitril: voda (2:8, v/v)	Mobilní fáze A - 0,05% kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B - 0,05% kyselina mravenčí v acetonitrilu, Gradientová eluce	kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (100x3,0 mm; 2,7 µm) s předkolumnou InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 Fast Guard (5x3,0 mm; 2,7 µm), 17 minut	LC-MS/MS	(7)
Alprazolam, Bromazepam, Klobazam, Klonazepam a 24 dalších analytů	Krev (1000 µL)	Alprazolam-d5 Chlordiazepoxid-d5 Klonazepam-d4 Diazepam-d5 a dalších 12 izotopově značených standardů	24,7–127,2	DLLME (vodný pufr o pH 8,0 smíchan s BMI m PF6), získaná fáze byla smíchaná s methanolem (1:10, v/v)	Mobilní fáze A – vodný pufr o pH 8,0, mobilní fáze B – methanol, Gradientová eluce	kolona Kinetex Biphenyl LC (100x2,1 mm; 2,6µm), 14 minut	LC-MS/MS	(8)
Vorikonazol, Posakonazol, Itrakonazol, Hydroxy-itakonazol	Plazma (50µL)	voriconazol-d3, posaconazol-d4, itraconazol-d5, hydroxyitraconazol-d5	90-110	PPT (srážecí činidlo)	Mobilní fáze A – 10mM octan amonný v ultra čisté vodě s 0,1 % kyselinou mravenčí, mobilní fáze B – 10mM octan amonný v methanolu s 0,1 % kyselinou mravenčí, Gradientová eluce	kolona Acquity UPLC BEH C18 (50x2,1 mm; 1.7 µm) s předkolumnou Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm), 5 minut	LC-MS/MS	(9)

Pokračování tabulky 28 Přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných farmak z biologické matrice. PPT – proteinová precipitace, LLE – extrakce kapalina-kapalina

Analyty	Vzorek (objem)	Interní standard	Extrakční výtěžek [%]	Úprava vzorků	Složení MF Typ eluce	Kolona, doba chromatografické analýzy	Detekční systém	Literatura [rok]
Flukonazol	Sérum (10 μ L)	flukonazol-d4	n.u.	PPT (40 μ L acetonitrilu)	Mobilní fáze A - 0,1% kyselina mravenčí a 10mM octan amonný ve vodě, mobilní fáze B - 0,1% kyselina mravenčí a 10mM octan amonný v methanolu, Gradientová eluce	kolona Imtakt® UK-C18 (50x3,0 mm; 3 μ m), 5 minut	LC-MS/MS	(9)
Theofylin	Krev (100 μ l)	3-Isobutyl-1-methylxanthin	67,7-86,7	LLE (přidáno 200 μ L acetonitrilu, supernatant evaporován a rozpuštěn ve 100 μ L 0,1% kyseliny mravenčí)	Mobilní fáze A - 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B - 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu, Gradientová eluce	kolona Poroshell 120 EC-C18 (100x2,1 mm; 2,7 μ m), 8 minut	UPLC-MS/MS	(11)

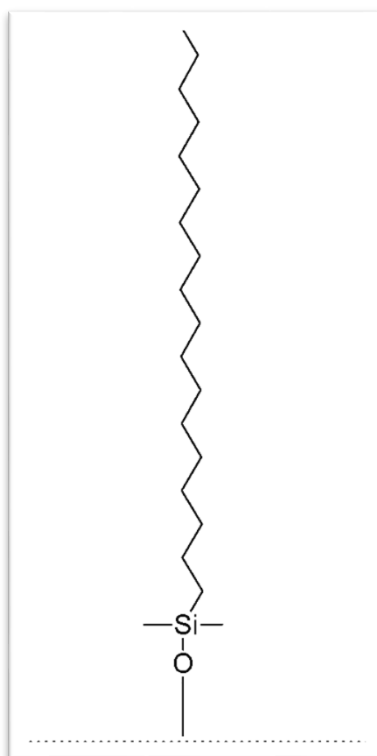
4 Chromatografické metody

Kapitola zabývající se popisem instrumentace a principů chromatografických metod je blíže popsána v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

4.1 Stacionární fáze v kapalinové chromatografii

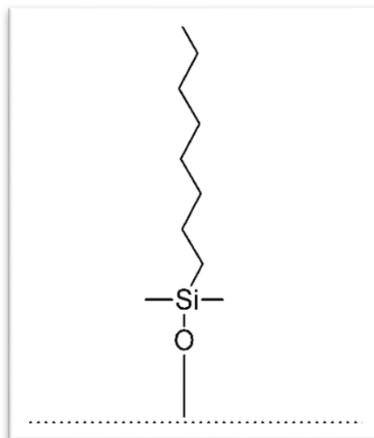
Jedná se o pevnou látku či kapalinu ukotvenou na pevném nosiči. Díky interakcím analytu mezi mobilní a stacionární fází dochází k jeho retenci a separaci od zbytku matrice a jiných složek. V závislosti na typu stacionární fáze jsem schopni s větší či menší účinností separovat a měnit chromatografické rozlišení. Mezi typické stacionární fáze využívající se v analýze léčiv jsou fáze reverzní. Příklady nejběžněji užívaných stacionárních fází patří například:

- C18 fáze – jedná se o nejčastěji používaný typ reverzní stacionární fáze v kapalinové chromatografii. Fáze je složena z 18 uhlíkového řetězce, který je navázán na silikagel.



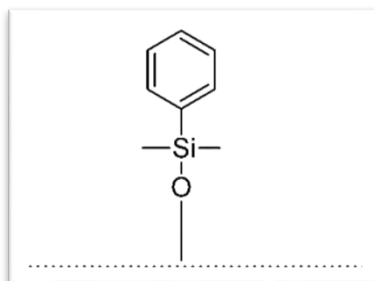
Obrázek 1 Struktura C18 stacionární fáze

- C8 fáze – Velmi podobná C18 fázi, ale má pouze 8 uhlíkový řetězec. Disponuje nižší hydrofobicitou a odlišnou selektivitou než C18 fáze. Retence analytů oproti C18 je podstatně menší.

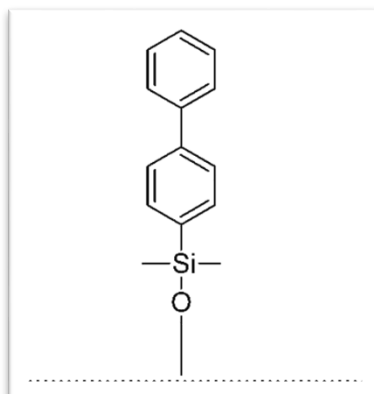


Obrázek 2 Struktura C8 stacionární fáze

- Fenylová fáze – Jedná se o fenylovou skupinu navázanou na silikagel, která poskytuje do značné míry univerzální selektivitu pro analyty, které obsahují ve své struktuře aromatický kruh. Komerčně dostupné jsou fenylové či bifenylové kolony. Strukturně se tyto fáze liší počtem fenylových jader, které jsou navázané na silikagel.

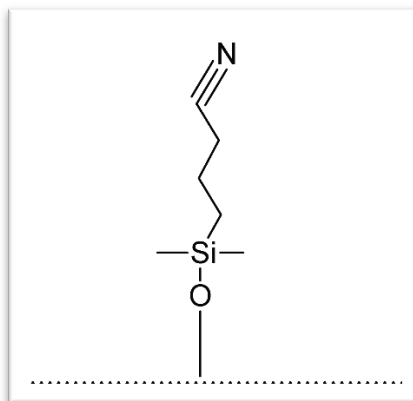


Obrázek 3 Struktura fenylové stacionární fáze



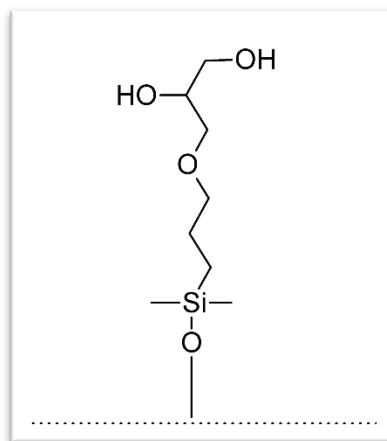
Obrázek 4 Struktura bifenylové stacionární fáze

- Kyano fáze – Stacionární fáze obsahující kyano skupinu navázanou na silikagel, Tento druh fáze poskytuje jinou selektivitu a hydrofobicitu než C18.



Obrázek 5 Struktura kyano stacionární fáze

- Diolová fáze – Fáze poskytující skvělou selektivitu pro polární látky díky diolové funkční skupině navázané na silikagelový nosič.



Obrázek 6 Struktura diolové stacionární fáze

5 Hmotnostní spektrometrie

Kapitola zabývající se hmotnostní spektrometrií je blíže popsána v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

5.1 Trojitý kvadrupól

Jedná se o tandemové uspořádání tří kvadrupólových analyzátorů za sebou. První kvadrupólový analyzátor (Q1) zde plní funkci tzv. hmotnostního filtru, jinými slovy dochází k selekci daného iontu na podkladě zvolené hodnoty m/z . Vybraný iont poté vstupuje do druhého kvadrupólu, který zde funguje jako kolizní cela (q), ve které dochází k fragmentaci. Této fragmentace dosahujeme díky kolizím molekul analytu s kolizním plynem, nejčastěji se jedná o argon (Ar), helium (He) či dusík (N). Vzniklé fragmenty následně prostupují do třetího kvadrupólu (Q2) ve kterém probíhá jejich finální analýza. [35]



Obrázek 7 Schéma tandemového uspořádání hmotnostního spektrometru typu – trojitý kvadrupól

5.1.1 Skenovací módy

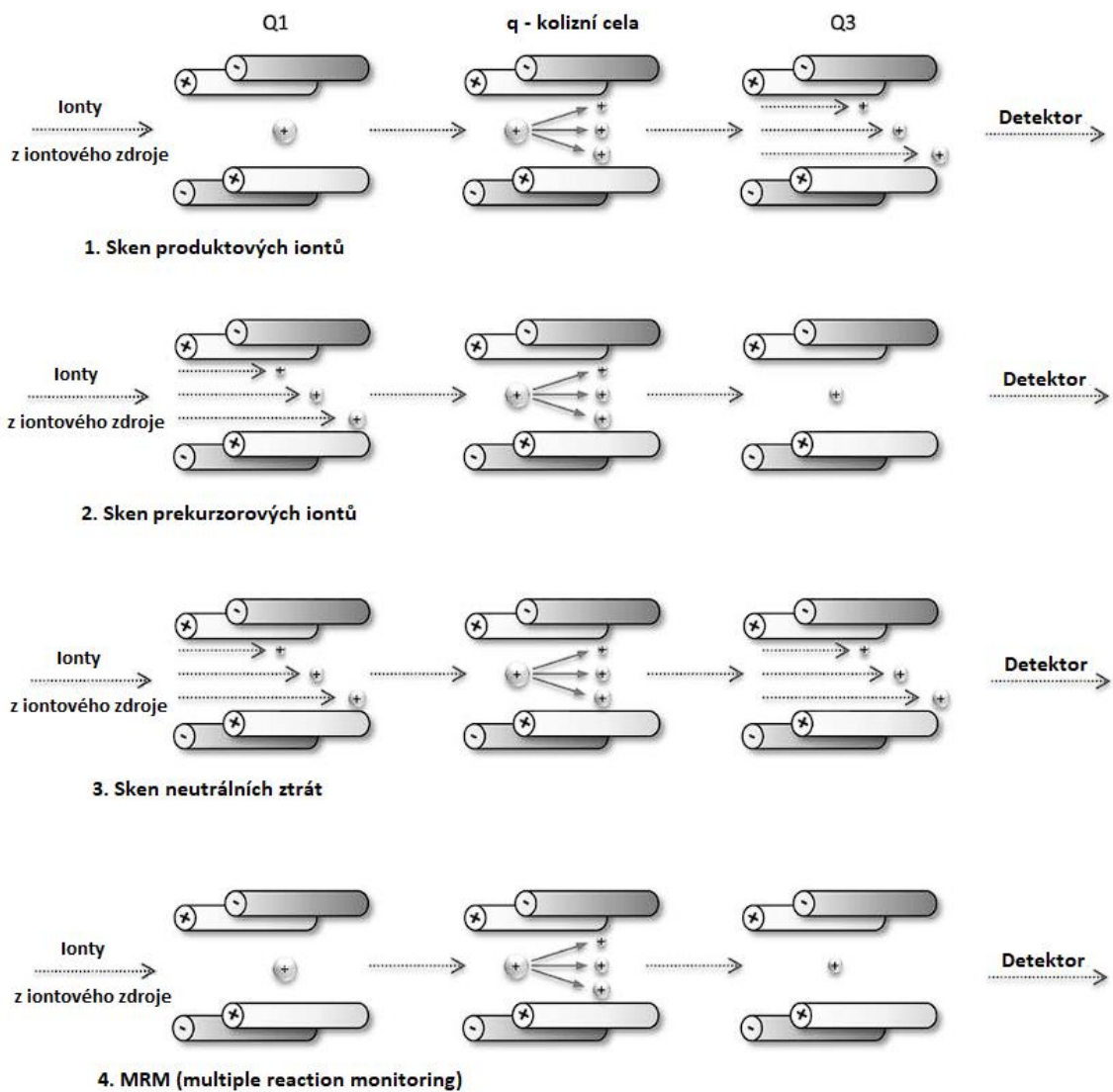
Díky tandemovému uspořádání, spojující 3 kvadrupólové analyzátoři, je možné využít čtyři různé skenovací módy, při kterých je využita fragmentace molekuly. Existují taktéž módy, které fragmentaci nevyužívají, například SIR. Jedná se o techniku, při které dochází ke skenování jednoho vybraného iontu.

Obrázek č. 8 graficky znázorňuje průběh 4 skenovacích módů.

- **Sken produktových iontů** – Jedná se o typ skenu, který napomáhá k objasnění struktury neznámých látek, či k potvrzení identity známých analytů. Při skenování dochází ke skenu prekurzorového iontu v Q1, který je následně fragmentován a jeho produktové (fragmentační) ionty jsou analyzovány v Q2, kde je zaznamenána jejich hodnota m/z . Výsledné hmotnostní spektrum produktových iontů podává informace o chemické struktuře a lze jej taktéž porovnat s knihovnou MS spekter.
- **Sken prekurzorových iontů** – Při skenování prekurzorů je hmotnostní spektrometr Q2 nastaven na skenování specifické hodnoty m/z , která odpovídá známému produktovému

iontu sledované látky. Q1 je naopak nastaven na snímání celého rozsahu hodnot m/z . Ionty zaznamenaný v Q1 postupně procházejí fragmentací za vzniku produktových iontů. V Q2 je signál zaznamenaný pouze tehdy pokud se z prekurzorového iontu po fragmentaci vytvoří známý fragment produktový o specifické hodnotě m/z . Spektrum skenování prekurzoru poskytuje informace o přítomnosti sledovaného prekurzorového iontu ve vzorku. Tato technika je užitečná pro detekci a identifikaci specifických sloučenin, jako jsou léčiva nebo jejich metabolity, v komplexních biologických matricích.

- **Sken neutrálních ztrát** – Skenování neutrálních ztrát je technika, při které se u sloučenin podléhající fragmentaci objevují specifické neutrální ztráty. Spektrometr je během této techniky nastaven tak že oba kvadrupóly jak Q1 tak Q2 skenují s diferencí odpovídající požadované neutrální ztrátě. Jedná se například o odštěpení vody či amoniaku z prekurzorových iontu. Spektrum neutrálních ztrát postě poskytuje informace o přítomnosti daných chemických sloučenin ve struktuře analytu.
- **MRM (multi reaction monitoring)** – Je cílená technika hmotnostní spektrometrie, která se používá k identifikaci a kvantifikaci specifických analytů. Při MRM skenu jsou specifické prekurzorové ionty vybrány a následně fragmentovány na ionty produktové pomocí kolizí indukované disociace (CID). Prekurzorový a produktový iont je vybrán na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z) a charakteristického fragmentačního vzorce pro daný analyt. Hmotnostní spektrometr pak sleduje signály dceřiných iontů ve specifických retenčních časech a tím kvantifikuje analyt, který je předmětem zájmu. Využití má tato metoda zejména v proteomice, kde kvantifikuje specifické peptidy v komplexních směsích. [33]



Obrázek 8 Skenovací módy v tandemové hmotnostní spektrometrii. Obrázek převzat a upraven z [36]

6 Validace

Kapitola zabývající se validací je blíže popsána v bakalářské práci – Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

Experimentální část

7 Nastavení kapalinového chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro simultánní analýzu léčiv ze séra

7.1 Příklad

Analýzy LC-MS/MS byly provedeny na systému Acquity H-Class Plus (Waters, Milford, USA) připojeného k trojitému kvadrupólu XEVO TQ-S cronos (Waters, Manchestr, UK).

7.2 Chemikálie

- Demineralizovaná voda (vyráběna stanicí Aqual 300 MB profi)
- Methanol (MeOH) (LC-MS čistota, VWR)
- Octan amonný $\geq 99\%$ (LC-MS čistota, VWR)
- 25% roztok kyseliny chloristé (HClO_4) byl připraven ze 70 % HClO_4 (Merck)
- 0.5 M amonný roztok ve vodě ($\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$) byl připraven z 25% roztoku hydroxidu amonného (Sigma-Aldrich)
- sérum od zdravých dobrovolníků neobsahující sledované látky z krevního centra (FN Ostrava)
- patientské vzorky séra z oddělení klinické farmakologie (Ústav laboratorní medicíny FN Ostrava)
- komerční QC kontroly od firmy RECIPE a CHROMSYSTEMS

7.3 Koncentrace zásobních standardů (STD)

Některé analyty byly naváženy a rozpuštěny (substance látek) nebo zaslány výrobcem již rozpuštěné v metanolu. Tabulka 29 uvádí přehled jednotlivých zásobních roztoků analytů, výrobce a jejich látkové koncentrace. Tyto zásobní roztoky byly skladovány při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Z těchto jednotlivých roztoků byly následně vytvořeny směsi látek, které jsou uvedeny v kapitole 7.10.1.

Tabulka 29 Přehled koncentrací zásobních standarů látek (mg/mL) a jejich výrobce. Analyty byly rozpuštěny v methanolu s výjimkou Sulthiamu, který byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu

Analyt	Výrobce	Koncentrace zásobního STD (mg/mL)
Pregabalin	TRC Canada	1
Levetiracetam	TRC Canada	1
Gabapentin	TRC Canada	1
Theofylin	Sigma Aldrich	2
Zonisamid	Sigma Aldrich	1
Brivaracetát	TRC Canada	1
Primidon	TRC Canada	1
Acyklovir	Sigma Aldrich	2
Karbamazepin	Sigma Aldrich	1
Rufinamid	TRC Canada	1
8-hydroxy acyclovir	Sigma Aldrich	0.05
Lacosamid	Sigma Aldrich	1
Fenytoin	Sigma Aldrich	1
Epoxykarbamazepin	Sigma Aldrich	1
Stiripentol	TRC Canada	1
Eslikarbamazepin	Sigma Aldrich	1
Lamotrigin	TRC Canada	1
O-desmethyl venlafaxin	TRC Canada	0.1
Mirtazapin	TRC Canada	0.1
Nordiazepam	TRC Canada	0.1
Venlafaxin	Sigma Aldrich	0.1
Diazepam	TRC Canada	0.05
Norklobazam	TRC Canada	0.1
Sulthiam	TRC Canada	1
N-desmethyl sertralin	Sigma Aldrich	0.091
N-desmethyl olanzapin	Sigma Aldrich	0.1
Vortioxetin	Sigma Aldrich	0.0944
Klobazam	TRC Canada	0.1
Sertralin	TRC Canada	0.1
Flukonazol	TRC Canada	1
Alprazolam	TRC Canada	0.1
N-desmethyl citalopram	Sigma Aldrich	0.1
N-desmethyl klozapin	Sigma Aldrich	0.1
Olanzapin	TRC Canada	0.1
Bromazepam	TRC Canada	0.1
Klonazepam	TRC Canada	0.1
Lorazepam	TRC Canada	0.1

Pokračování tabulky 29 Přehled koncentrací zásobních standarů látek (mg/mL) a jejich výrobce. Analyty byly rozpuštěny v methanolu s výjimkou Sulthiamu, který byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu

Analyt	Výrobce	Koncentrace zásobního STD (mg/mL)
Citalopram	Sigma Aldrich	0.1
Klozapine	TRC Canada	0.1
Paroxetine	TRC Canada	0.1
Vorikonazole	Sigma Aldrich	0.5
Perampanel	TRC Canada	1
Topiramate	Sigma Aldrich	1
Amisulprid	Sigma Aldrich	0.1
Trazodon	TRC Canada	1
Haloperidol	Sigma Aldrich	0.1
Quetiapin	TRC Canada	0.1
Risperidon	Sigma Aldrich	0.1
Ziprasidon	Sigma Aldrich	0.1
9-hydroxy risperidon	TRC Canada	0.1
Flufenazin	TRC Canada	0.1
Flupentixol	TRC Canada	0.1
Dehydro aripiprazol	Sigma Aldrich	0.1
Aripiprazol	TRC Canada	0.1
Methotrexat	TRC Canada	0.454
7-hydroxy methotrexat	TRC Canada	0.3214
Desmethyl amiodaron	Sigma Aldrich	0.1
Amidaron	Sigma Aldrich	2
Posakonazol	Sigma Aldrich	0.16
Itrakonazol	Sigma Aldrich	2
Kyselina valproová	TRC Canada	1.43
Fenobarbital	TRC Canada	1

7.4 Koncentrace vnitřních standardů

Pro simultánní stanovená vybraných léčiv byla použita technika vnitřního standardu. Tabulka č. 30 obsahuje seznam jednotlivých vnitřních standardů a jejich koncentrací v metanolvém zásobním roztoku. Výrobce těchto standardů byla společnost TRC Canada.

Tabulka 30 Přehled koncentrací vnitřních standardů(ng/mL)v methanolu ve směsném zásobním roztoku.

Vnitřní standard	Koncentrace (ng/mL)
Olanazpain-d8	566
Paroxetin-d6	141,52
Citalopram-d6	177
Risperidon-d4	141.5
Venlafaxin-d6	141,6
Kvetiapin-d8	818
Sertralin-d3	158,53
Aripiprazol-d8	356,6
Klozapin-d8	566
Vortioxetin-d8	179
Alprazolam-d3	42,4
Klobazam-13C ₆	283
Klonazepam-13C ₂ , 15N	42,6
Lorazepam-d4	283
Fenobarbital-d5	28300
Karbamazepin-13C ₆	1415
Lakosamid-13C, d3	7078
Lamotrigin-13C, 15N ₄	708
Levetiracetam-d6	28300
Pregabalin-d4	1414
Stiripentol-d9	14160
Sultiam-d4	7080
Topiramát-d12	7075
Zonisamid-d4	14160
Alprenolol	28300
Meclonazepam	124,2
Tamoxifen	7072
Ascomycin	566,4
B-hydroxyethyl theofylin	28300

V tabulce č. 31 jsou uvedeny analyty a k nim přiřazeny vnitřní standardy (IS), které byly použity pro jejich kvantifikaci v lidském séru pomocí LC-MS/MS.

Tabulka 31 Seznam analytů a jejich vnitřních standardů použitých pro jejich kvantifikaci.

Analyt	IS
Pregabalin	Pregabalin-d4
Levetiracetam	Levetiracetam-d6
Gabapentin	Pregabalin-d4
Theofylin	B-hydroxyethyl theofylin

Pokračování tabulky 31 Souhrn analytů a jejich vnitřních standardů použitých při kvantifikaci.

Analyt	IS
Zonisamid	Zonisamid-d4
Brivaracetát	Fenobarbital-d5
Primidon	Lakosamid-13C, d3
Acyklovir	VYŘAZENO
Karbamazepin	Karbamazepin-13C ₆
Rufinamid	Lakosamid-13C, d3
8-hydroxy acyclovir	VYŘAZENO
Lacosamid	Lakosamid-13C, d3
Fenytoin	Alprenolol
Epoxykarbamazepin	Karbamazepin-13C ₆
Stiripentol	Stiripentol-d9
Eslikarbamazepin	Topiramát-d12
Lamotrigin	Lamotrigin-13C, 15N ₄
O-desmethyl venlafaxin	Venlafaxin-d6
Mirtazapin	Klozapin-d8
Nordiazepam	Klozapin-d8
Venlafaxin	Venlafaxin-d6
Diazepam	Meclonazepam
Norklobazam	Klobazam-13C ₆
Sulthiam	Sultiam-d4
N-desmethyl sertralin	Sertralin-d3
N-desmethyl olanzapin	Olanazpain-d8
Vortioxetin	Vortioxetin-d8
Klobazam	Klobazam-13C ₆
Sertralin	Sertralin-d3
Fluconazol	Lakosamid-13C, d3
Alprazolam	Alprazolam-d3
N-desmethyl citalopram	Citalopram-d6
N-desmethyl klozapin	Klozapin-d8
Olanzapin	Olanazpain-d8
Bromazepam	VYŘAZENO
Klonazepam	Klonazepam-13C ₂ , 15N
Lorazepam	Lorazepam-d4
Citalopram	Citalopram-d6
Klozapin	Klozapin-d8
Paroxetin	Paroxetin-d6
Vorikonazol	Meclonazepam
Perampanel	Karbamazepin-13C ₆
Topiramat	Topiramát-d12
Amisulprid	Zonisamid-d4
Trazodon	Kvetiapin-d8
Haloperidol	Meclonazepam

Pokračování tabulky 31 Souhrn analytů a jejich vnitřních standardů použitých při kvantifikaci.

Analyt	IS
Quietiapin	Kvetiapin-d8
Risperidon	Risperidon-d4
Ziprasidon	Vortioxetin-d8
9-hydroxy risperidon	Risperidon-d4
Flufenazin	Aripiprazol-d8
Flupentixol	Aripiprazol-d8
Dehydro aripiprazol	Aripiprazol-d8
Aripiprazol	Aripiprazol-d8
Methotrexat	VYŘAZENO
7-hydroxy methotrexat	VYŘAZENO
Desmethyl amidaron	VYŘAZENO
Amidaron	VYŘAZENO
Posakonazol	Ascomycin
Itrakonazol	Ascomycin
Kyselina valproová	Alprenolol
Fenobarbital	Fenobarbital-d5

V seznamu analytů a jejich IS (tabulka č. 31) je pro analyty: acyklovir a jeho metabolit, bromazepam, methotrexát a jeho metabolit, amidaron a jeho metabolit uvedeno: VYŘAZENO. Bylo to z důvodu toho, že tyto analyty byly na konec vyřazeny z metody a nebyly tedy validovány.

7.5 Seznam komerčních QC kontrol

Pro ověření aplikovatelnosti nově vyvinuté metody byly použity komerční QC kontroly od firmy RECIPE a CHROMSYSTEMS. Tabulka č. 32 obsahuje názvy těchto externích komerčních kontrol. V tabulkách č. 33 až 53 jsou uvedeny názvy analytů v jednotlivých kontrolách, jejich deklarovaná koncentrace a přijatelné rozmezí koncentrací.

Tabulka 32 Seznam komerčních kontrol

Č.	Seznam komerčních kontrol
1	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Antimycotics, lyophil., Level I., II.
2	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Antidepressants, lyophil., Level I., II.
3	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Antiepileptics 5, lyophil., Level I., II.
4	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Levetiracetam, lyophil., Level I., II.
5	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Antiepileptics 4, lyophil., Level I., II.
6	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Antihistaminics, lyophil., Level I., II.
7	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Benzodiazepines, lyophil., Level I., II.
8	RECIPE – ClinCheck – Serum control for Neuroleptics, lyophil., Level I., II.
9	CHROMSYSTEMS – MassTox – Multilevel Plasma Calibrator Set – Antidepressants 2
10	CHROMSYSTEMS – MassTox – Multilevel Plasma Calibrator Set – Antiepileptics 2

Tabulka 33 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PREGA, LEV, GABAP

Analyt	Pregabalin		Levetiracetam		Gabapentin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (mg/L)	1,25	9,45	13,8	47,4	4,02	19,5
Rozmezí	1,0-1,5	7,56-11,3	11,0-16,5	37,9-56,8	3,22-4,82	15,6-23,4

Tabulka 34 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – THEO, ZNA

Analyt	Theofylin			Zonisamid	
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (mg/L)	5,93	15,2	30,2	7,93	34,2
Rozmezí	4,73-7,13	12,2-18,2	24,2-36,2	6,34-9,52	27,4-41,0

Tabulka 35 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – BRIV, PD

Analyt	Brivaracetat		Primidon		
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 3
Deklarovaná hodnota (mg/L)	0,793	3,76	4,35	18,8	28,5
Rozmezí	0,634-0,952	3,01-4,51	3,48-5,22	15,1-22,6	22,8-34,2

Tabulka 36 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CMZ, RUFIN

Analyt	Karbamazepin			Rufinamid	
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (mg/L)	4,73	14,2	19,1	7,47	34,2
Rozmezí	3,78-5,68	11,3-17	15,3-23	6,34-9,52	27,4-41,0

Tabulka 37 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – LAKO, DPH, EPO-CMZ

Analyt	Lacosamid		Fenytoin		Epoxykarbamazepin		
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 3
Deklarovaná hodnota (mg/L)	1,82	8,23	5,52	16,5	1,96	5,38	7,98
Rozmezí	1,46-2,18	6,58-9,88	4,42-6,62	13,2-19,8	1,57-2,35	4,3-6,46	6,38-9,58

Tabulka 38 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – STIRI, ESLI-CMZ, LAM

Analyt	Stiripentol		Eslikarbamazepin		Lamotrigin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (mg/L)	5,43	18,7	8,07	32,9	3,24	12,9
Rozmezí	4,34-6,52	15-22,4	6,46-9,68	26,3-39,5	2,59-3,89	10,3-15,5

Tabulka 39 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-VEN, MRT, N-DIA

Analyt	O-desmethyl venlafaxin		Mirtazapin		Nordiazepam	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	109	251	35,5	83,4	226	736
Rozmezí	87,4-131	201-301	28,4-42,6	66,7-100	181-271	588-883

Tabulka 40 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – VEN, DIA, N-CLB

Analyt	Venlafaxin		Diazepam		Norklobazam	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	61,6	142	312	991	827	2883
Rozmezí	49,3-73,9	113-170	250-374	793-1190	662-933	2307-3460

Tabulka 41 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-SER, d-OLA, VTX

Analyt	N-desmethyl sertralin		N-desmethyl olanzapin		Vortioxetin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	39,2	87,3	25,3	64,2	6,92	49,8
Rozmezí	29,4-49,1	65,4-109	20,2-30,3	51,4-77	6,33-7,51	46,47-53,13

Tabulka 42 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CLB, SER, ALPRA

Analyt	Klobazam		Sertralin		Alprazolam	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	8,09	65,4	29,2	152	15,7	53,2
Rozmezí	6,47-9,71	52,3-78,5	23,3-35	122-182	12,6-18,9	42,6-63,8

Tabulka 43 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – d-CIT, d-CLZ, OLA

Analyt	N-desmethyl citalopram		N-desmethyl klozapin		Olanzapin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	51,6	121	182	425	30,1	72,3
Rozmezí	41,2-61,9	96,9-145	146-218	340-510	24,1-36,2	57,9-86,6

Tabulka 44 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – BROMA, CLO, LORA

Analyt	Bromazepam		Klonazepam		Lorazepam	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	95,3	322	8,09	65,4	59,5	191
Rozmezí	76,3-114	257-386	6,47-9,71	52,3-78,5	47,6-71,4	153-229

Tabulka 45 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – CIT, CLZ, PAR

Analyt	Citalopram		Klozapin		Paroxetin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	44,6	104	244	570	42,1	97,9
Rozmezí	35,7-53,5	83-125	195-293	456-684	33,7-50,5	78,3-117

Tabulka 46 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PERAM, RIS, AMS

Analyt	Perampanel		Risperidon		Amisulprid	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	183	1248	27,3	65,7	141	325
Rozmezí	147-221	998-1498	21,8-32,7	52,5-78,8	113-169	260-390

Tabulka 47 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – TRZ, HLP, QUE

Analyt	Trazodon		Haloperidol		Kvetiapin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	555	1247	2,51	5,99	155	354
Rozmezí	444-665	998-1497	2,01-3,01	4,79-7,18	124-186	283-424

Tabulka 48 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – ZIP, d-RISP, FLF

Analyt	Ziprasidon		9-hydroxy risperidon		Flufenazin	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	66,2	156	27,7	63,7	2,53	5,82
Rozmezí	52,9-79,4	124-187	22,2-33,3	50,9-76,4	2,02-3,03	4,66-7,35

Tabulka 49 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – FLP, d-ARP, ARP

Analyt	Flupentixol		Dehydro aripiprazol		Aripiprazol	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (ng/mL)	2,46	6,12	43,2	104	222	507
Rozmezí	1,97-2,95	4,9-7,35	34,5-51,8	83,5-125	178-266	406-608

Tabulka 50 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – POSA, ITRA, FLUKO

Analyt	Posakonazole		Itraconazole		Flukonazole	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (µg/mL)	0,894	2,07	0,569	1,37	2,75	6,40
Rozmezí	0,716-1,07	1,65-2,48	0,455-0,683	1,10-1,65	2,20-3,30	5,12-7,68

Tabulka 51 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – SUL, VPA

Analyt	Sulthiam		Kys. valproová		
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 3
Deklarovaná hodnota (µg/mL)	1,69	10,5	35	76,3	112
Rozmezí	1,35-2,03	8,4-12,6	28,1-41,9	61,0-91,6	91-133

Tabulka 52 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – VORI, TOP

Analyt	Vorikonazol		Topiramát	
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
Deklarovaná hodnota (µg/mL)	1,12	2,66	3,51	8,25
Rozmezí	0,895-1,34	2,13-3,19	2,81-4,21	6,6-9,9

Tabulka 53 Tabulka s deklarovanými hodnotami kontrol a jejich rozmezí pro dané analyty – PB

Analyt	Fenobarbital		
	Level 1	Level 2	Level 3
Level			
Deklarovaná hodnota (µg/mL)	9,76	38,5	5,38
Rozmezí	7,81-11,7	30,8-46,2	39,4-59,1

7.6 Ostatní materiál

Pracovní pomůcky: Rukavice, zkumavky, stojany, vialky, kádinky, skleněné pipety, automatické pipety, špičky, analytické váhy, chlazená centrifuga, ultrazvuk, vortex, eppendorfky, cryo zkumavky, balónek pro pipetování.

7.7 Kolona

Pro validaci metody a analýz QC kontrol a patientských vzorků séra byla použita kolona Acquity UPLC BEH C-18 (100 x 2.1 mm; 1.7µm) od firmy Waters. Kolona obsahovala ještě před kolonový filtr.

7.8 Mobilní fáze

Tabulka č. 54 uvádí složení použité mobilní fáze.

Tabulka 54 Složení použité mobilní fáze C a mobilní fáze D.

MF	Složení
C	2mM octan amonný ve vodě
D	2mM octan amonný v methanolu

7.9 Nastavení chromatografických podmínek

V tabulce 55 jsou uvedeny hodnoty nastavení kapalinového chromatografu a použitý gradient eluce (tabulka 56).

Tabulka 55 Nastavení chromatografických podmínek

Nastavení podmínek analýzy	
Mobilní fáze	C:D
Průtok (ml/min.)	0.4
Typ eluce	Gradientová*
Nástřik (µL)	3
Teplota autosampleru (°C)	10
Teplota kolony (°C)	50

Tabulka 56 Nastavení gradientu mobilní fáze C a mobilní fáze D

Nastavení gradientu			
čas (min.)	průtok (mL/min.)	MF C (%)	MF D (%)
0.00	0.4	80	20
0.50	0.4	70	30
1.00	0.4	50	50
4.00	0.4	30	70
6.00	0.4	10	90
7.00	0.4	0	100
8.00	0.4	5	95
8.10	0.4	80	20
10.00	0.4	80	20

7.10 Nastavení MS

V tabulce č. 57 jsou uvedeny hodnoty pro nastavení MS instrumentu. Teplota iontového zdroje byla pro oba režimy polarity nastavena na 150 °C.

Tabulka 57 Nastavení hmotnostního analyzátoru: napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu pro elektrosprej v pozitivním módu (ESI+) a v negativní (ESI-)

Polarita	Napětí na kapiláře (kV)	Desolvatační teplota (°C)	Průtok plynu (L/hod.)
ESI +	1	600	900
ESI-	0,8	600	900

7.11 Příprava zásobních roztoků pro validaci

Pro přípravu kalibračních standardů byly látky rozděleny do pěti skupin dle jejich očekávaného terapeutického rozmezí. Byla vytvořena LOW, MEDIUM, HIGH, MEGA HIGH a VPA skupina analytů. Látky obsažené v jednotlivých pěti skupinách jsou uvedeny v tabulce č. 58. s tím, že VPA skupina obsahovala pouze kyselinu valproovou. Kvůli velkému terapeutickému rozmezí jsou některé látky ve více skupinách. Zásobní roztok LOW skupiny byl připraven naředěním směsí látek methanolem a výsledná koncentrace látek v ní obsažených byla 1600 ng/mL. MEDIUM zásobní roztok byl připraven o koncentraci 4000ng/mL. Koncentrace HIGH skupiny byla 24000 ng/mL, MEGA HIGH o koncentraci 90000 ng/mL a pro přípravu VPA kalibrace byl použit zásobní roztok kyseliny valproové o koncentraci 1,43 mg/mL.

Tabulka 58 Rozdělení látek do jednotlivých zásobních roztoků (skupin) podle terapeutického rozmezí předpokládané koncentrace v reálných vzorcích

LOW	MEDIUM	HIGH	MEGA HIGH
O-desmethyl venlafaxin	Pregabalin	Pregabalin	Levetiracetam
Mirtazapin	Gabapentin	Levetiracetam	Gabapentin
Nordiazepam	Brivaracetat	Gabapentin	Theophylin
Venlafaxin	Lacosamid	Theophyline	Zonisamid
Diazepam	Stiripentol	Zonisamid	Karbamazepin
Norklobazam	O-desmethyl venlafaxin	Primidon	Rufinamid
N-desmethyl sertralin	Nordiazepam	Karbamazepin	Fenytoin
N-desmethyl olanzapin	Venlafaxin	Rufinamid	Epoxykarbamazepin
Vortioxetin	Diazepam	Lacosamid	Eslikarbamazepin
Klobazam	Norklobazam	Fenytoin	Fluconazol
Sertralin	Sulthiam	Epoxykarbamazepin	Valproát
Alprazolam	N-desmethyl klozapin	Stiripentol	Fenobarbital
N-desmethyl citalopram	Klozapin	Eslikarbamazepin	
N-desmethyl klozapin	Voriconazol	Lamotrigin	
Olanzapin	Perampne	Nordiazepam	
Brmoazepam	Topiramat	Norklobazam	
Klonazepam	Trazodon	Sulthiam	
Lorazepam	Quietiapin	Fluconazol	
Citalopram	Dehydro aripiprazol	Voriconazol	
Klozapine	Methotrexat	Topiramat	
Paroxetin	7-hydroxy methotrexat	Amidaron	
Perampanel	Amidaron	Fenobarbital	
Amisulprid	Posaconazol		
Haloperidol	Itraconazol		
Quietiapin			
Risperidon			
Ziprasidon			
9-hydroxy risperidon			
Fluphenazin			
Fluphentixol			
Dehydro aripiprazol			
Aripiprazol			
Methotrexat			
7-hydroxy methotrexat			

7.11.1 Kalibrační standardy

Ze zásobních roztoků (LOW, MEDIUM, HIGH, MEGA HIGH, VPA) byly připraveny kalibrační standardy. Tabulka č. 59 uvádí metanolové a sérové koncentrace jednotlivých kalibračních standardů pro každou skupinu. V každé skupině bylo 15 kalibračních bodů, mimo VPA kalibrace, která byla 12 bodová. Kyselina valproová má svou vlastní kalibrační řadu, a to kvůli vysokým terapeutickým koncentracím. V tabulce 59, 60 a 61 je uvedena koncentrace jednotlivých standardů v metanolovém roztoku a také koncentrace v séru při nadávkování 100 µl standardu do 200 µl séra. (postup přípravy vzorku je v kapitole 7.12).

7.11.2 Kalibrační standardy

Tabulka 59 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro LOW a MEDIUM koncentrační hladinu. Kalibrační standardy jsou v MeOH.

LOW kalibrace			MEDIUM kalibrace		
Standard	Koncentrace v MeOH (ng/mL)	Koncentrace v krvi (ng/mL)	Standard	Koncentrace v MeOH (ng/mL)	Koncentrace v krvi (ng/mL)
STD 1	0,02	0,01	STD 1	0,1	0,05
STD 2	0,08	0,04	STD 2	0,2	0,1
STD 3	0,16	0,08	STD 3	0,4	0,2
STD 4	0,2	0,1	STD 4	1	0,5
STD 5	0,8	0,4	STD 5	2	1
STD 6	1,6	0,8	STD 6	4	2
STD 7	2	1	STD 7	10	5
STD 8	8	4	STD 8	20	10
STD 9	16	8	STD 9	40	20
STD 10	20	10	STD 10	100	50
STD 11	80	40	STD 11	200	100
STD 12	160	80	STD 12	400	200
STD 13	200	100	STD 13	1000	500
STD 14	800	400	STD 14	2000	1000
STD 15	1600	800	STD 15	4000	2000

Tabulka 60 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro HIGH a MEGA HIGH koncentračních hladin. Kalibrační standardy jsou v MeOH.

HIGH kalibrace			MEGA HIGH kalibrace		
Standard	Koncentrace v MeOH (ng/mL)	Koncentrace v krvi (ng/mL)	Standard	Koncentrace v MeOH (ng/mL)	Koncentrace v krvi (ng/mL)
STD 1	0,6	0,3	STD 1	2,25	1,125
STD 2	1,2	0,6	STD 2	4,5	2,25
STD 3	2,4	1,2	STD 3	9	4,5
STD 4	6	3	STD 4	22.5	11,25
STD 5	12	6	STD 5	45	22,5
STD 6	24	12	STD 6	90	45
STD 7	60	30	STD 7	225	112,5
STD 8	120	60	STD 8	450	225
STD 9	240	120	STD 9	900	450
STD 10	600	300	STD 10	2250	1125
STD 11	1200	600	STD 11	4500	2250
STD 12	2400	1200	STD 12	9000	4500
STD 13	6000	3000	STD 13	22500	11250
STD 14	12000	6000	STD 14	45000	22500
STD 15	24000	12000	STD 15	90000	45000

Tabulka 61 Tabulka methanolových kalibračních standardů pro VPA koncentrační hladinu. Kalibrační standardy jsou v MeOH.

VPA kalibrace		
Standard	Koncentrace v MeOH (ng/mL)	Koncentrace v krvi (ng/mL)
STD 1	62,5	31,25
STD 2	125	62,5
STD 3	250	125
STD 4	625	312,5
STD 5	1250	625
STD 6	2500	1250
STD 7	6250	3125
STD 8	12500	6250
STD 9	25000	12500
STD 10	62500	31250
STD 11	125000	62500
STD 12	250000	125000

7.12 Úprava vzorku

Objem 200 μL séra byl napipetován do 10 ml skleněné zkumavky. Po přidání 100 μL kalibračního standardu, 50 μL směsného vnitřního standardu (koncentrace jednotlivých látek v roztoků je uvedena v tabulce 30) a 20 μL 25 % HClO_4 byly vzorky vortexovány po dobu 15 sekund. Následně bylo přidáno 20 μL 0,5M $\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$ a 50 μL H_2O . Směs byla míchána 15 sekund a posléze centrifugována po dobu 10 minut (4000 ot./min při 4°C). Po centrifugaci byla horní vrstva přenesena do vialky. Vzorky pacientů a externích komerčních kontrol byly připraveny stejným způsobem, ale bez přidání 100 μl kalibračního standardu.

8 Výsledky a diskuze

Během vývoje metody pro stanovení 62 látek (pregabalin, levetiracetam, gabapentin, theofylin, zonisamid, brivaracetát, primidon, acyklovir, karbamazepin, rufinamid, 8-hydroxy acyklovir, lakosamid, fenytoin, epoxykarbamazepin, stiripentol, eslikarbamazepin, lamotrigin, O-desmethyl venlafaxin, mirtazapin, N-desmethyl diazepam, venlafaxin, diazepam, N-desmethyl klobazam, sulthiam, N-desmethyl sertralin, N-desmethyl olanzapin, vortioxetin, klobazam, sertralin, flukonazol, alprazolam, N-desmethyl citalopram, N-desmethyl klozapin, olanzapin, bromazepam, klonazepam, lorazepam, citalopram, klozapin, paroxetin, vorikonazol, perampanel, topiramát, amisulprid, trazodon, haloperidol, kvetiapin, risperidon, ziprasidon, 9-hydroxy risperidon, flufenazin, flupentixol, dehydro aripiprazol, aripiprazol, methotrexát, 7-hydroxy methotrexát, desmethyl amidaron, amidaron, posakonazol, itrakonazol, kyselina valproová a fenobarbital) ze séra pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií byly optimalizovány podmínky kapalinové chromatografie, nastavení hmotnostního spektrometru a úprava séra s cílem nalezení vhodných podmínek pro stanovení těchto látek v jednom běhu (jediné LC-MS/MS analýze za použití jediné přípravy vzorku). Cílem bylo nastavení takových podmínek, aby nově vyvinutá metoda byla dostatečně citlivá a schopná kvantifikovat všechny látky v séru v koncentraci pod jejich terapeutickým rozmezím. Tato práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala vývojem metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie. [9]

8.1 Nastavení parametrů

8.1.1 Nastavení MRM přechodů

Experimentální část diplomové práce začínala nalezením vhodných MRM přechodů vybraných látek.

Tyto přechody byly buď:

- a. převzaty z literatury – z aplikačního listu společnosti Waters [37]
- b. převzaty z původních analytických metod používaných na oddělení klinické farmakologie
- c. nalezeny pomocí funkce IntelliStart, kterou disponuje software MassLynx
- d. experimentálně zjištěny manuálním laděním pomocí post kolonového zavádění (0,2 ml/min) roztoků standardů za použití koncentrace (500 ng/ml) pro každou látku

rozpuštěného v 50 % methanolu. Byl použit průtok 0,2 ml/min a složení mobilní fáze A:B v poměru 50:50, složení MF je uvedeno v tabulce 54

Pro každý analyt byly vybrány 2 přechody s výjimkou acykloviru a jeho metabolitu 8-hydroxy acykloviru u kterých byl nastaven pouze jeden přechod. Nejintenzivnější z přechodů byl využit jako kvantifikační přechod pro danou látku. Nastavení hmotnostního analyzátoru, pro vyhledání MRM přechodů pomocí manuálního ladění, vycházelo z aplikačního listu firmy Waters viz tabulka 62. [37]

Tabulka 62 Nastavení hmotnostního analyzátoru dle aplikačního listu firmy Waters. [37]

Akviziční mód	MRM
Polarita	ESI +/ ESI-
Napětí na kapiláře	3.5kV (ESI+) / 0.8 (ESI-)
Teplota zdroje	150°C
Desolvatační teplota	500°C
Průtok plynu kónem	100L/hod.

V následující tabulce 63 jsou uvedeny nejintenzivnější MRM přechody vybraných léčiv. Tyto přechody byly vybrány porovnáním ploch píků u výše uvedených experimentů.

Tabulka 63 Seznam vybraných analytů a jejich MRM přechodů společně s nastavením napětí na kónu (CV) a kolizní energii (CE), zvýrazněné přechody jsou přechody kvantifikační.

Analyt	Přechod	CV	CE
Pregabalin	160.05 => 97.10	24.00	16.00
	160.05 => 142.10	24.00	10.00
Levetiracetam	171.10 => 69.10	14.00	28.00
	171.10 => 126.10	14.00	14.00
Gabapentin	172.10 => 55.10	24.00	20.00
	172.10 => 154.10	24.00	14.00
Theofylin	181.03 => 69.05	18.00	24.00
	181.03 => 123.99	18.00	10.00
Zonisamid	212.95 => 77.10	28.00	30.00
	212.95 => 132.10	28.00	14.00
Brivaracetat	213.18 => 55.06	2.00	30.00
	213.18 => 83.12	2.00	26.00
Primidon	219.10 => 91.10	24.00	32.00
	219.10 => 162.10	24.00	12.00
Acyklovir	226.04 => 152.03	14.00	8.00

Pokračování tabulky 63 Seznam vybraných analytů a jejich MRM přechodů společně s nastavením napětí na kónu (CV) a kolizní energií (CE), zvýrazněné přechody jsou přechody kvantifikační.

Analyt	Přechod	CV	CE
Karbamazepin	237.10 => 165.10	34.00	34.00
	237.10 => 179.10	34.00	34.00
Rufinamid	239.10 => 126.98	24.00	12.00
	265.1 => 57.33	24.00	10.00
8-hydroxy acyklovir	240.03 => 152.03	14.00	10.00
Lakosamid	251.10 => 74.10	20.00	22.00
	251.01 => 91.10	20.00	18.00
Fenytoin	253.10 => 104.10	28.00	34.00
	253.10 => 182.10	28.00	16.00
Epoxykarbamazepin	253.10 => 180.10	30.00	30.00
	253.10 => 208.10	30.00	20.00
Stiripentol	253.24 => 57.07	8.00	28.00
	217.2 => 145.2	8.00	24.00
Elikarbamazepin	255.10 => 58.05	5.00	17.00
	255.10 => 237.20	5.00	6.00
Lamotrigin	255.95 => 145.10	50.00	38.00
	255.95 => 211.10	50.00	24.00
O-desmethyl venlafaxin	264.21 => 58.08	10.00	16.00
	264.24 => 107.07	10.00	30.00
Mirtazapin	266.13 => 72.11	14.00	16.00
	266.13 => 195.03	14.00	24.00
Nordazepam	271.00 => 165.00	50.00	28.00
	271.28 => 140.00	50.00	28.00
Venlafaxin	278.23 => 58.05	2.00	14.00
	278.23 => 121.05	2.00	24.00
Diazepam	285.10 => 154.04	10.00	26.00
	285.10 => 193.10	50.00	30.00
Norklobazam	287.00 => 245.00	35.00	20.00
	304.00 => 245.05	4.00	20.00
Sulthiam	289.54 => 57.07	25.00	14.00
	308.00 => 291.20	5.00	7.00
N-desmethyl sertralin	292.00 => 275.00	10.00	7.00
	292.08 => 158.99	16.00	22.00
N-desmethyl olanzapin	299.15 => 70.09	2.00	24.00
	299.15 => 212.99	2.00	24.00
Vortioxetin	299.16 => 109.01	12.00	38.00
	299.16 => 150.07	12.00	22.00

Pokračování tabulky 63 Seznam vybraných analytů a jejich MRM přechodů společně s nastavením napětí na kónu (CV) a kolizní energií (CE), zvýrazněné přechody jsou přechody kvantifikační.

Analyt	Přechod	CV	CE
Klobazam	301.00 => 259.00	35.00	20.00
	318.10 => 259.07	2.00	24.00
Sertralin	306.10 => 158.98	16.00	24.00
	306.10 => 275.04	16.00	10.00
Flukonazol	307.07 => 220.00	28.00	16.00
	307.20 => 238.20	28.00	14.00
Alprazolam	309.10 => 205.00	50.00	40.00
	309.11 => 281.14	14.00	24.00
N-desmethyl citalopram	311.12 => 109.01	18.00	14.00
	311.12 => 116.01	18.00	14.00
N-desmethyl klozapin	313.15 => 70.09	2.00	26.00
	313.15 => 192.05	2.00	40.00
Olanzapin	313.17 => 84.15	2.00	14.00
	313.17 => 256.10	2.00	12.00
Bromazepam	316.00 => 209.00	43.00	26.00
	316.03 => 182.07	2.00	24.00
Klonazepam	316.00 => 214.10	54.00	42.00
	316.01 => 270.05	14.00	20.00
Lorazepam	320.98 => 229.04	6.00	24.00
	320.98 => 275.03	6.00	18.00
Citalopram	325.19 => 109.00	2.00	20.00
	325.19 => 262.14	2.00	16.00
Klozapin	327.16 => 192.03	6.00	26.00
	327.16 => 270.09	6.00	8.00
Paroxetin	330.11 => 70.03	18.00	30.00
	330.11 => 192.11	18.00	20.00
Vorikonazol	350.08 => 127.04	18.00	32.00
	350.08 => 281.04	18.00	14.00
Perampanel	350.15 => 77.12	4.00	42.00
	350.15 => 219.08	4.00	26.00
Topiramát	357.13 => 264.04	10.00	12.00
	357.13 => 282.05	10.00	8.00
Amisulprid	370.14 => 112.07	4.00	22.00
	370.14 => 241.99	4.00	26.00
Trazodon	372.18 => 148.06	2.00	34.00
	372.18 => 176.10	2.00	22.00
Haloperidol	376.17 => 123.06	8.00	40.00
	376.17 => 165.09	8.00	20.00
Kvetiapin	384.19 => 221.12	4.00	36.00
	384.19 => 253.12	4.00	20.00

Pokračování tabulky 63 Seznam vybraných analytů a jejich MRM přechodů společně s nastavením napětí na kónu (CV) a kolizní energií (CE), zvýrazněné přechody jsou přechody kvantifikační.

Analyt	Přechod	CV	CE
Risperidon	411.23 => 68.99	2.00	52.00
	411.23 => 191.12	2.00	26.00
Ziprasidon	413.08 => 130.27	2.00	70.00
	413.08 => 194.04	2.00	24.00
9-hydroxy risperidon	427.23 => 110.05	26.00	28.00
	427.23 => 207.13	26.00	20.00
Flufenazin	435.20 => 100.30	10.00	28.00
	435.20 => 305.30	10.00	27.00
Flupentixol	438.20 => 143.30	10.00	30.00
	438.20 => 171.40	10.00	23.00
Dehydro aripiprazol	446.03 => 98.01	6.00	36.00
	446.03 => 285.09	6.00	18.00
Aripiprazol	448.18 => 98.07	2.00	36.00
	448.18 => 285.09	2.00	22.00
Methotrexat	455.14 => 134.05	6.00	32.00
	455.14 => 308.11	6.00	16.00
7-hydroxy methotrexat	471.13 => 191.05	2.00	20.00
	471.13 => 324.05	2.00	8.00
Desmethyl amiodaron	617.96 => 72.10	22.00	30.00
	617.96 => 546.93	22.00	18.00
Amidaron	646.05 => 58.05	2.00	48.00
	646.05 => 72.96	2.00	32.00
Posakonazol	701.29 => 119.02	32.00	70.00
	701.29 => 127.03	32.00	60.00
Itrakonazol	705.20 => 118.81	44.00	72.00
	705.20 => 392.24	44.00	32.00
Kyselina vlaproová	143.00 => 143.10	30.00	5.00
	189.02 => 143.05	2.00	4.00
Fenobarbital	231.00 => 42.00	15.00	12.00
	231.00 => 84.90	15.00	8.00

8.1.2 Nastavení hmotnostního analyzátoru

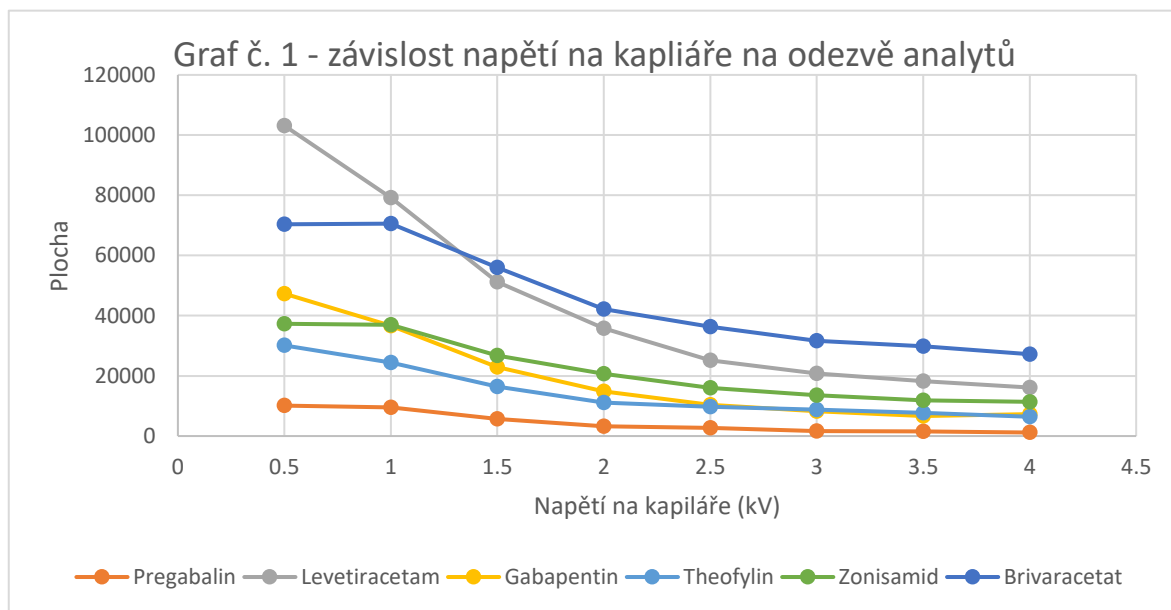
Jednalo se o optimalizaci hodnot: napětí na kapiláře (kV), desolvatační teploty a průtoku plynu. Snahou bylo nastavit výše uvedené parametry tak, abychom získali dostatečnou citlivost pro terapeutické monitorování všech látek v séru v jedné analýze.

Byla vytvořena směs všech látek o koncentraci 100 ng/mL v 10 % methanolu a postupně měněny hodnoty napětí na kapiláře (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 kV), desolvatační teplota (400; 450; 500; 550; 600 °C) a průtok plynu (700; 800; 900; 1000; 1100; 1200 L/hod) při nástřiku vzorku 10 µl (kapitola 8.1.2.1-8.1.2.3). Při tomto experimentu se vyhodnocovala plocha píků jednotlivých látek. Při určitém nastavení MS parametru byl každý vzorek analyzován 3x a výsledná hodnota byla kalkulována jako průměr těchto tří stanovení.

V následujícím textu bude zobrazeno grafické vyhodnocení odezvy detektoru (plochy píku) v závislosti na vybraných parametrech hmotnostního spektrometru.

8.1.2.1 Experiment napětí na kapiláře

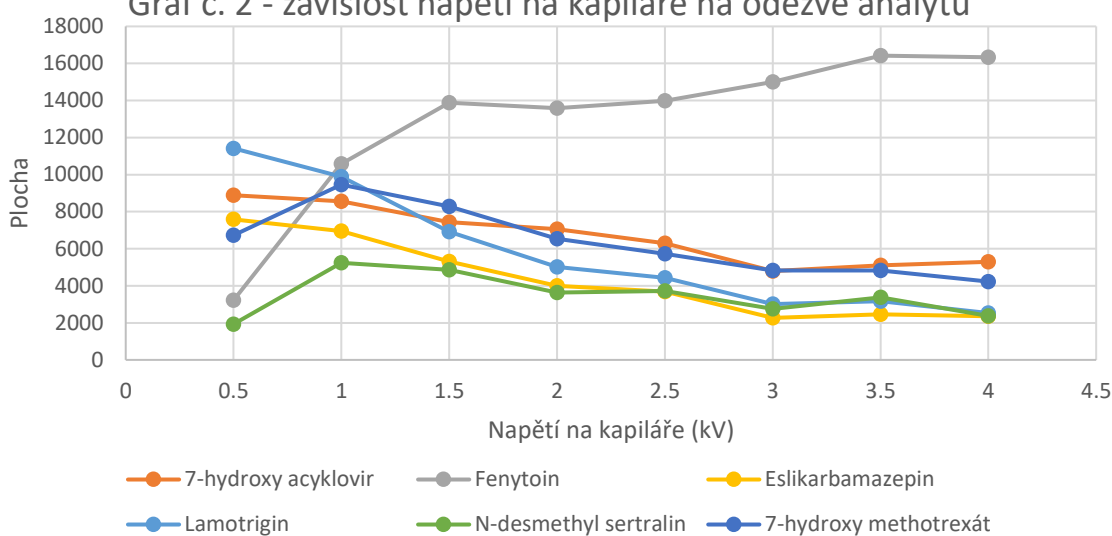
Následující grafy porovnávají změnu odezvy s narůstajícím napětím na kapiláře. Látky jsou v grafech rozděleny tak aby nedocházelo ke zkreslování dat, které by mohlo nastat kombinací analytů s nízkou a vysokou plochou píku.



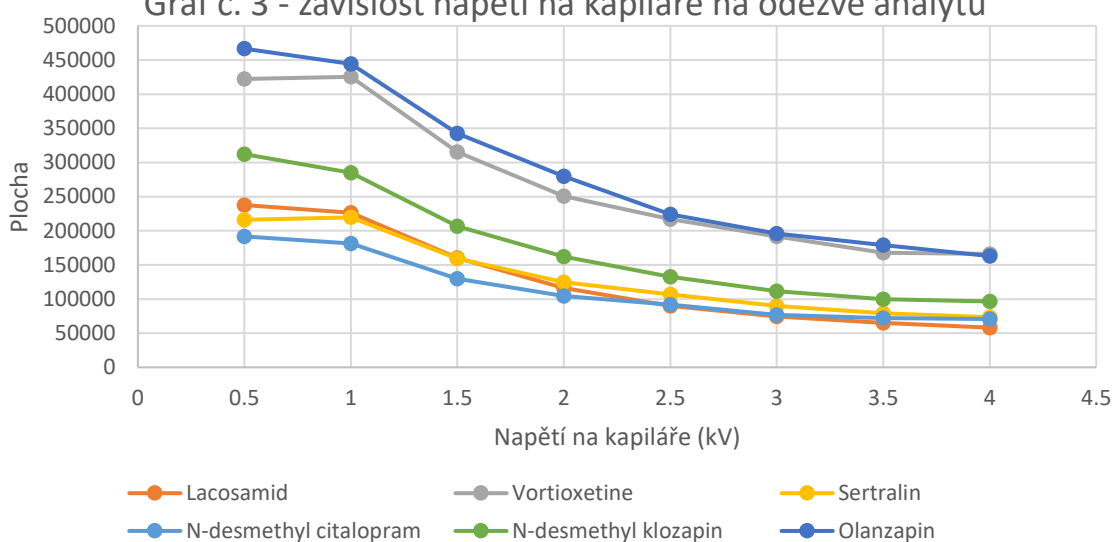
Graf 1 Závislost nastavení napětí na kapiláře na odezvě analytů – graf 1 až 10.

Graf číslo 1 až graf číslo 10 zobrazuje závislost plochy píků vybraných látek na nastavení hodnoty napětí na kapiláře (v kV) za podmínek pozitivní polarity elektrospreje (ESI +). Z uvedených grafů vyplývá, že plocha píků klesá s rostoucím napětím na kapiláře většiny vybraných látek. Výjimku tvoří fenytoin, který vykazuje největší plochu píku s hodnotou napětí na kapiláře 3,5 kV.

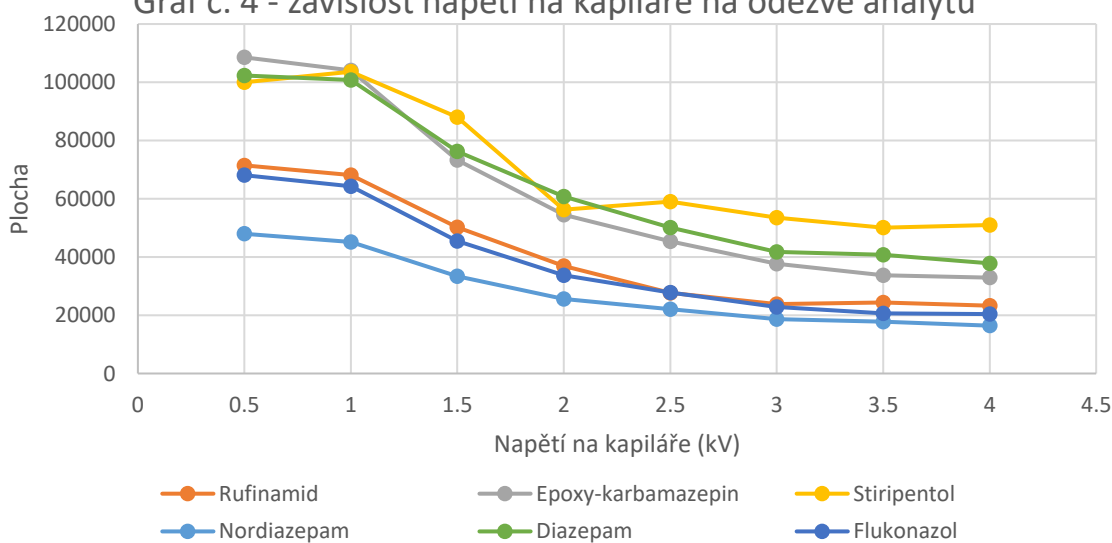
Graf č. 2 - závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů

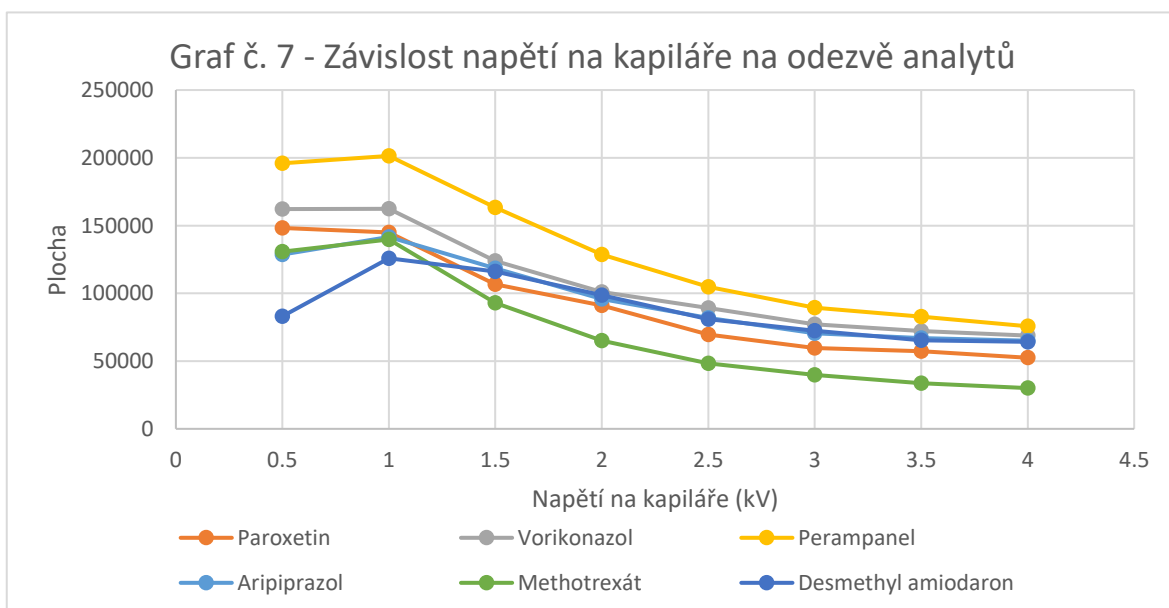
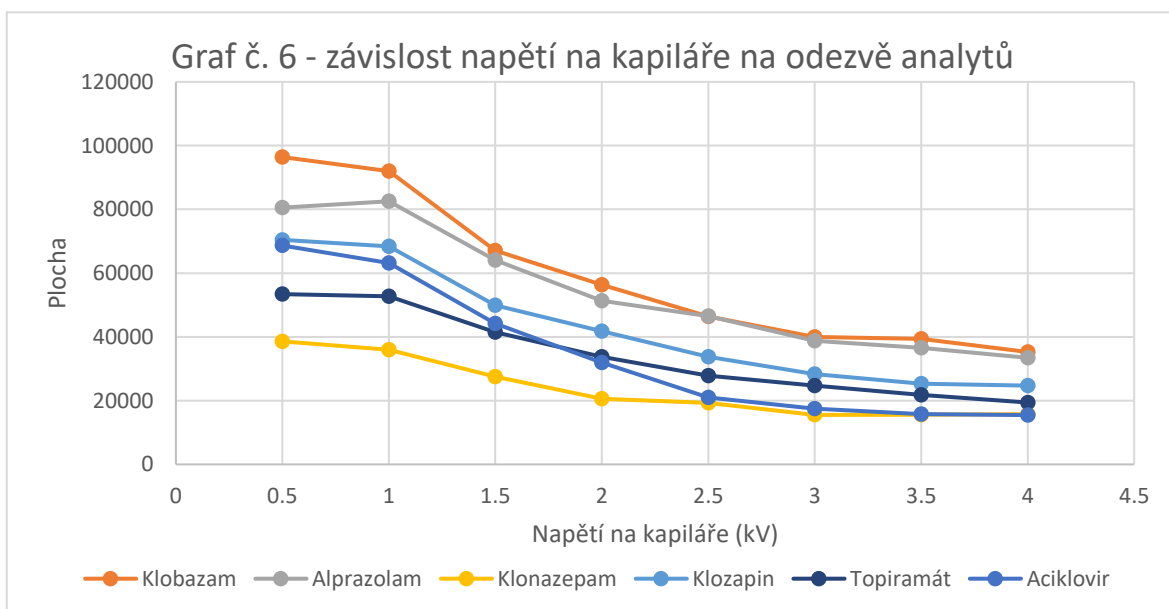
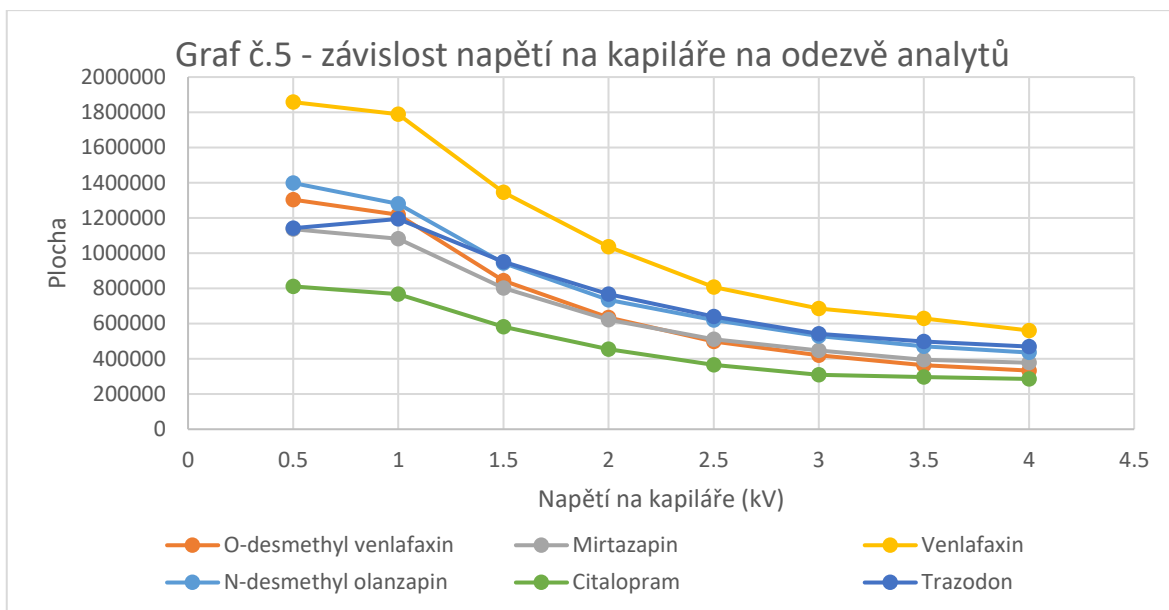


Graf č. 3 - závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů

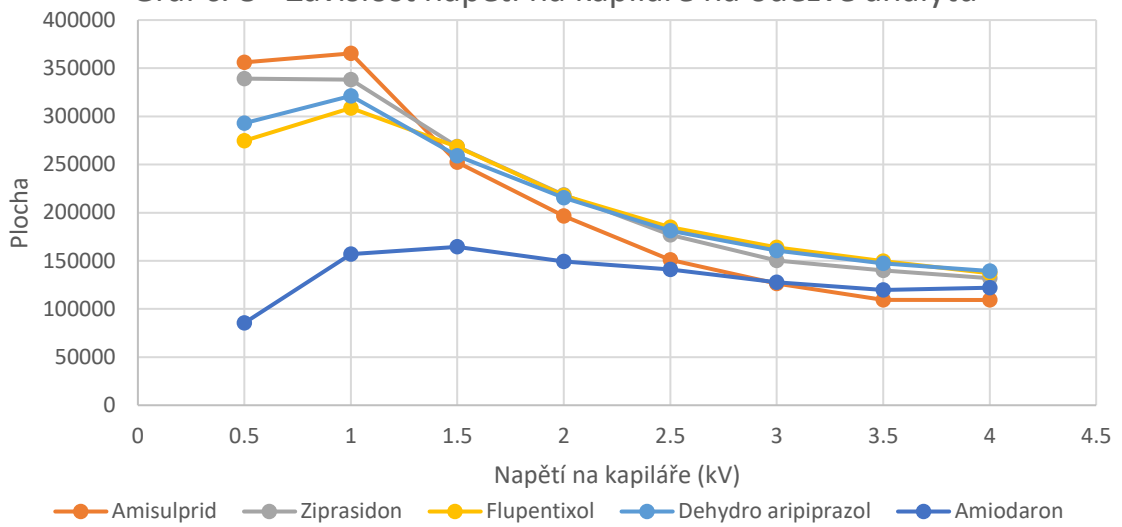


Graf č. 4 - závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů

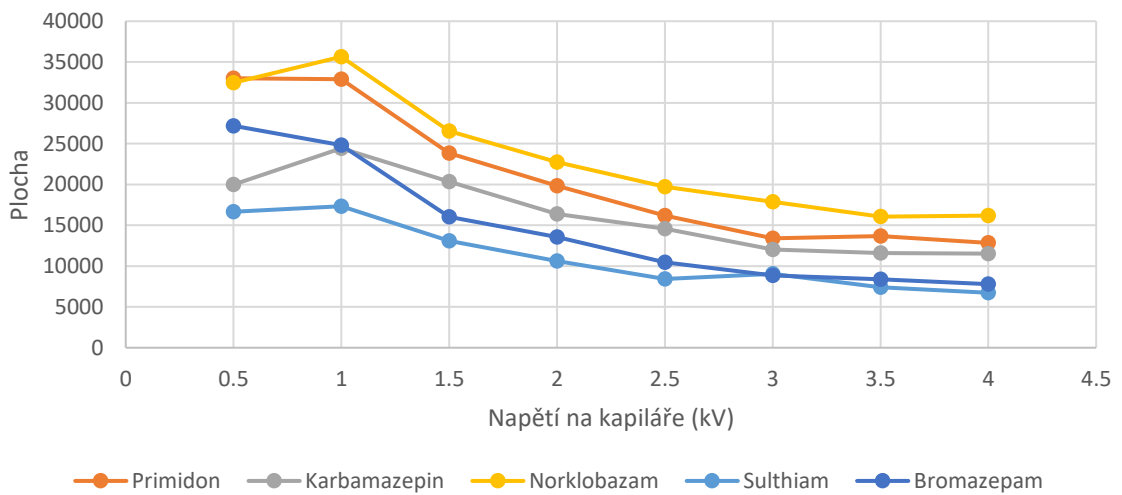




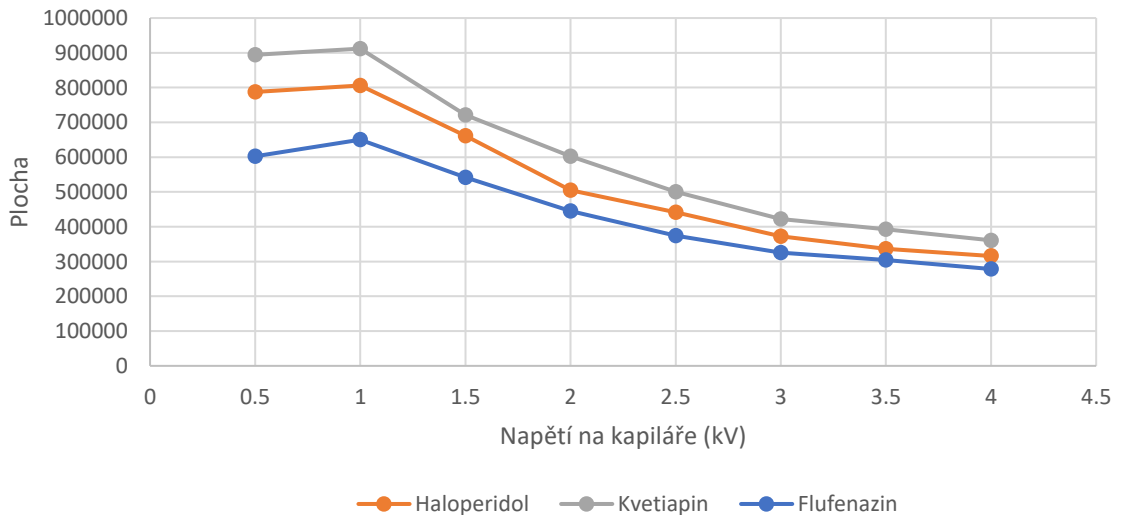
Graf č. 8 - Závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů



Graf č.9 - Závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů

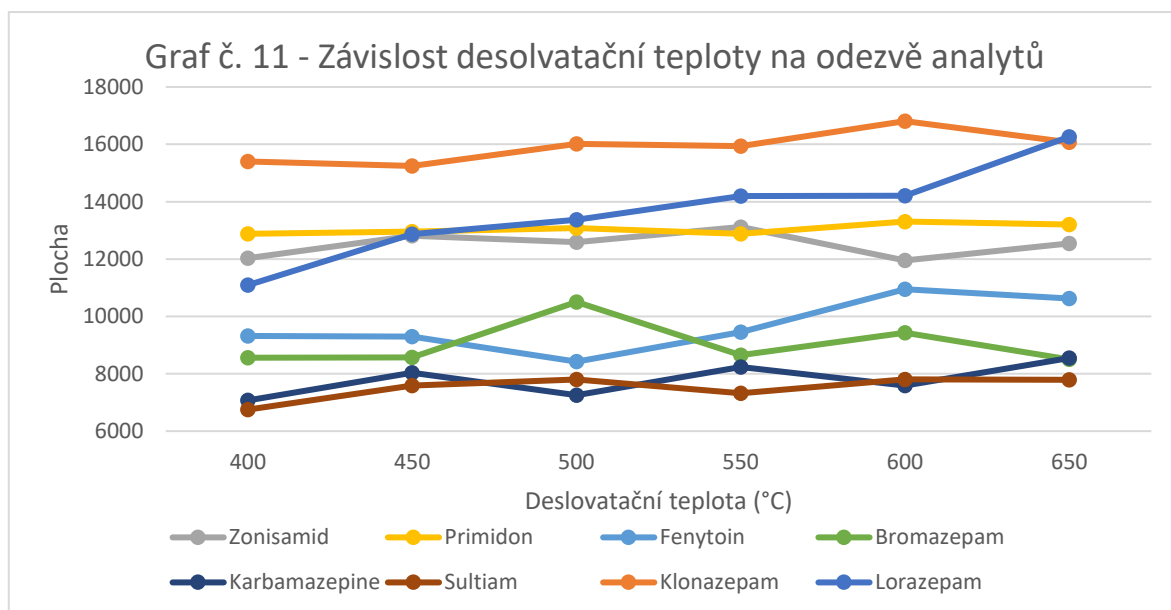


Graf č. 10- Závislost napětí na kapiláře na odezvě analytů

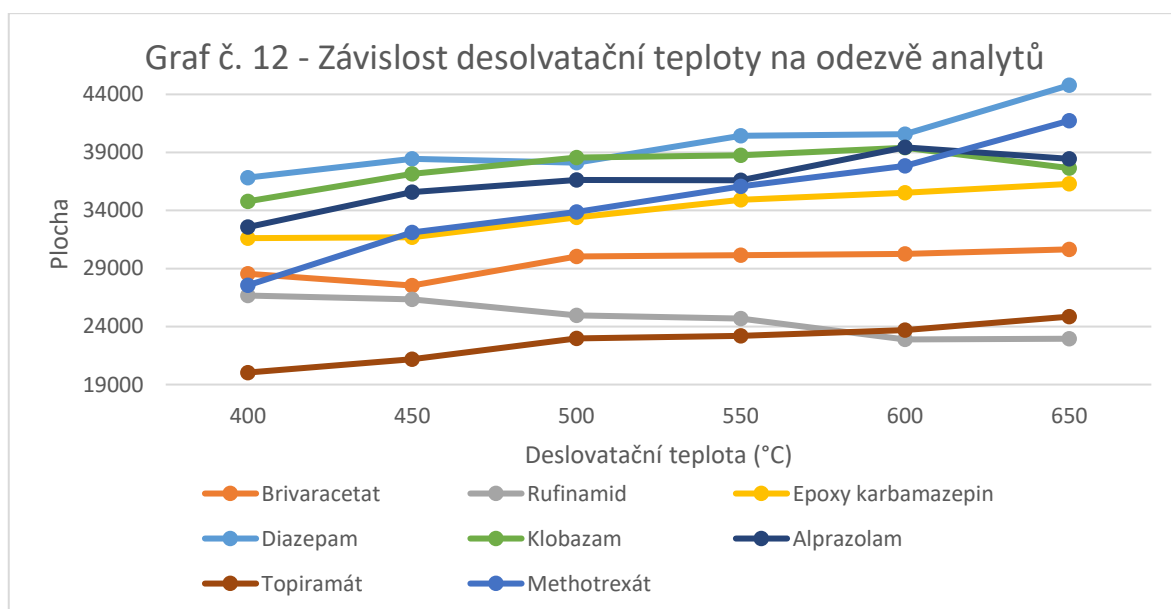


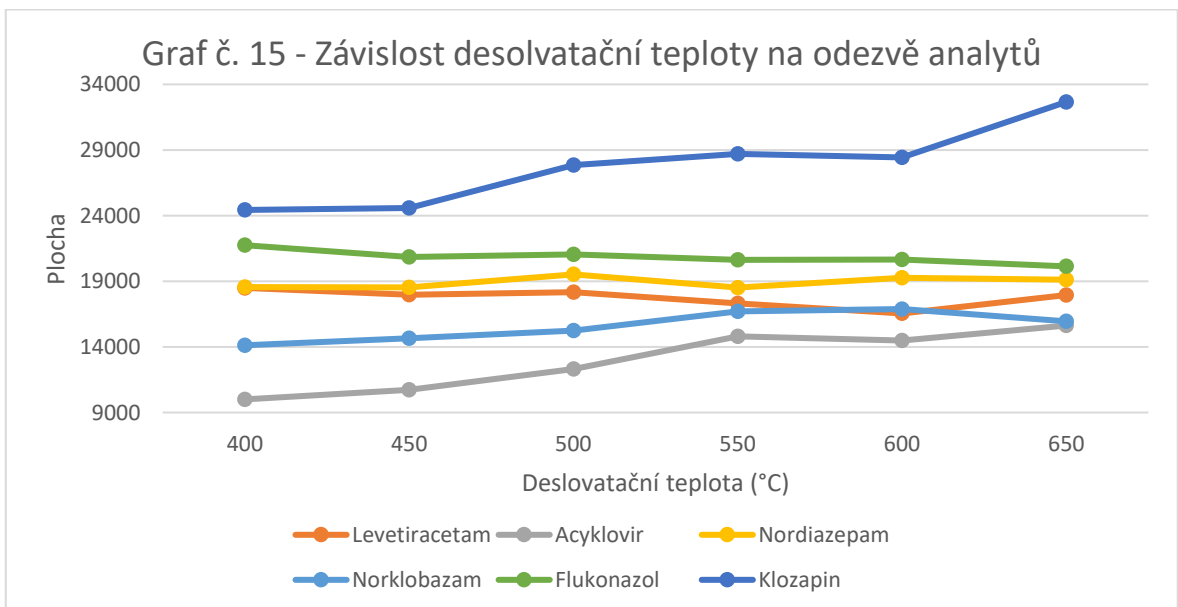
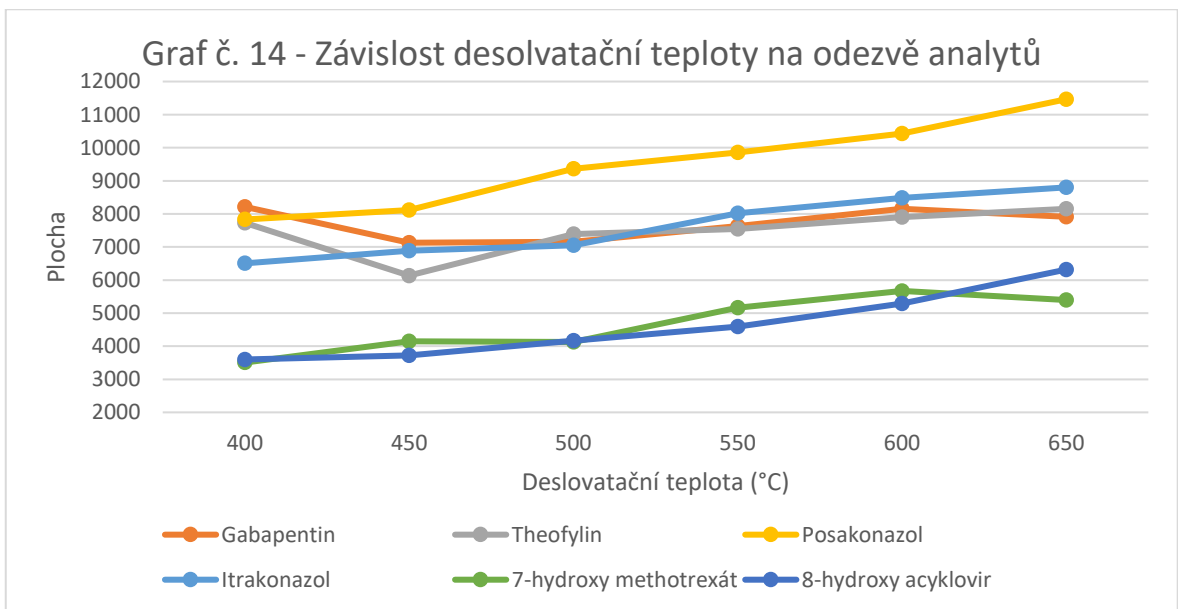
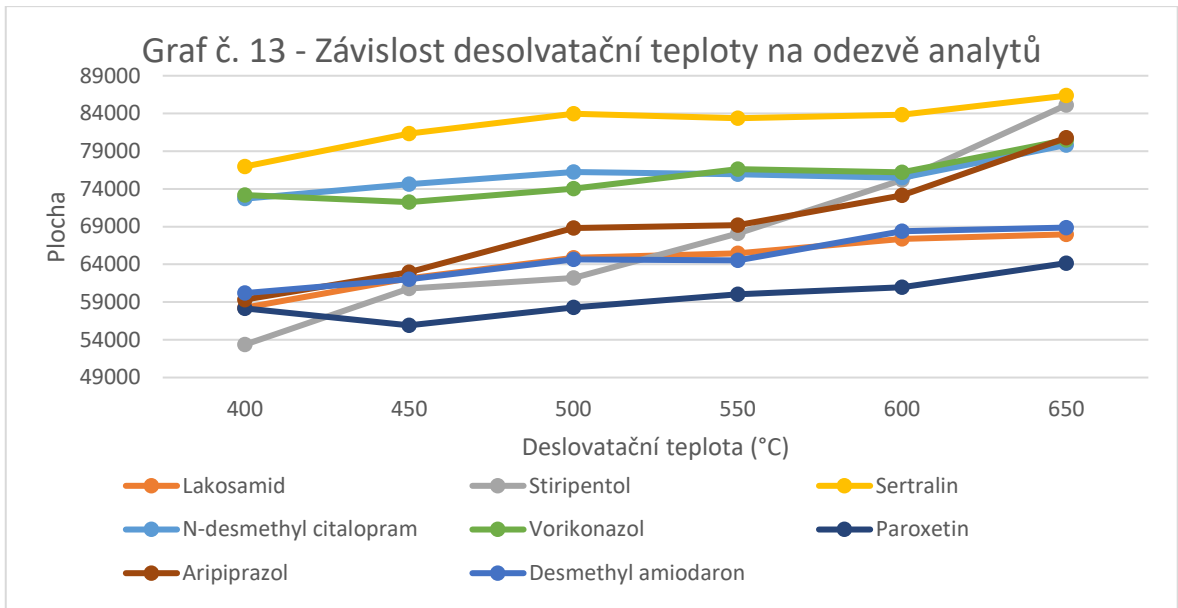
8.1.2.2 Experiment nastavení desolvatační teploty

Dále byly porovnávány změny plochy píků v závislosti na desolvatační teplotě. Látky jsou v grafech rozděleny tak aby nedocházelo ke zkreslování dat, které by mohlo nastat kombinací analytů s nízkou a vysokou plochou píku. Z uvedených grafů vyplývá, že velká většina látek vykazuje nejlepšího výsledku při nastavení desolvatační teploty 650°C. Výjimku tvoří metabolit sertralinu, který dokazuje nejlepšího hodnot při nastavení desolvatační teploty 450 °C.

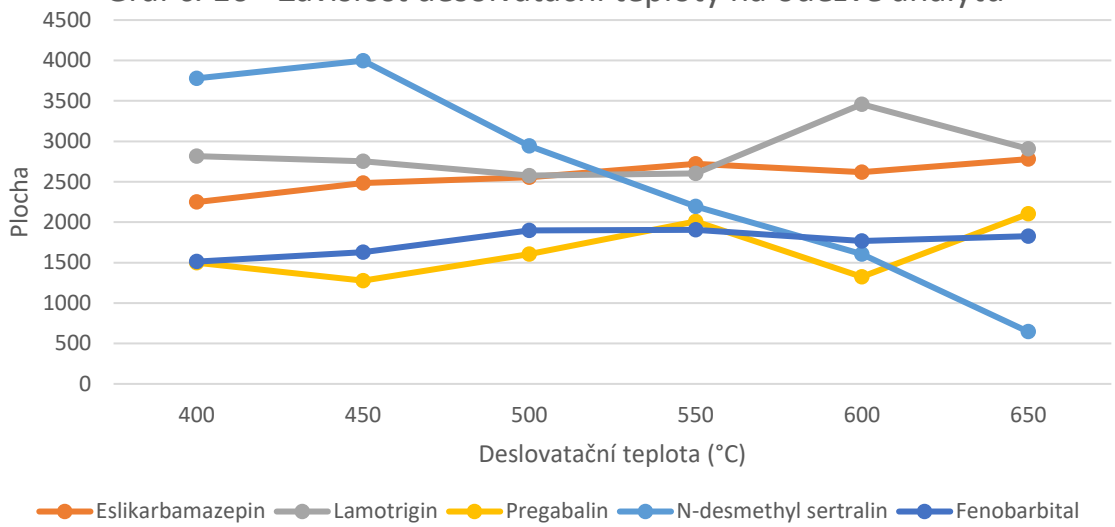


Graf 2 Závislost nastavení změny desolvatační teploty na odezvě analytů – graf 11 až 19.

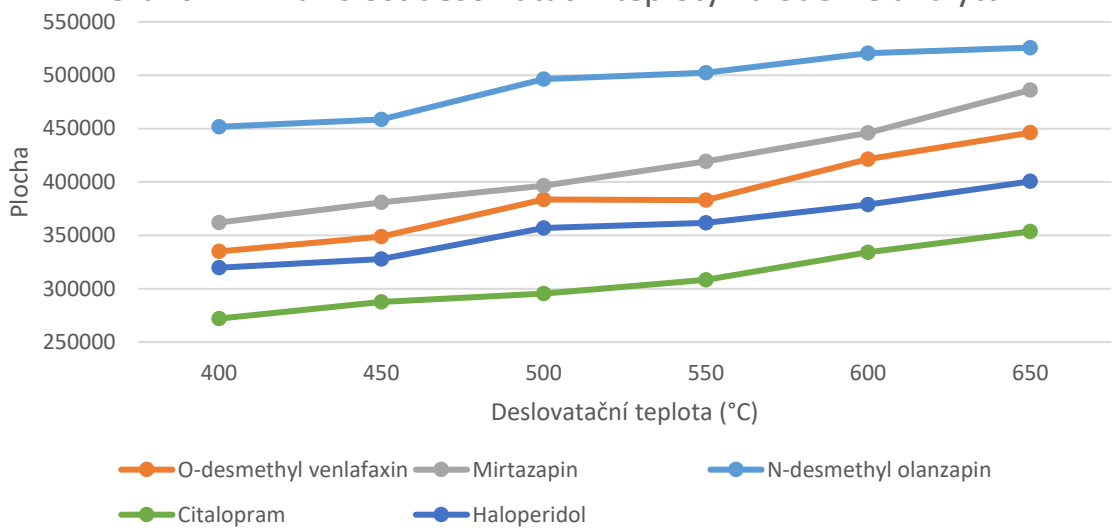




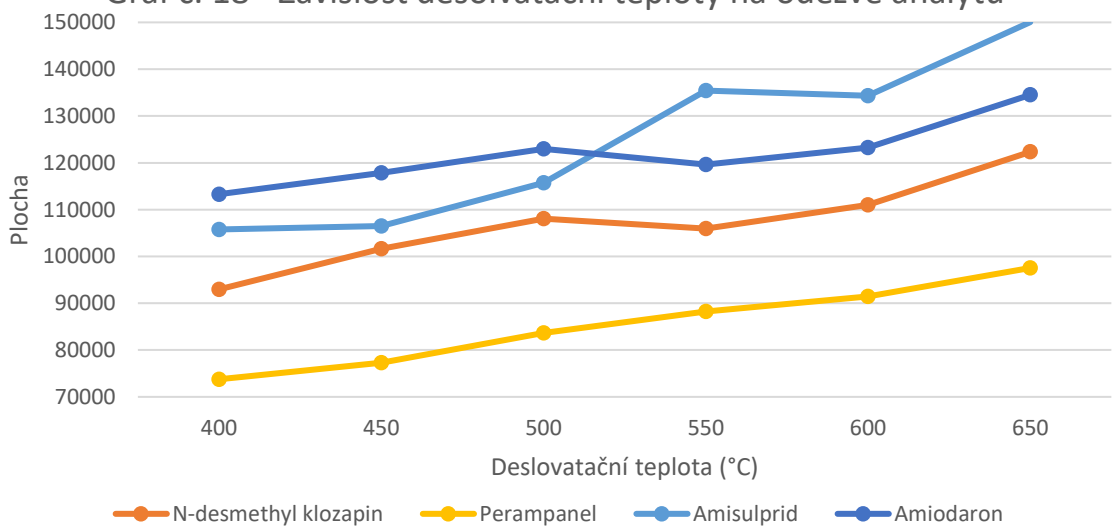
Graf č. 16 - Závislost desolvatační teploty na odezvě analytů

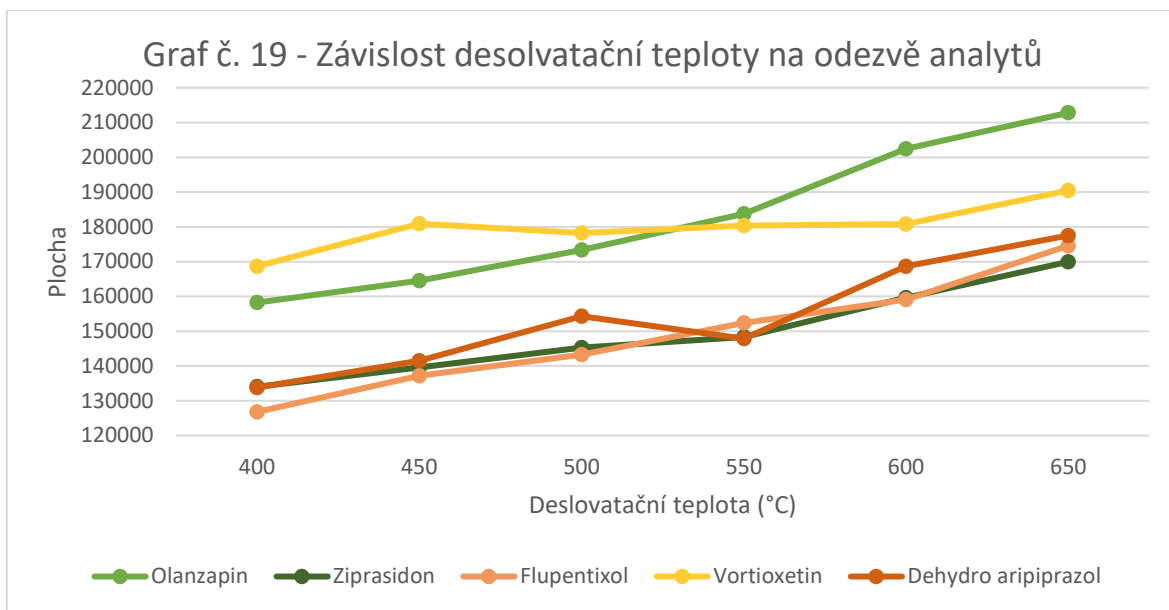


Graf č. 17 - Závislost desolvatační teploty na odezvě analytů



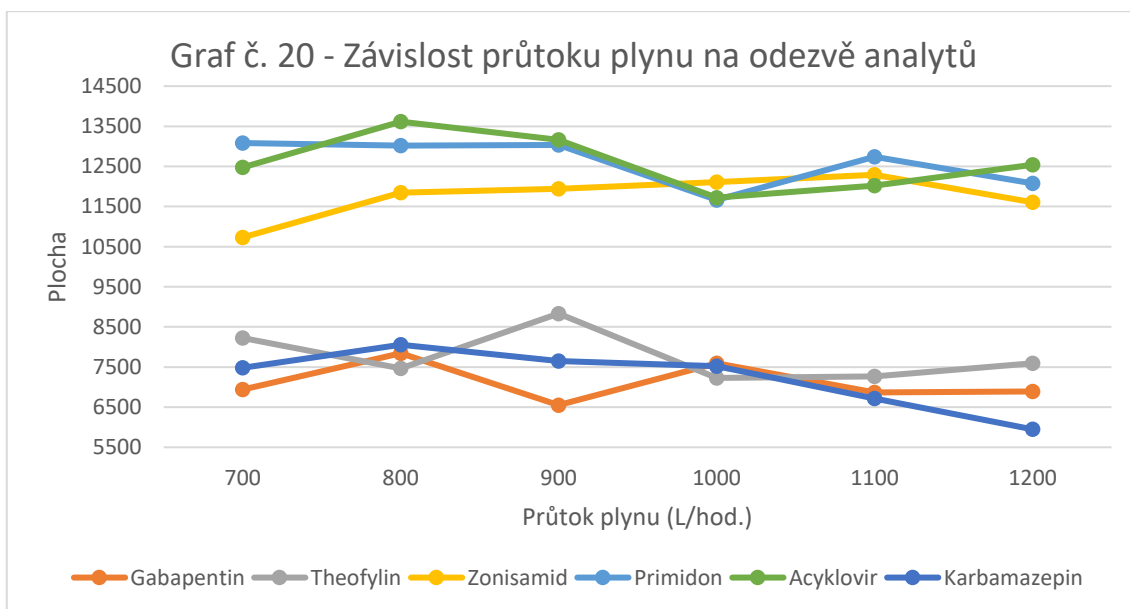
Graf č. 18 - Závislost desolvatační teploty na odezvě analytů





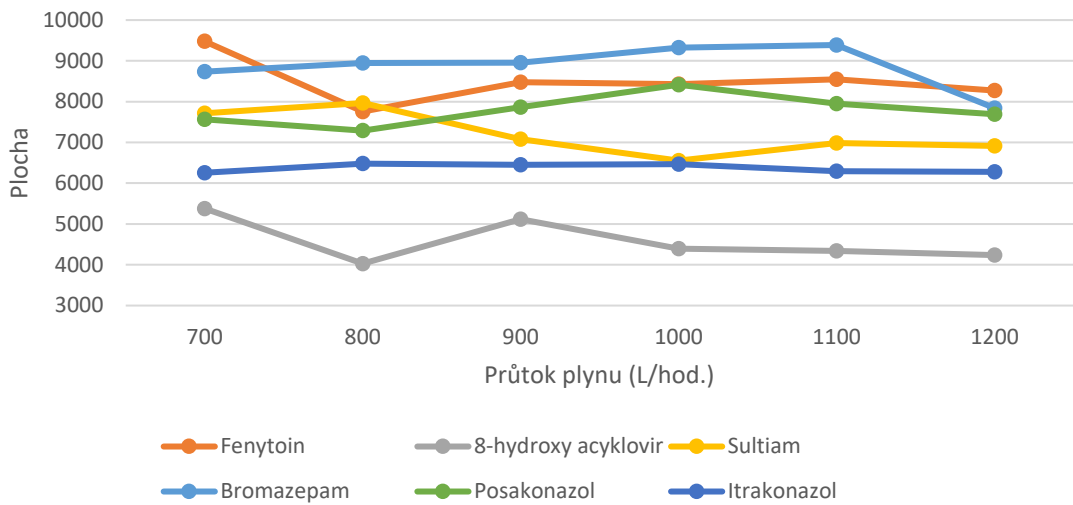
8.1.2.3 Experiment nastavení průtoku plynu

Jako další parametr bylo nastavení průtoku plynu. Byla vyhodnocena změna odezvy plochy píků vybraných látek v závislosti na nastavené hodnotě průtoku plynu. Průtok plynu se mezi analýzami zvyšoval od 700 po 1200 L/hod. Analyty mají mezi sebou u tohoto parametru největší odlišnosti ve velikosti plochy píku v závislosti na zvolené hodnotě.

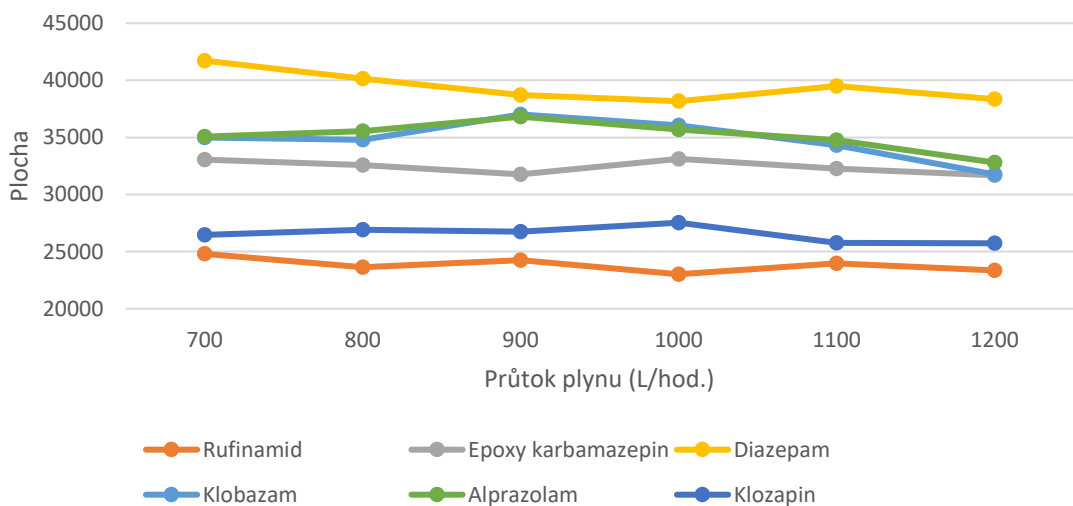


Graf 3 Závislost nastavení hodnoty průtoku plynu na odezvě analytů – graf 20 až 32.

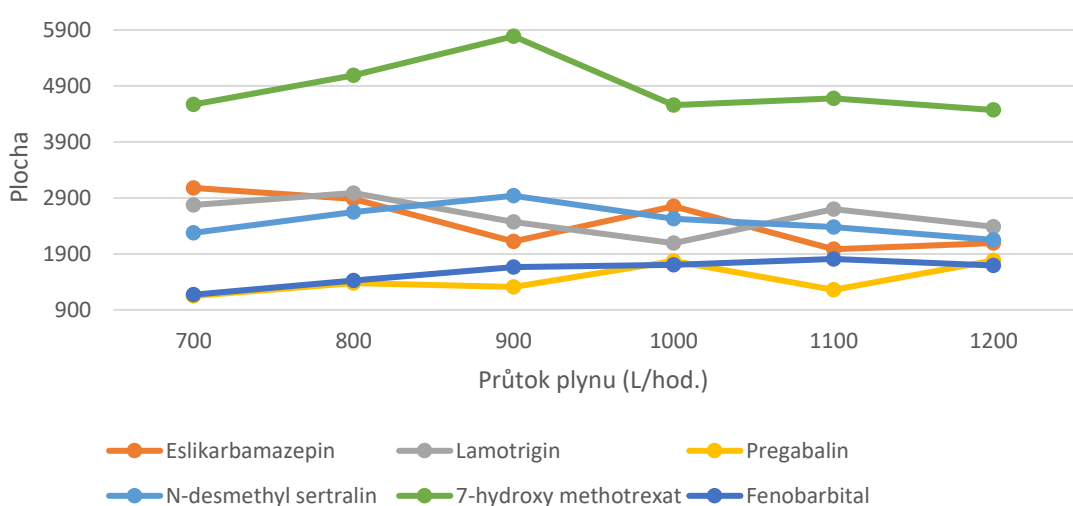
Graf č. 21 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů



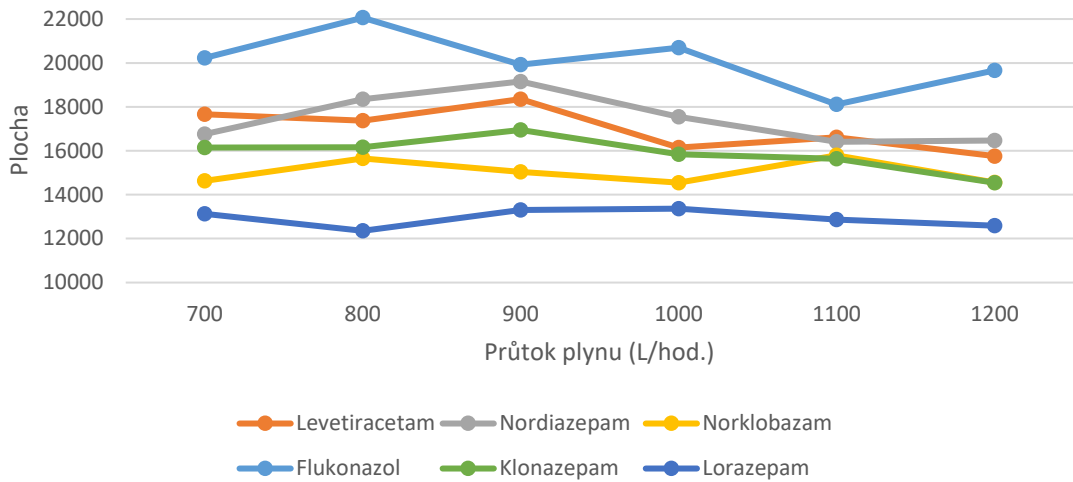
Graf č. 22 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů



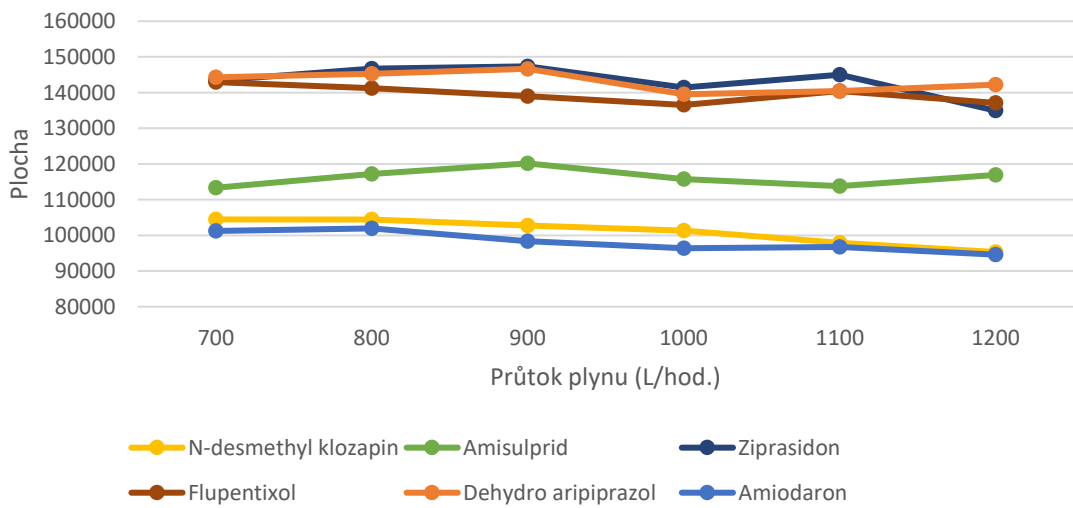
Graf č. 23 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů



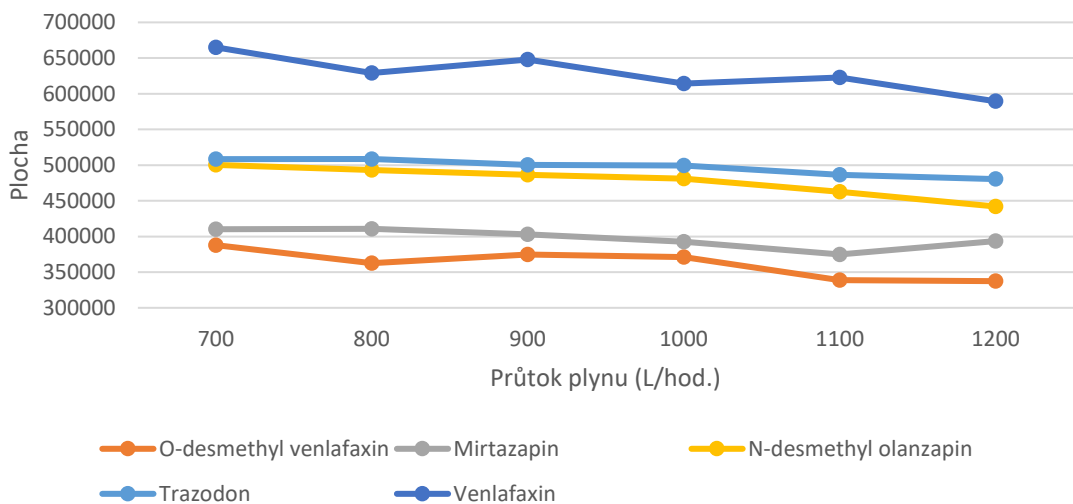
Graf č. 24 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů

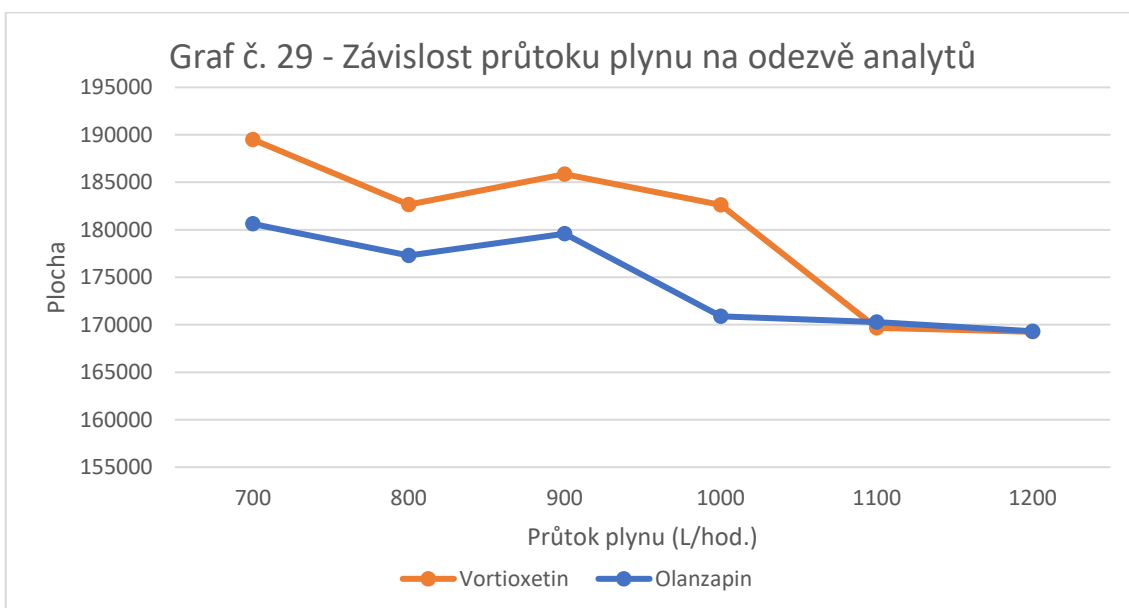
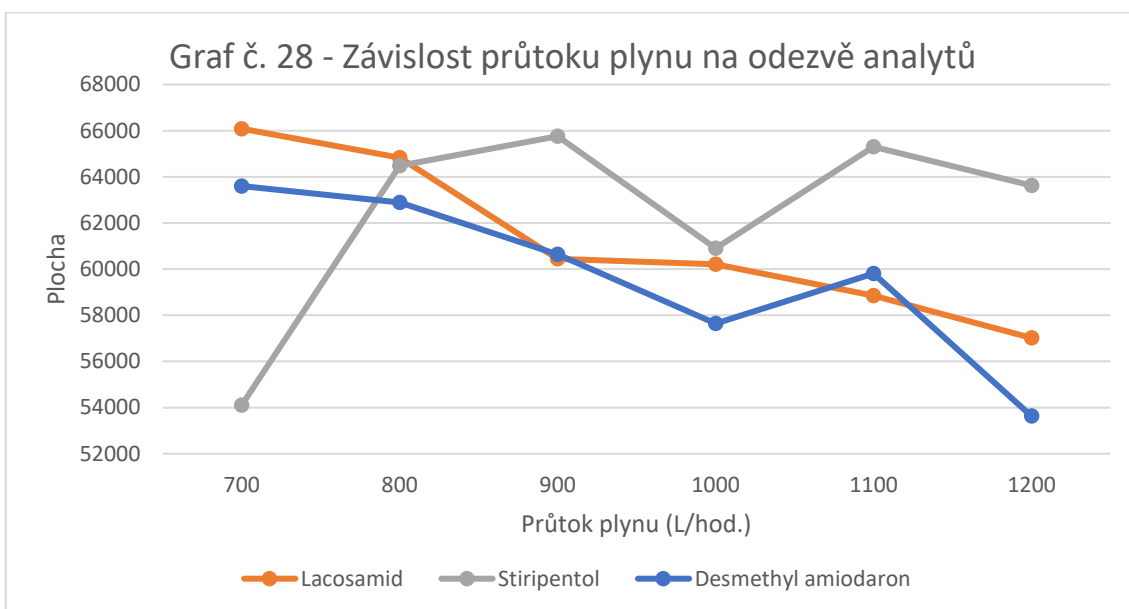
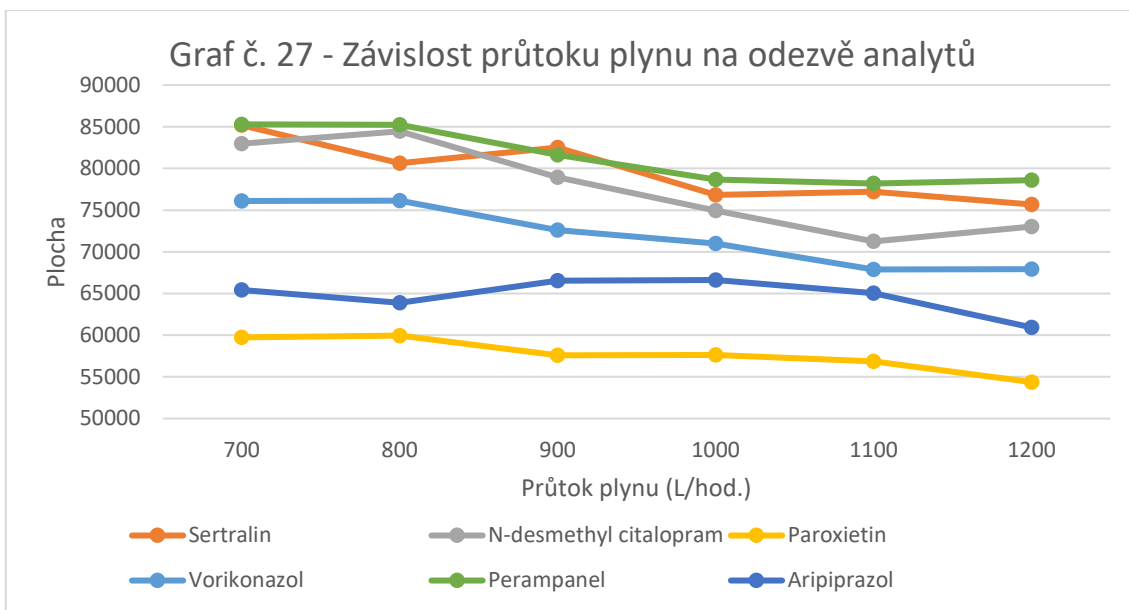


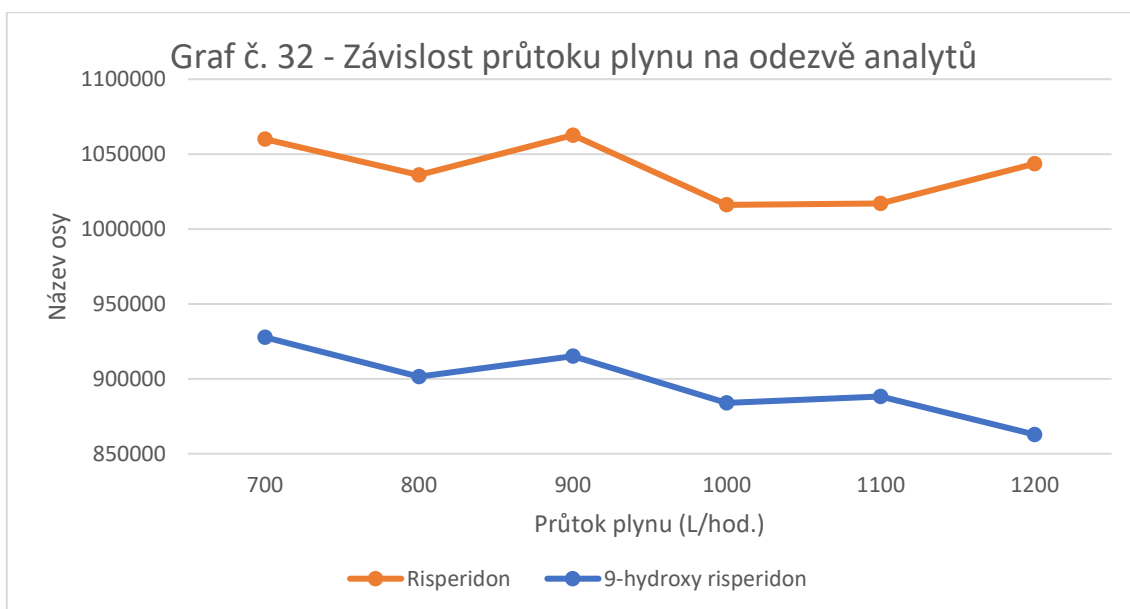
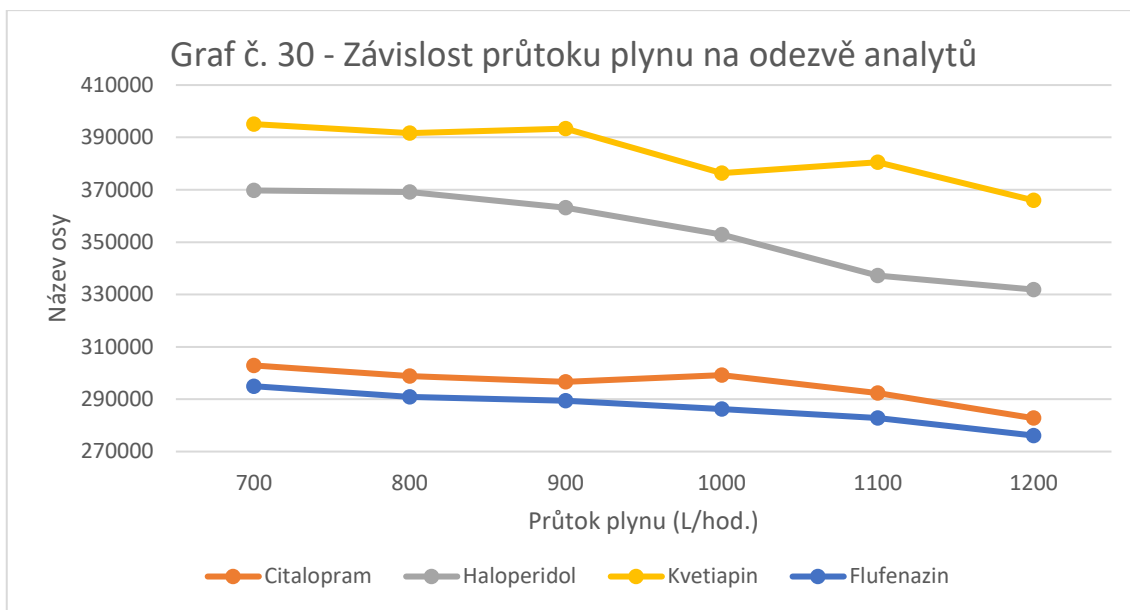
Graf č. 25 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů



Graf č. 26 - Závislost průtoku plynu na odezvě analytů







Tabulka 64 zobrazuje parametry s nejlepší odezvou nastavení hmotnostního spektrometru pro vybraná léčiva. Vybrané hodnoty (napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu) uvedené v tabulce 65 byly nastaveny podle analytu s nejmenší odezvou (plochou píkú) v závislosti na koncentraci analytu v reálných vzorcích séra nikoliv však pouze na vyhodnocení ploch píkú směsi všech analytů o koncentraci 100 ng/mL v 10 % methanolu. Z pohledu reálných vzorků a očekávaných koncentrací vybraných látek v séru jsou kritické benzodiazepiny, flufenazin, flupentixol a haloperidol. Tyto analyty se nacházejí v séru v koncentracích ng/mL ve srovnání s antiepileptiky, antimykotiky a dalšími léčivy, které se pohybují v séru v desítkách až stovkách $\mu\text{g/mL}$ (tabulka 21, 22, 24, 25, 26, 27). Proto nastavení hodnot MS parametrů bylo fokusováno na nastavení pro jejich hodnoty.

V případě nalezení více vhodných možností pro nastavení daného MS parametru, byly tyto hodnoty také uvedeny v tabulce 64 (např. Pregabalin při průtoku plynu 1000 a 1200 L/hod a další). Pro každou látku byly následně vybrány hodnoty nastavení poskytující největší odezvy (viz tabulka 64).

Pro lepší orientaci jsou v tabulce barevně zvýrazněny jednotlivé skupiny léčiv. Zde je možné pozorovat, v případě strukturně podobných látek, např. u benzodiazepinů velmi podobné hodnoty v nastavení hodnot napětí na kapiláře, desolvatační teploty a průtoku. To je způsobeno jejich velmi podobnou strukturou, a tedy fyzikálně chemickými vlastnostmi (viz kapitola 1.4.1). Ostatní skupiny léčiv nevykazují tuto strukturní podobnost, a proto se mohou lišit a liší v nastavením těchto parametru pro jednotlivé analyty.

Tabulka 64 Vybrané parametry nastavení MS: napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu pro daný analyt.

● - Antiepileptika, ● - Bronchodilatancia, ● - Antivirotika, ● - Antipsychotika, ● - Benzodiazepiny, ● - Antimykotika, ● - Cytostatika, ● - Antiarytmika

Skupina	Analyt	Napětí na kapiláře (kV)	Desolvatační teplota (°C)	Průtok plynu (L/hod)
●	Pregabalin	0.5	650	1000/1200
●	Levetiracetam	0.5	400	900
●	Gabapentin	0.5	400	800
●	Theofylin	0.5	650	900
●	Zonisamid	0.5/1	550	1100
●	Brivaracetát	0.5/1	650	700
●	Primidon	0.5/1	600	700/800/900
●	Acyklovir	0.5	650	800
●	Karbamazepin	1	650	800
●	Rufinamid	0.5	400	700
●	8-hydroxy acyclovir	0.5	650	700
●	Lacosamid	0.5	650	700
●	Fenytoin	3.5	600	700
●	Epoxykarbamazepin	0.5	650	700/1000
●	Stiripentol	1	650	800/900/1100
●	Eslikarbamazepin	0.5	650	700
●	Lamotrigin	0.5	600	900
●	O-desmethyl venlafaxin	0.5	650	700
●	Mirtazapin	0.5	650	700/800
●	Nordiazepam	0.5	500	900
●	Venlafaxin	0.5	650	700
●	Diazepam	0.5/1	650	700
●	Norklobazam	1	600	800/1000
●	Sulthiam	1	500/600/650	800

Pokračování tabulky 64 Vybrané parametry nastavení MS: napětí na kapiláře, desolvatační teplota a průtok plynu pro daný analyt. ● - Antiepileptika, ● - Bronchodilatancia, ● - Antivirotika, ● - Antipsychotika, ● - Benzodiazepiny, ● - Antimykotika, ● - Cytostatika, ● - Antiarytmika

Skupina	Analyt	Napětí na kapiláře (kV)	Desolvatační teplota (°C)	Průtok plynu (L/hod)
●	N-desmethyl sertralin	1	450	900
●	N-desmethyl olanzapin	0.5	650	700
●	Vortioxetin	0.5/1	650	700
●	Klobazam	0.5	600	900
●	Sertralin	1	650	700
●	Flukonazol	0.5	400	800
●	Alprazolam	1	600	900
●	N-desmethyl citalopram	0.5	650	800
●	N-desmethyl klozapin	0.5	650	700/800
●	Olanzapin	0.5	650	700/900
●	Bromazepam	0.5	500	1000/1100
●	Klonazepam	0.5	600	900
●	Lorazepam	1	650	900/1000
●	Citalopram	0.5	650	700
●	Klozapin	0.5/1	650	1000
●	Paroxetin	0.5/1	650	700/800
●	Vorikonazol	0.5/1	650	700/800
●	Perampanel	1	650	700/800
●	Topiramát	0.5/1	650	900
●	Amisulprid	1	650	900
●	Trazodon	1	650	700/800
●	Haloperidol	1	650	700/800
●	Kvetiapin	1	650	700/900
●	Risperidon	1	650	700/900
●	Ziprasidon	0.5/1	650	900
●	9-hydroxy risperidon	1	650	700
●	Flufenazin	1	650	700
●	Flupentixol	1	650	700
●	Dehydro aripiprazol	1	650	900
●	Aripiprazol	1	650	900/1000
●	Methotrexát	1	650	700/800/900
●	7-hydroxy methotrexát	1	600	900
●	Desmethyl amiodaron	1	650	700
●	Amiodaron	1.5	650	800
●	Posakonazol	1	650	1000
●	Itrakonazol	1	650	800/1000
●	Kys. valproová	nezměřeno	nezměřeno	nezměřeno
●	Fenobarbital	nezměřeno	550	1100

U kyseliny valproové a fenobarbitalu nebyly změřeny všechny parametry MS kvůli špatně nastaveným MRM přechodům pro tyto látky. Nicméně díky vysokým koncentracím, ve kterých se tyto analyty v séru pohybují, nebylo nezbytně nutné, z pohledu citlivosti, tyto parametry pro jejich kvantifikaci nastavovat.

Tabulka 65 Nastavení vybraných parametrů hmotnostního spektrometru

Mód	Napětí na kapiláře (kV)	Desolvatační teplota (°C)	Průtok plynu (L/hod.)
ESI +	1	600	900
ESI -	0,8	600	900

8.1.3 Nastavení podmínek kapalinové chromatografie

8.1.3.1 Výběr mobilní fáze

Pro chromatografickou separaci byly testovány dvě odlišné mobilní fáze. Jako první byla použita mobilní fáze, která byla převzata z aplikačního listu firmy Waters [37]. Složení této mobilní fáze je uvedeno v tabulce 66. Další testovanou mobilní fází byla mobilní fáze rutinně používaná na oddělení klinické farmakologie, FN Ostrava. Její složení je uvedeno v tabulce 67. Chromatogram 2 a chromatogram 3 zobrazuje overaly TIC záznam všech analytů za použití níže uvedených MF.

Tabulka 66 Mobilní fáze převzata z aplikačního listu firmy Waters

MF	Složení
C	2mM octan amonný ve vodě
D	2mM octan amonný v metanolu

Další byla vyzkoušena mobilní fáze, která je využívána na oddělení klinické farmakologie FNO.

Tabulka 67 Mobilní fáze převzata z oddělení klinické farmakologie

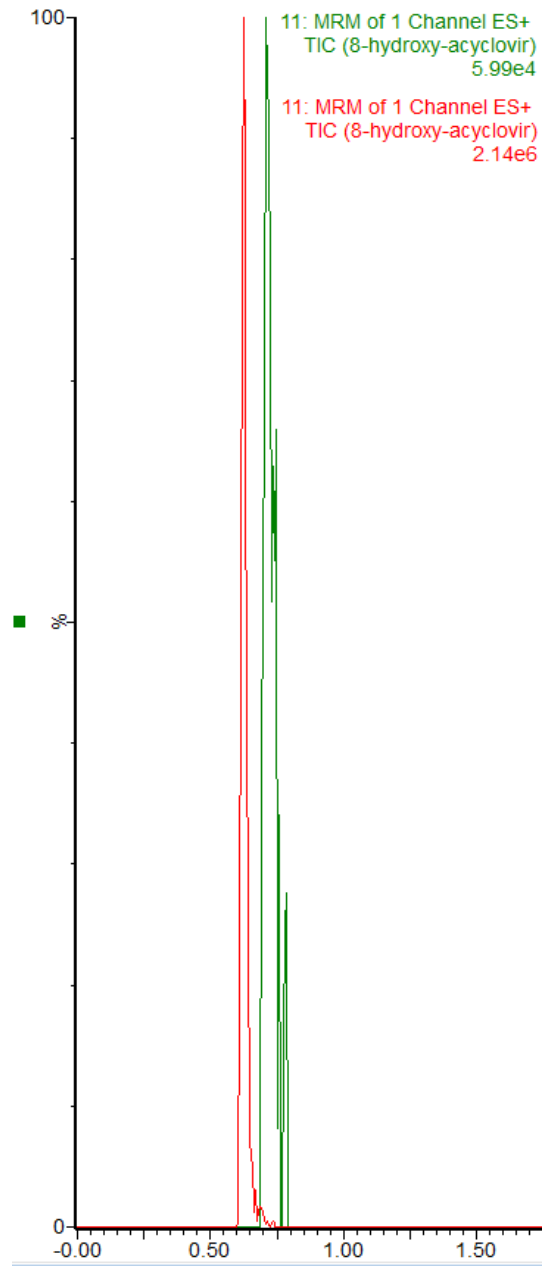
MF	Složení
A	2 mM octan amonný, 0.1% kyselina mravenčí v 5% acetonitrilu; v/v/v
B	2 mM octan amonný, 0.1% kyselina mravenčí v 95% metanolu; v/v/v

Výběr mobilní fáze probíhal na základě porovnání ploch píků všech vybraných analytů za totožných podmínek nastavení hmotnostního spektrometru, MRM přechodů, nastavení gradientu eluce, ale rozdílného složení mobilní fáze (tabulce 66 a 67). Nastavení hmotnostního spektrometru pro toto porovnání je uvedeno v tabulce 57, nastavení MRM přechodů jednotlivých analytů je uvedeno v tabulce 63 a nastavení gradientu eluce je uvedeno v tabulce 56. Při porovnání odezev jednotlivých

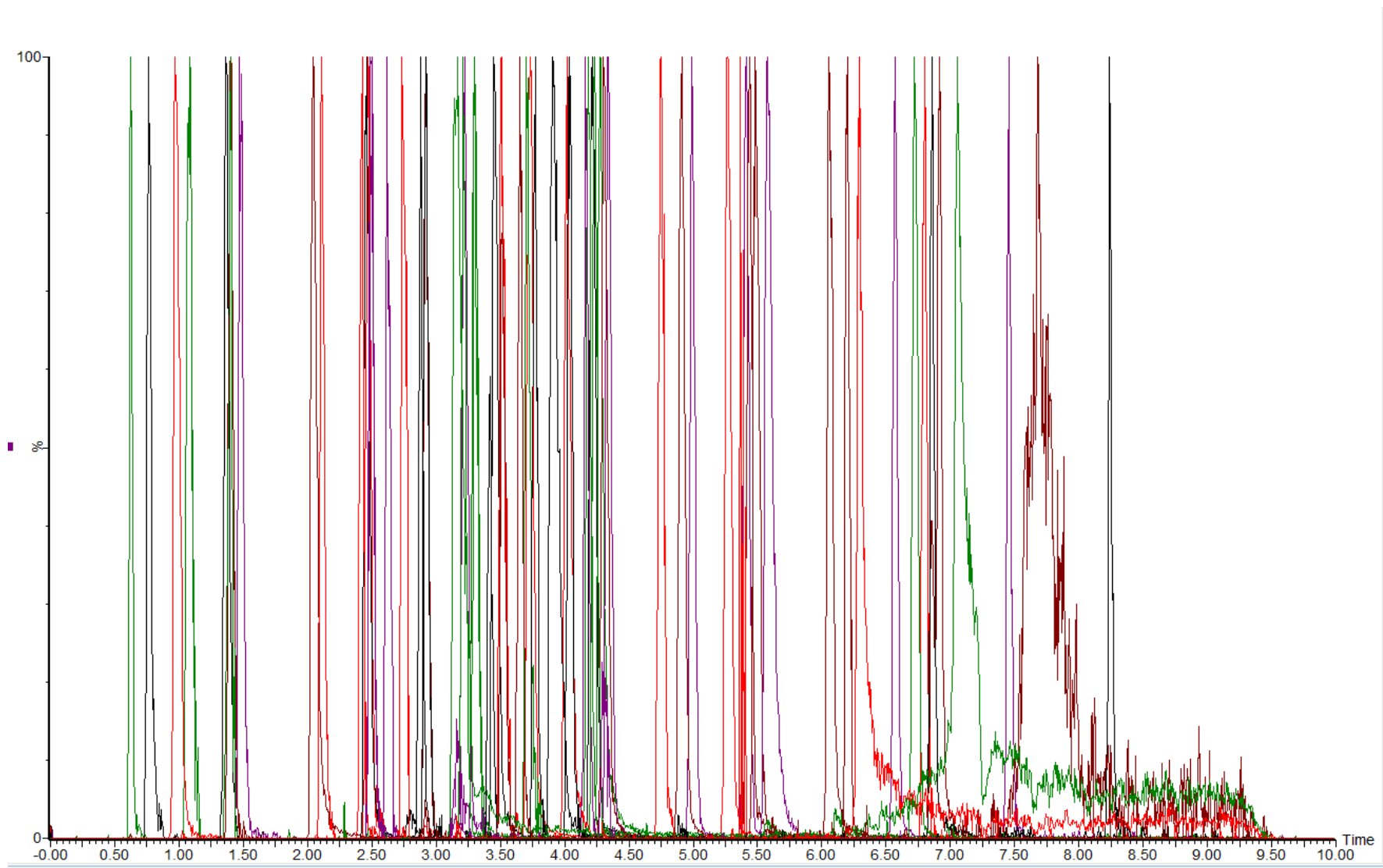
látek těchto dvou mobilních fází byla připravena směs všech analytů o koncentraci 100 ng/mL v 10 % methanolu (chromatogram 2 a 3). Krom odezev jednotlivých látek byla také sledována symetrie píků a změna retence analytů. Chromatogram č. 1 zobrazuje retenci metabolitu acykloviru (8-hydroxy acyklovir) za použití mobilní fáze převzaté z oddělení klinické farmakologie (zelený záznam) a z aplikačního listu Waters (červený záznam). Krom rozdílné retence tohoto metabolitu za použití odlišného složení MF můžeme pozorovat změnu odezvy hmotnostního spektrometru. U zeleného záznamu byla pozorována odezva pouze $5.99e4$, oproti červenému záznamu kde byla odezva o dva řády větší za použitých experimentálních podmínek.

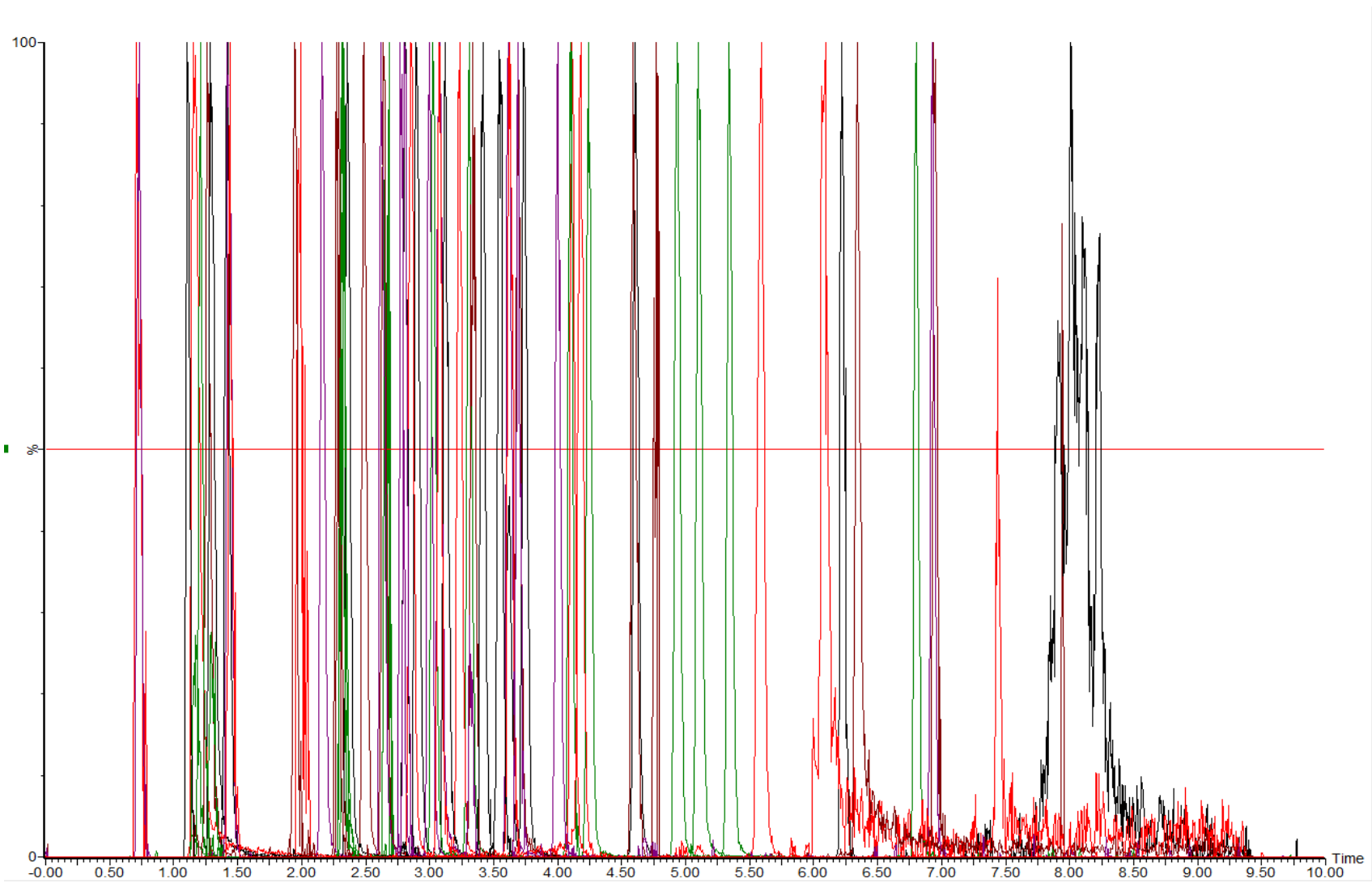
MF fakultka

010323 Waters BEH_C18- 3_MF fakultka



Chromatogram 1 TIC záznam metabolitu acyklovir za použití odlišných MF





Chromatogram 3 Overlay chromatogram MF FNO (A:B)

8.1.3.2 Nastavení gradientu

Dalším krokem bylo nastavením gradientu eluce mobilní fáze. Experiment byl založen na analýze směsi látek o koncentraci 100 ng/mL v 10 % metanolu. Nastavení podmínek hmotnostního spektrometru a složení MF vychází z experimentů provedených v kapitolách 8.1.2 a 8.1.3.1 a je uvedeno v tabulkách 54 a 57.

Kvůli velkému množství stanovovaných analytů lišících se strukturou, polaritou a acidobazickými vlastnostmi bylo obtížné nastavit gradient eluce tak, aby píky byly od sebe dostatečně separovány (plně rozlišeny) v přijatelném čase chromatografické analýzy. Byly testovány různé gradienty eluce za použití kolony Acquity UPLC BEH C-18 (100 x 2.1 mm; 1.7 μ m) a MF o složení viz tabulka 54.

Chromatogram č. 4 zobrazuje gradient eluce který je uveden v pravé části chromatogramu. Ze záznamu analýzy vyplývá, že všechny analyty byly vymývány z kolony až mezi 2,25 a 8,5 minutou retenčního času. Vymývání látek při tomto nastavení eluce začalo až ve 2,25 minuty prvním analytem. Chromatogram č. 5 zobrazuje separaci vybraných analytů za použití eluce MF uvedeného v tabulce 68. Toto nastavení bylo použito pro validaci metody a kvantifikaci vybraných skupin látek u patientských vzorků séra. První látka byla eluována z kolony v retenčním čase 0,6 min a poslední látka v čase 8,14 min.

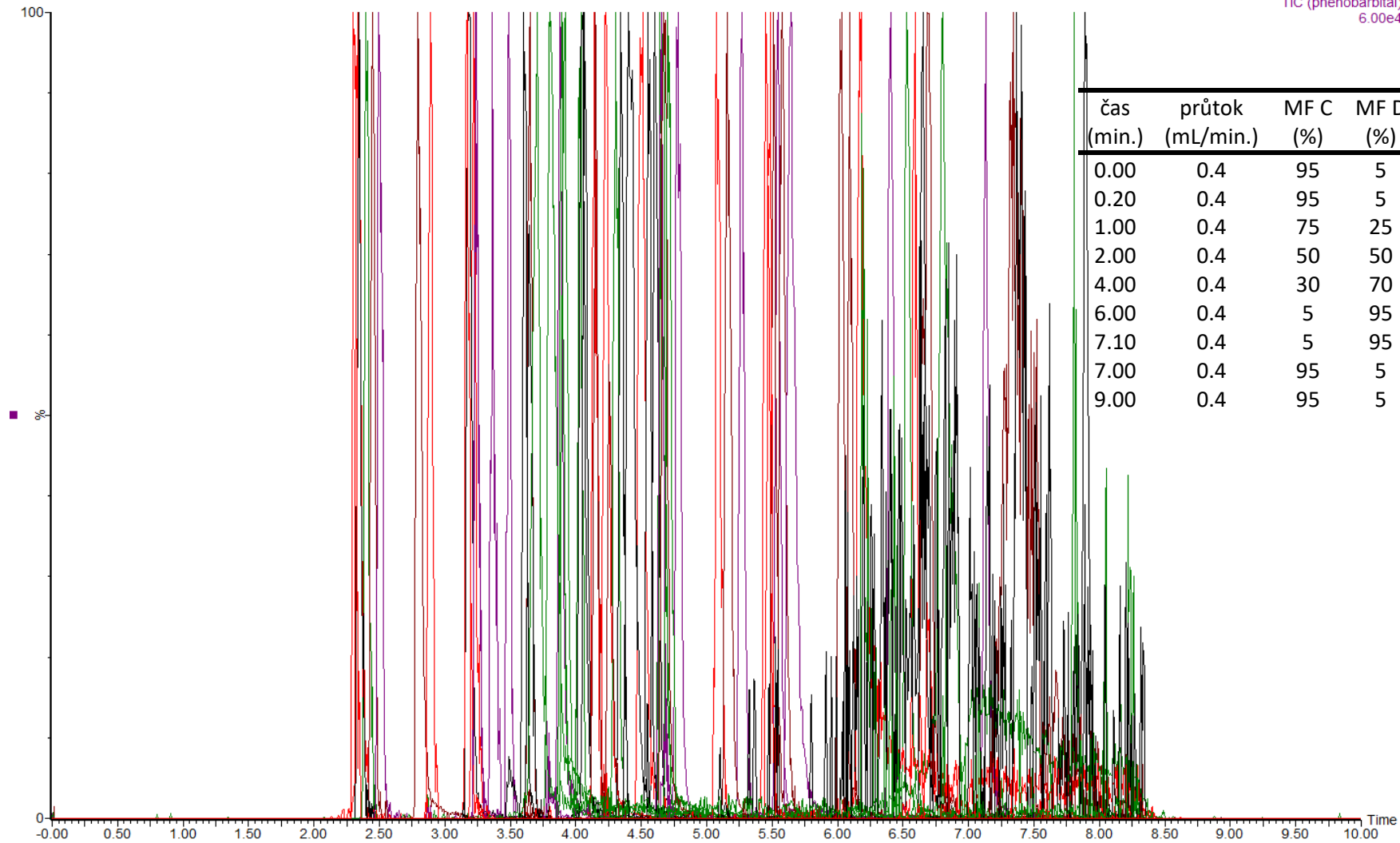
Na Chromatogramu č. 5 můžeme poté pozorovat finální rozložení analytů při použití námi vybraného gradientu viz tabulka č. 68.

Tabulka 68 Nastavení podmínek gradientu mobilní fáze

čas (min.)	průtok (mL/min.)	MF C (%)	MF D (%)
0.00	0.4	80	20
0.50	0.4	70	30
1.00	0.4	50	50
4.00	0.4	30	70
6.00	0.4	10	90
7.00	0.4	0	100
8.00	0.4	5	95
8.10	0.4	80	20
10.00	0.4	80	20

100 ng/mL v 10% MeOH
250223 smes_MeOH MF_gradient 1- 2

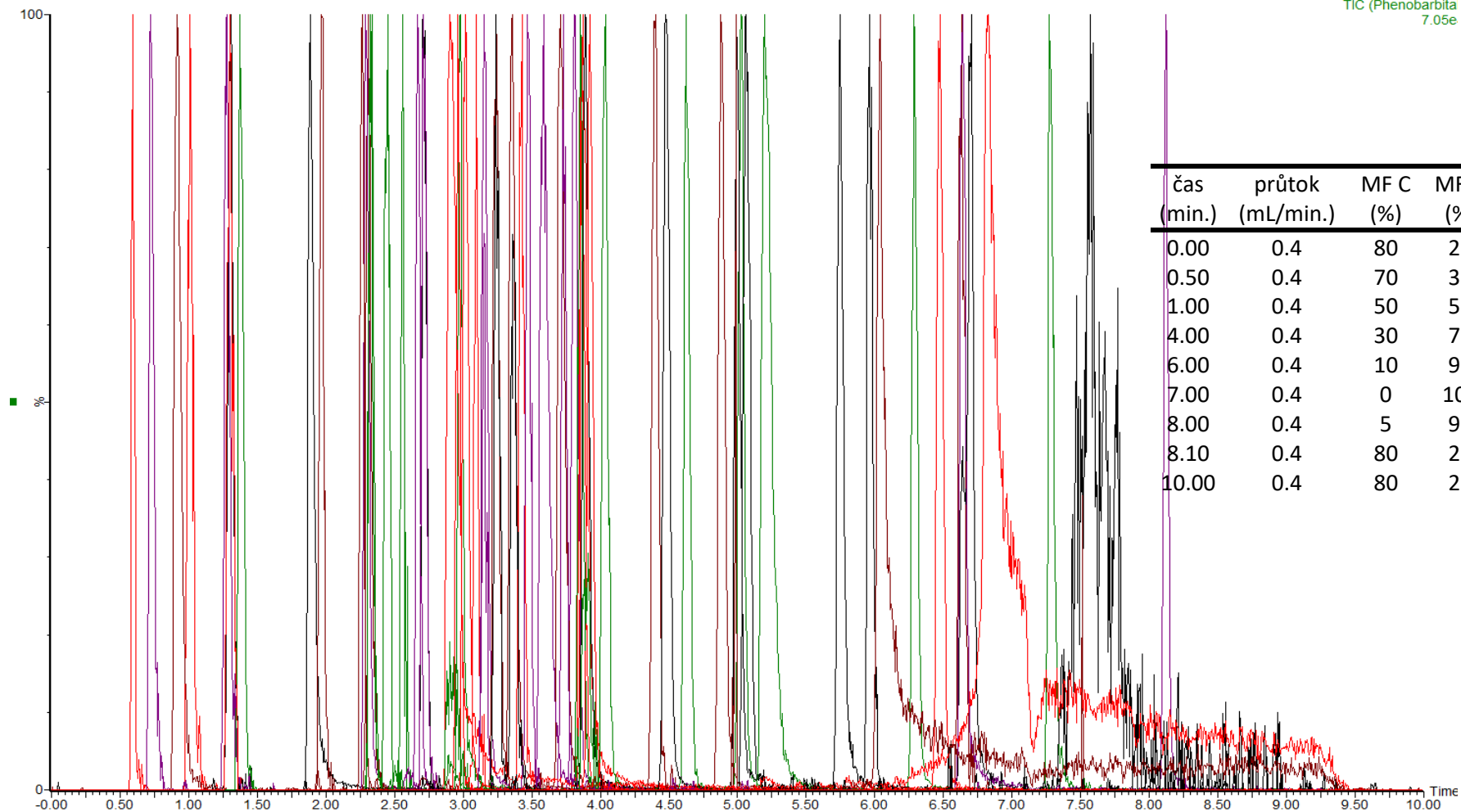
63: MRM of 3 Channels ES-
TIC (phenobarbital)
6.00e4



Chromatogram 4 Overlay chromatogram – záznam gradientu mobilní fáze C:D.

260223 Waters BEH_C18- 3

62: MRM of 2 Channels ES-
TIC (Phenobarbita
7.05e



čas (min.)	průtok (mL/min.)	MF C (%)	MF D (%)
0.00	0.4	80	20
0.50	0.4	70	30
1.00	0.4	50	50
4.00	0.4	30	70
6.00	0.4	10	90
7.00	0.4	0	100
8.00	0.4	5	95
8.10	0.4	80	20
10.00	0.4	80	20

Chromatogram 5 Overlay chromatogram – záznam gradientu mobilní fáze C:D.

8.1.3.3 Testování kolon

Nejpoužívanějším typem kolony v kapalinové chromatografii pro analýzu léčiv z biologické matrice je C18 kolona. To koresponduje s tabulkou 28, kde je uveden přehled vybraných publikací pro stanovení vybraných léčiv z biologické matrice pomocí LC-MS. V této tabulce je přehledně uvedeno 11 publikací. 7 autorů využilo C18 kolonu [(1)(3)(5)(7)(9)(10)(11)], 2 autoři požili fenyllovou kolonu [(2)(4)] a 1 publikace použila bifenylové stacionární fázi [(8)]. Selektivita C18 stacionární fáze je založena na interakcích mezi hydrofobními částmi struktury analytů a alkylovými skupinami na povrchu stacionární fáze. Princip retence fenyllové stacionární fáze je založen na interakci analytů s fenyllovými skupinami stacionární fáze. Tento typ se zejména používá pro separaci analytů s aromatickými nebo konjugovanými strukturami.

Výběr kolony pro stanovení 62 látek z lidského séra nebyl snadný kvůli rozdílným strukturám vybraných analytů. Vzhledem k velkému počtu stanovovaných látek jsme se rozhodli pro testování kolon o délce 10 cm. Vybraná léčiva jsou strukturně odlišná a pohybují se v reálných vzorcích v širokém koncentračním rozmezí. Testováno bylo celkem sedm kolon s C18, C8 a bifenylovou stacionární fází různých výrobců. Parametry a typ kolon je uveden v tabulce č. 69. Jednalo se o 4 UPLC kolony (velikost částic stacionární fáze je ≤ 2 mikrometry) a 3 HPLC kolony.

Tabulka 69 Přehled a specifikace použitých kolon

Název kolony	Délka x šířka (mm)	Velikost částic (μm)
Raptor™ ARC-18	100 x 2.1	2.7
Kinetex C18	100 x 2.1	5
Kinetex biphenyl	100 x 2.1	2.6
Kinetex C8	100 x 2.1	1.7
Astra Arion C18-HE HPLC	100 x 2.1	2
Hypersil GOLD C18	100 x 2.1	1.9
Acquity UPLC BEH C18	100 x 2.1	1.7

Experimentální provedení porovnání výše uvedených kolon spočíval v porovnání těchto kolon během nástřiku směsí všech analytů o koncentraci 100 ng/ml v 10 % metanolu. Použitá mobilní fáze, gradient eluce a nastavení MS je uvedeno v tabulkách 54, 56 a 57. Byla sledována retence všech analytů, symetrie píků a rozlišení látek během 10minutové chromatografické analýzy.

Podle výše uvedených parametrů jsme se na konec rozhodli pro validaci metody použít kolony od společnosti Waters Acquity UPLC BEH C18. Tabulka 70 a 71 uvádí přehled retenčních časů a velikost odezvy analytů u výše uvedených typů kolon a za výše popsaných experimentálních podmínek. Stejný vzorek byl nástřikován na každou kolonu 3x a výsledkem byl průměr těchto 3 stanovení (retenční čas a velikost odezvy). Je důležité rozlišit selektivitu HPLC a UPLC kolon. UPLC kolony

obecně, ve srovnání s HPLC kolonami, poskytují lepší rozlišení a selektivitu při vysokých rychlostech analýzy. Během analýzy pomocí kolony Kinetex C-18 jsme nebyli schopni detekovat methotrexát a jeho metabolit 7-hydroxy methotrexát, a to ani v jednom ze tří stanovení.

Další testovanou kolonou byla bifenylová kolona Kinetex, u které byla kritická zejména šířka píků a horší separace látek za nastavených experimentálních podmínek. Obdobně byla hodnocena kolona Raptor C-18, u které docházelo ke značnému rozmývání píků a horší symetrii píků například u látek citalopram, karbamazepin či methotrexát. Obě kolony (Kinetex C18 i Raptor ARC C18) patří dle velikosti částic SF mezi HPLC kolony, a to by mohlo být příčinou výše uvedeného hodnocení. U methotrexátu a jeho metabolitu nebyl zaznamenán při použití kolony Kinetex C18.

Tabulka 70 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Acquity BEH C-18		Kinetex C-18		Kinetex Biphenyl		Raptor ARC C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Pregabalin	1.49	3.23E+05	1.05	1.49E+05	1.01	4.70E+05	1.13	2.74E+05
Levetiracetam	1.57	2.04E+06	1.12	1.44E+06	1.57	1.15E+06	1.34	1.44E+06
Gabapentin	1.45	1.15E+06	1.04	1.02E+06	1.19	1.37E+06	1.14	1.22E+06
Theofylin	1.49	6.94E+05	1.13	6.22E+05	1.62	8.47E+05	1.41	6.01E+05
Zonisamid	2.21	1.02E+06	1.74	6.88E+05	2.23	1.13E+06	1.82	9.88E+05
Brivaracetát	3.33	1.79E+06	2.71	2.64E+06	2.96	2.73E+06	2.87	3.42E+06
Primidon	2.60	1.05E+06	2.13	9.71E+05	2.26	6.86E+05	2.21	7.75E+05
Acyklovir	0.81	9.21E+05	0.64	9.18E+05	0.76	3.50E+06	0.66	2.52E+06
Karbamazepin	3.77	1.05E+06	2.96	8.62E+05	3.87	8.52E+05	3.15	8.20E+05
Rufinamid	2.50	1.34E+06	2.10	2.33E+06	2.63	1.84E+06	2.20	1.24E+06
8-hydroxy acyclovir	0.67	2.31E+06	0.58	2.91E+05	0.51	4.63E+06	0.49	3.18E+06
Lacosamid	2.58	8.46E+06	2.14	7.13E+06	2.39	7.26E+06	2.21	6.44E+06
Fenytoin	3.53	7.25E+05	2.87	7.00E+05	3.33	1.01E+06	2.94	5.45E+05
Epoxykarbamazepin	3.02	1.93E+06	2.48	1.94E+06	3.34	1.56E+06	2.63	1.48E+06
Stiripentol	6.36	2.36E+06	5.41	1.61E+06	6.64	2.20E+06	7.56	1.71E+06
Eslikarbamazepin	7.05	5.02E+06	6.48	4.64E+06	6.76	3.43E+06	8.32	3.21E+06
Lamotrigin	2.71	3.02E+05	2.24	3.62E+05	2.56	4.07E+05	2.37	3.00E+05
O-desmethyl venlafaxin	2.52	2.85E+07	2.00	2.67E+07	2.67	3.02E+07	2.66	1.98E+07
Mirtazapin	4.93	3.09E+07	4.17	2.77E+07	5.62	2.12E+07	5.39	1.76E+07
Nordiazepam	4.87	1.01E+06	4.00	1.07E+06	4.87	7.05E+05	4.17	1.12E+06
Venlafaxin	3.33	4.55E+07	2.64	3.66E+07	3.87	3.77E+07	3.92	2.58E+07
Diazepam	5.12	3.42E+06	4.24	2.99E+06	5.73	2.61E+06	4.55	2.91E+06

Pokračování tabulky 70 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Acquity BEH C-18		Kinetex C-18		Kinetex Biphenyl		Raptor ARC C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Norklobazam	3.89	7.79E+05	3.14	5.11E+05	4.10	4.60E+05	3.26	4.70E+05
Sulthiam	7.70	1.87E+05	7.28	1.57E+05	6.42	1.44E+05	7.40	1.45E+05
N-desmethyl sertralin	5.39	1.80E+04	4.39	2.78E+04	5.88	8.92E+03	5.84	1.30E+04
N-desmethyl olanzapin	3.20	2.15E+07	2.58	2.19E+07	4.04	1.81E+07	3.73	2.89E+06
Vortioxetin	5.61	9.59E+06	4.63	5.10E+06	6.54	9.70E+06	6.61	9.32E+06
Klobazam	5.14	1.60E+06	3.37	2.19E+06	4.85	1.51E+06	3.60	1.62E+06
Sertralin	5.41	7.41E+06	4.42	5.31E+06	6.08	3.31E+06	5.93	4.42E+06
Fluconazol	2.55	1.71E+06	2.15	1.51E+06	2.45	1.94E+06	2.25	1.17E+06
Alprazolam	4.35	3.88E+06	3.54	2.24E+06	5.25	3.14E+06	4.00	2.92E+06
N-desmethyl citalopram	3.29	5.63E+06	2.61	1.95E+06	4.08	2.36E+06	3.77	3.89E+06
N-desmethyl klozapin	3.95	6.15E+06	3.15	5.46E+06	4.51	4.88E+06	4.39	1.47E+06
Olanzapin	4.26	1.49E+07	3.58	1.28E+07	4.92	8.59E+06	4.39	9.59E+05
Bromazepam	3.61	7.38E+05	2.93	7.33E+05	3.97	6.81E+06	3.15	5.03E+05
Klonazepam	3.82	1.01E+06	3.13	6.96E+05	4.19	9.44E+05	3.21	1.09E+06
Lorazepam	4.29	9.97E+05	3.49	1.13E+06	4.14	8.80E+05	3.59	1.18E+06
Citalopram	3.47	1.99E+07	2.80	2.00E+07	4.51	1.37E+07	4.04	6.48E+06
Klozapin	5.51	2.39E+06	4.75	2.17E+06	5.56	2.10E+06	5.29	1.25E+06
Paroxetin	4.07	3.63E+06	3.26	3.05E+06	5.26	2.77E+06	4.75	2.54E+06
Voriconazol	4.31	8.32E+06	3.54	5.12E+06	4.04	2.94E+06	3.81	6.75E+06
Perampanel	4.44	7.30E+06	3.77	7.21E+06	6.09	4.50E+06	4.06	5.15E+06
Topiramát	2.99	1.93E+06	2.46	1.79E+06	2.83	1.86E+06	2.55	1.90E+06
Amisulprid	2.04	1.52E+07	1.65	1.57E+07	2.98	1.32E+07	2.29	9.63E+06

Pokračování tabulky 70 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Acquity BEH C-18		Kinetex C-18		Kinetex Biphenyl		Raptor ARC C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Trazodon	5.36	3.57E+07	4.54	3.10E+07	6.10	2.79E+07	4.90	2.93E+07
Haloperidol	4.22	2.50E+07	3.57	1.38E+07	4.75	3.94E+07	4.42	2.50E+07
Kvetiapin	5.49	2.67E+07	4.65	2.54E+07	5.91	2.46E+07	5.02	3.13E+07
Risperidon	4.15	4.74E+07	3.53	4.45E+07	5.95	4.81E+07	4.37	3.08E+07
Ziprasidon	6.13	8.95E+06	5.40	7.97E+06	6.59	6.10E+06	5.72	6.31E+06
9-hydroxy risperidon	3.67	4.46E+07	3.08	4.08E+07	4.88	3.69E+07	3.64	3.93E+07
Flufenazin	6.75	6.77E+06	6.13	5.61E+06	6.51	5.02E+06	6.62	4.53E+06
Flupentixol	6.60	2.07E+07	5.93	1.77E+07	6.42	1.94E+07	6.43	1.30E+07
Dehydro aripiprazol	6.90	1.15E+07	6.35	8.17E+06	7.17	9.24E+06	6.66	6.12E+06
Aripiprazol	6.94	6.97E+06	6.41	5.33E+06	7.28	5.99E+06	6.66	5.11E+06
Methotrexát	1.07	5.48E+06	nezaznamenán	nezaznamenán	0.75	4.32E+06	0.50	8.20E+06
7-hydroxy methotrexát	1.21	3.93E+05	nezaznamenán	nezaznamenán	0.53	3.40E+06	0.51	2.40E+06
Desmethyl amiodaron	7.43	2.92E+06	6.98	2.01E+06	7.77	2.74E+06	7.73	2.92E+06
Amidaron	8.20	3.19E+06	7.97	2.84E+06	8.26	1.62E+06	8.28	2.25E+06
Posakonazol	6.26	8.65E+05	5.73	9.90E+05	7.13	5.44E+05	6.09	3.73E+05
Itrakonazol	6.85	4.65E+05	6.44	3.49E+05	7.84	2.51E+05	6.72	3.37E+05
Kys. valproová	3.59	1.57E+05	2.85	9.53E+04	2.24	6.48E+04	2.86	5.88E+04
Fenobarbital	2.86	6.18E+04	2.34	5.80E+04	2.61	5.63E+04	2.40	7.32E+04

Další testovanou kolonou byla Kinetex C-8, u které bylo pozorováno zkrácení retenčních časů v důsledku kratšího alkylovému řetězci C8 stacionární fáze. Kolona neposkytovala dostatečné rozlišení a nedostatečnou selektivitu během 10minutové chromatografické analýzy. Jako poslední byla testována kolona Arion, která poskytovala špatnou symetrii, nízkou odezvu a špatné rozložení analytů v čase.

Tabulka 71 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Kinetex C-8		Thermo C-18		Astra Arion C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Pregabalin	1.01	2.10E+05	1.29	2.74E+05	1.65	1.92E+05
Levetiracetam	1.08	1.57E+06	1.35	1.29E+06	1.78	1.74E+06
Gabapentin	0.99	9.68E+05	1.25	1.29E+06	1.66	8.97E+05
Theofylin	1.04	6.66E+05	1.27	4.85E+05	1.81	8.22E+05
Zonisamid	1.62	9.59E+05	1.92	7.71E+05	2.28	8.82E+05
Brivaraceta	2.59	1.57E+06	2.88	2.71E+06	3.45	3.63E+06
Primidon	2.08	8.64E+05	2.29	7.41E+05	2.61	1.02E+06
Acyklovir	0.64	6.93E+05	0.75	1.10E+06	0.77	1.59E+06
Karbamazepin	2.80	8.85E+05	3.13	6.40E+05	3.83	8.59E+05
Rufinamid	2.06	1.69E+06	2.25	1.91E+06	2.52	2.09E+06
8-hydroxy acyclovir	0.53	2.47E+06	0.61	2.73E+06	0.55	1.67E+06
Lacosamid	2.10	7.81E+06	2.28	5.28E+06	2.62	6.97E+06
Fenytoin	2.42	8.65E+05	2.65	7.62E+05	3.11	8.30E+05
Epoxykarbamazepin	2.41	2.00E+06	2.66	1.96E+06	3.12	2.20E+06
Stiripentol	5.48	5.27E+05	6.20	1.36E+06	7.00	1.89E+06
Eslikarbamazepin	5.97	2.15E+06	7.04	4.84E+06	7.86	8.20E+06
Lamotrigin	2.19	3.33E+05	2.42	4.59E+05	2.75	3.12E+05

Pokračování tabulky 71 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Kinetex C-8		Thermo C-18		Astra Arion C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
O-desmethyl venlafaxin	1.99	2.18E+07	2.29	2.95E+07	2.58	2.74E+07
Mirtazapin	3.83	2.86E+07	4.48	2.35E+07	5.56	2.85E+07
Nordiazepam	3.68	1.19E+06	4.21	1.31E+06	5.15	1.11E+06
Venlafaxin	2.60	3.04E+07	2.97	3.89E+07	3.69	3.68E+07
Diazepam	3.92	3.40E+06	4.44	2.83E+06	5.47	3.04E+06
Norklobazam	2.99	7.37E+05	3.34	6.74E+05	4.04	6.27E+05
Sulthiam	6.67	1.59E+05	7.35	1.98E+05	8.13	3.13E+05
N-desmethyl sertralin	4.10	2.45E+04	4.87	1.09E+04	5.91	7.95E+03
N-desmethyl olanzapin	2.54	1.75E+07	2.93	1.81E+07	3.57	1.76E+07
Vortioxetin	4.43	6.60E+06	5.32	1.01E+07	6.34	8.79E+06
Klobazam	3.21	1.47E+06	3.58	1.43E+06	4.37	2.11E+06
Sertralin	4.13	4.48E+06	4.87	3.67E+06	6.04	5.38E+06
Flukonazol	2.09	1.36E+06	2.30	8.98E+05	2.56	1.40E+06
Alprazolam	3.34	3.88E+06	3.79	3.28E+06	4.61	3.72E+06
N-desmethyl citalopram	2.61	2.03E+06	3.00	3.46E+06	3.51	4.03E+06
N-desmethyl klozapin	3.04	4.91E+06	3.56	6.06E+06	4.41	5.34E+06
Olanzapin	3.20	1.30E+07	3.71	1.23E+07	4.86	1.07E+07
Bromazepam	2.79	4.79E+05	3.13	3.72E+05	3.89	2.80E+05
Klonazepam	3.00	8.96E+05	3.30	1.23E+06	4.01	7.47E+05
Lorazepam	3.31	9.00E+05	3.70	9.91E+05	4.47	8.84E+05
Citalopram	2.73	1.25E+07	3.14	1.35E+07	3.84	1.63E+07
Klozapin	4.22	2.10E+06	4.88	2.32E+06	6.08	2.99E+06

Pokračování tabulky 71 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Kinetex C-8		Thermo C-18		Astra Arion C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Paroxetin	3.25	2.07E+06	3.74	2.71E+06	4.52	2.71E+06
Vorikonazol	3.3	5.58E+06	3.72	5.53E+06	4.60	6.70E+06
Perampanel	3.58	7.98E+06	3.86	6.87E+06	4.86	3.87E+06
Topiramát	2.37	2.36E+06	2.61	2.05E+06	3.10	1.88E+06
Amisulprid	1.67	7.29E+06	1.93	1.46E+07	2.21	1.72E+07
Trazodon	4.00	3.50E+07	4.60	3.43E+07	5.89	3.44E+07
Haloperidol	3.28	2.51E+07	3.66	3.75E+07	4.81	2.56E+07
Quetiapin	4.16	3.31E+07	4.78	3.27E+07	5.92	3.10E+07
Risperidon	3.15	4.43E+07	3.59	4.91E+07	4.84	4.04E+07
Ziprasidon	4.68	8.72E+06	5.43	9.92E+06	6.64	1.04E+07
9-hydroxy risperidon	2.77	4.48E+07	3.14	3.73E+07	4.19	4.84E+07
Fluphenazin	5.46	5.33E+06	6.27	7.25E+06	7.23	1.01E+07
Fluphentixol	5.28	2.13E+07	6.07	2.24E+07	7.07	3.34E+07
Dehydro aripiprazol	5.57	8.56E+06	6.34	9.14E+06	7.47	1.89E+07
Aripiprazol	5.61	6.26E+06	6.39	6.64E+06	7.52	1.00E+07
Methotrexat	0.71	3.96E+06	0.91	7.40E+06	1.15	1.63E+06
7-hydroxy methotrexat	0.72	2.91E+05	0.67	8.10E+05	1.34	6.05E+04
Desmethyl amiodaron	6.25	1.57E+06	7.02	2.47E+06	8.11	2.93E+06
Amidaron	7.07	1.84E+06	7.78	2.21E+06	6.58	3.44E+05
Posakonazol	5.02	8.02E+05	5.71	8.80E+05	6.75	1.31E+06
Itrakonazol	5.74	6.28E+05	6.34	5.72E+05	7.41	4.25E+05
Kys. valproová	2.67	1.07E+05	3.08	9.50E+04	3.68	1.37E+05

Pokračování tabulky 71 Porovnání odezvy a retenčního času daných analytů v závislosti na změnách kolon

	Kinetex C-8		Thermo C-18		Astra Arion C-18	
	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva	Retenční čas	Odezva
Fenobarbital	2.28	5.39E+04	2.51	5.86E+04	2.91	7.27E+04

Pro validaci metody stanovení 62 léčiv ze séra pomocí UPLC-MS/MS byla na konec použita kolona od společnosti Waters Acquity UPLC BEH C18, která vykazovala nejlepší separační rozlišení v 10 minutové chromatografické analýze za experimentálního nastavení výše uvedených podmínek.

8.2 Testování úpravy vzorků

Pro stanovení léčiv z biologické matrice, jako je krev, pomocí LC-MS je běžné provést úpravu vzorku. Existuje celá řada technik (např. SPE, PPT, LLE a další), které je možné pro tento účel využít. Tabulka 28 uvádí některé příklady stanovení vybraných léčiv z biologické matrice pomocí LC-MS. Mezi velmi užívané techniky úpravy vzorku patří metoda PPT, která byla v tabulce 28 využita jako technika úpravy vzorků v 5 uvedených publikacích, následovaná technikou LLE a SPE. Mezi hlavní výhody PPT techniky je rychlost a jednoduchost.

Během vývoje metody pro testování úpravy vzorků bylo celkově testováno 6 různých příprav. Ty jsou podrobně popsány v tabulce 72, kdy během úpravy vzorku bylo přidáno 50 μL směsného standardu všech analytů o přibližné koncentraci (cca 200 ng/mL). Bohužel tato koncentrace je pouze orientační, a to z důvodu toho, že jsme neměli dostatečné množství všech standardů pro přípravu směsného standardu používaného pro tento experiment. Důležité však bylo, že jsme vytvořili dostatečné množství přidávaného směsného standardu (o přibližné koncentraci 200 ng/mL v metanolu) a u všech šesti postupů byl přidán stejný objem 50 μL . Z tohoto důvodu je možné tyto postupy mezi sebou porovnat. Každý z těchto postupů byl připravován 3x a výsledkem porovnání, mezi jednotlivými postupy, byla průměrná plocha píků každé látky, která je uvedena v tabulce 73.

Pro každou z těchto příprav byl proveden test chemikálií a test blankového séra (sérum od neužívajících dárců dodané krevním centrem FN Ostrava). Vzorek pro testování čistoty rozpouštědel (test chemikálií) byl připravován tak, že místo blank séra byla přidána voda a místo směsného vnitřního standardu a směsného standardu, byl přidán stejný objem metanolu. Následný postup zpracování vzorku již byl stejný. Experiment na testování vhodnosti blankového séra byl opět připravován obdobně. Experimenty byly provedeny z důvodu možného vyloučení kontaminace rozpouštědel a k testování blankových, které byly následně využity pro validaci metody.

Výsledkem bylo nalezení takové přípravy vzorku, která by poskytovala dostatečnou citlivost pro stanovení všech vybraných léčiv ze séra pomocí LC-MS/MS. Vzhledem k tomu, že se analyty vyskytují v rozdílných terapeutických rozmezech (koncentracích v reálných vzorcích) (tabulka 19–27), bylo nutné se zaměřit na látky s nejmenší koncentrací v reálných vzorcích, popřípadě s nejmenší odezvou. Mezi kritické analyty řadíme některé benzodiazepiny a psychofarmaka. V tabulce 73 můžeme pozorovat u některých analytů nárůst odezvy při kyselé přípravě vzorků přidáním kyseliny. Tento druhý přípravy vyhovoval nejvíce analytům, zejména tedy

antiepileptikům jako je levetiracetam, brivaracetam, lakosamid a jiné, nicméně nalezneme taktéž i psychofarmaka, kterým tento způsob vyhovoval taktéž (O-desmethyl venlafaxin, venlafaxin nebo mirtazapin). Po vyhodnocení všech šesti experimentů přípravy vzorků vykazovaly nejlepší výsledky postup přípravy č. 3 a č. 4. V těchto přípravách byla použita HClO_4 (příprava č.3) nebo HCOOH (příprava č.4). Z vyhodnocení poskytnutých odezev (ploch píků) jsme došli k závěru, že i přes to, že některým psychofarmakům tato příprava ne zcela vyhovuje (např. N-desmethyl sertralin), jsme zvolili přípravu č. 3.

Z tabulky 73 je možné vypočítat nízkou anebo žádnou plochu u těchto analytů: methotrexát a jeho metabolit, acyklovir a jeho metabolit a N-desmethyl sertralin během úpravy vzorků č. 3.

Tabulka 72 Postup přípravy vzorků séra

Číslo přípravy	Postup přípravy
1	200 µL blank séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu, 400µL srážecí směsi (0,5 ml 11% ZnSO ₄ + 9,5 ml směsi MeOH:ACN v poměru 3:2, v/v), 200µL H ₂ O → vortex 30s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)
2	200 µL séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu, 400µL MeOH, 200µL H ₂ O → vortex 30 s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)
3	200 µL blank séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu, 20µL 25 % HClO ₄ → vortex 30 s → 20µL 0.5M NH ₄ /H ₂ O, 50µL H ₂ O → vortex 30 s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)
4	200 µL blank séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu, 400µL 1% HCOOH ve směsi MeOH:ACN (3:2, v/v), 200µL H ₂ O → vortex 30s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)
5	200 µL blank séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu, 400µL 0,5 % HCOOH v MeOH, 200µL H ₂ O → vortex 30 s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)
6	200 µL blank séra, 50 µL vnitřního standardu, 50 µL směsného standardu 400µL srážecí směsi (0,5 ml 11 % ZnSO ₄ + 9,5 ml směsi MeOH), 200µL H ₂ O → vortex 30 s a centrifugace (4000 ot./min. při 4°C)

Tabulka 73 Porovnání průměrných ploch píků vybraných analytů pro jednotlivé postupy přípravy vzorků séra

č. úpravy vzorků	1	2	3	4	5	6
Analyt	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva
Pregabalin	9897.76	9722.86	36194.55	30388.37	23933.30	14173.89
Levetiracetam	87722.03	83948.03	128725.09	116935.85	93132.13	95640.88
Gabapentin	17406.20	13623.11	70895.04	48505.08	34607.10	19820.69
Theophylin	1075.18	1079.05	8251.77	2532.58	1923.65	2099.46
Zonisamid	35119.11	30834.84	45008.40	34979.57	27627.02	36235.52
Brivaracetat	130441.67	116823.05	236895.78	119870.10	119556.03	135116.24
Primidon	40686.95	37532.91	63304.11	41761.21	38379.12	42290.35
Acyklovir	32.22	25.35	-	8275.72	4034.92	93.80
Karbamazepin	28832.21	25486.51	27038.59	27022.83	25007.21	29244.13
Rufinamid	100540.21	86772.26	140982.38	78487.63	82937.42	108285.80
8-hydroxy acyclovir	-	-	-	9426.85	632.64	-
Lacosamid	194120.39	176677.43	249388.87	196619.45	163279.75	190233.89
Fenytoin	3799.48	2968.74	4768.67	5056.18	4026.76	3662.33
Epoxykarbamazepin	181197.40	155499.91	10540.73	98141.32	135262.70	180238.19
Stiripentol	23705.58	19424.72	442.09	19181.92	16110.66	20758.87
Eslikarbamazepine	4504.48	5735.39	61662.41	11260.60	12442.28	4178.81
Lamotrigin	11683.95	11342.70	18343.26	10174.09	11373.69	12997.08
O-desmethyl venlafaxin	770605.44	706107.33	1171598.75	878895.58	699706.58	777486.60
Mirtazapin	621599.23	545487.88	1156413.17	709707.25	558406.69	628616.54
Nordiazepam	46132.03	41914.01	93307.62	47771.34	40028.34	49856.98
Venlafaxin	1469603.71	1292158.71	2264729.33	1505365.17	1296509.63	1499073.00
Diazepam	64851.10	53675.99	144154.91	79532.71	61979.33	79913.21
Norclobazam	41331.95	34221.88	30506.95	30822.63	29890.41	37508.00

Pokračování tabulky 73 Porovnání průměrných ploch piků vybraných analytů pro jednotlivé postupy přípravy vzorků séra

č. úpravy vzorků	1	2	3	4	5	6
Analyt	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva
Sulthiam	175558.61	8322.92	13397.30	8909.71	7533.03	10392.12
N-desmethyl sertralin	3641.08	3697.89	1258.87	6617.27	4658.84	3456.94
N-desmethyl olanzapin	1085571.21	959428.46	1209477.38	2322733.33	1353625.21	1009655.67
Vortioxetin	376166.56	315195.64	127277.73	437569.72	338246.89	338448.73
Klobazam	74871.33	64661.55	39071.13	80221.81	68719.82	73052.74
Sertralin	168533.33	141561.47	43847.83	230633.82	145630.59	148871.19
Fluconazol	13090.75	13119.94	48191.07	31713.75	29266.06	15065.08
Alprazolam	131027.11	117549.02	114681.76	131118.40	118541.48	132867.61
N-desmethyl citalopram	135889.75	122269.55	109213.20	139283.88	131541.91	135063.32
N-desmethyl klozapin	241736.58	204424.48	273464.43	242756.92	221156.40	233069.03
Olanzapine	240186.22	209506.92	344580.23	276607.02	215542.58	238936.66
Bromazepam	3056.97	3372.90	13943.03	13174.80	7414.02	3532.44
Klonazepam	25026.89	21706.33	43862.27	21976.96	20891.90	24086.28
Lorazepam	17229.04	14618.08	28140.84	21615.37	16684.66	18598.50
Citalopram	513148.66	465397.85	446446.23	520834.90	457218.11	540439.83
Klozapin	37362.52	30553.17	51247.20	43024.32	35534.65	38938.97
Paroxetin	109965.53	93018.53	44831.50	151862.92	116075.29	102244.78
Voriconazol	165811.83	144814.63	463660.50	256622.54	225738.36	200046.59
Perampanel	275900.63	243223.25	330043.34	269182.10	233736.64	274957.91
Topiramat	57958.66	49793.47	107743.79	34712.85	51019.26	56827.56
Amisulprid	325897.47	171368.28	517531.61	377568.21	319013.69	361602.85
Trazodon	854064.25	743893.21	738466.50	914184.02	777235.96	864202.15
Haloperidol	743538.83	678180.17	605163.83	1109080.33	915685.63	769035.40

Pokračování tabulky 73 Porovnání průměrných ploch piků vybraných analytů pro jednotlivé postupy přípravy vzorků séra

č. úpravy vzorků	1	2	3	4	5	6
Analyt	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva	Odezva
Quetiapin	684560.94	616543.25	1095090.29	768988.85	618852.33	699781.67
Risperidon	1896180.00	1651846.79	2166229.83	2056904.79	1557171.75	1939051.38
Ziprasidon	271700.02	227932.45	88989.77	301437.96	262858.57	264880.57
9-hydroxy risperidon	1043321.02	889528.17	1117796.38	842544.71	761257.27	1030460.29
Fluphenazin	485314.24	419410.80	182459.54	453026.31	395671.70	453743.33
Fluphenthixol	259458.37	221472.62	58636.81	213013.95	203053.97	240983.43
Dehydro aripiprazol	257183.76	221576.77	33795.59	215359.26	221772.10	231281.25
Aripiprazol	214168.40	184776.23	28162.29	158594.17	197335.60	200061.74
Methotrexat	893.11	593.55	48709.46	38885.14	34894.59	1855.17
7-hydroxy methotrexat	177.58	132.00	11298.01	11641.35	3055.19	63.64
Desmethyl amiodaron	179057.44	117500.13	7734.32	143207.40	127453.28	153160.03
Amidaron	290217.47	214898.69	127300.48	218244.50	170311.86	220321.15
Posakonazol	16535.32	13570.21	7748.18	17811.74	16090.89	17844.04
Itrakonazol	14734.73	12240.10	1837.42	10469.18	11177.00	12668.36
Kys. valproová	19055.38	17060.65	34305.95	19861.83	16800.80	20335.24
Fenobarbital	775.42	685.33	1672.98	1226.49	1013.00	797.58

8.3 Validace metody

Metoda byla validována dle kritérií Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration – FDA) na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, opakovatelnost, mezilehlá preciznost.

8.3.1 Selktivita

Testování Selektivity proběhlo analýzou šesti blankových sér od neužívajících dárců. Selektivita byla i testována s během experimentu testování úpravy vzorku (kapitola 8.2).

8.3.2 Linearita

Pro kvantifikaci všech analytů byly připravovány kalibrační křivky. Dle očekávaných koncentrací v reálných vzorcích jsme skupiny analytů rozdělili do 5 tříd (LOW, MEDIUM, HIGH, MEGA HIGH a VPA) viz tabulka 58. Třídy LOW, MEDIUM, HIGH a MEGA HIGH obsahovaly 15 kalibračních bodů, zbylá kalibrace pro kyselinu valproovou (VPA) měla pouze bodů 12. Vzhledem k vysokým terapeutickým rozmezím byly některé látky zastoupeny ve více třídách, viz tabulka 58. Z tohoto důvodu je u některých látek více jak 15 kalibračních standardů. Prvním bodem kalibračních křivek všech látek byl vždy jejich LLOQ (spodní limit meze kvantifikace) a celkový počet kalibračních bodů se dále odvíjel od zastoupení v daných koncentračních třídách (LOW, MEDIUM, HIGH, MEGA HIGH, VPA – viz tabulka 58). Z tohoto důvodu byl počet kalibračních bodů pro různé látky odlišný.

Například u gabapentinu (obsaženého v zásobních roztocích MEDIUM, HIGH, MEGA HIGH) byl celkový počet kalibračních bodů 28.

Při kalibraci byly vynášeny plochy standardů vztažené k ploše vnitřního standardu v závislosti na koncentraci analytu. Aplikovaná byla lineární regresní křivka v příloze č. 1 až příloha č. 57 jsou uvedeny kalibrační křivky všech analytů. Vzhledem k vysokým terapeutickým rozmezím některých analytů (koncentračnímu rozsahu kalibračních křivek není vždy závislost plochy píku na koncentraci analytu lineární). Kvadratickou závislost můžeme pozorovat například u analytů: gabapentin, brivaracetát, lakosamid, fenytoin, epoxykarbamazepin, eslikarbamazepin a další (viz přílohy). Analýzou komerčních QC kontrol bylo zjištěno že některé koncentrační hladiny těchto kontrol nevycházely (nespadala do požadovaném rozmezí koncentrací). Z tohoto důvodu byla pro některé analyty kalibrační křivka rozdělena na 2 části. Příkladem je látka eslikarbamazepin, u které byla kalibrační křivka rozdělena na dvě části. První z nich (nízká) byla naklibrována od 12

do 4500 ng/mL v séru a druhá kalibrační křivka(vysoká) byla naklibrována od 1125 do 45000 ng/mL. Po tomto rozdělení křivek došlo ke správné kalkulaci koncentrací komerčních QC kontrol. Toto rozdělení bylo provedeno u rufinamidu a jiných látek.

8.3.3 Opakovatelnost a mezilehlá preciznost

Pro hodnocení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti byly měřeny standardní vzorky. Měření probíhalo deset krát a vždy na jedné ze čtyř koncentračních hladin, které byly specifické pro každou látku. Z naměřených hodnot bylo vypočítáno: relativní směrodatná odchylka (SD), průměr, recovery a variační koeficient.

Dle kritérií by měla vyvinutá metoda splňovat hodnotu variačního koeficientu (VK, RSD) do $\pm 15 \%$ a dále hodnoty výtěžnosti neboli recovery v rozmezí od 80 do 120 %.

První kalibrační body byl pro všechny analyty akceptován jako spodní limit kvantifikace (LLOQ), z důvodu toho že odezva látek byla minimálně 10krát vyšší než odezva blanku s přijatelnou přesností (20%) a správností (80-120%). Koncentrace druhého kalibračního bodu by měla odpovídat trojnásobku LOQ. Další kalibrační hladiny pro hodnocení validace byly zvoleny tak aby kalibračně spadaly do středních hodnot terapeutického rozmezí daných látek a poslední hodnota se pohybovala v vyšších koncentracích kalibrační křivky.

Výsledky opakovatelnosti vybraných validovaných látek lze nalézt v kapitole 8.3.3.1

Výsledky mezilehlé preciznosti vybraných validovaných látek lze nalézt v kapitole 8.3.3.2

První kalibrační hladina byla vždy zvolena tak aby odpovídala limitu kvantifikace (LOQ), druhá hladina byla volena tak aby byla do trojnásobku LOQ, třetí hladina tak aby byl bod uprostřed kalibrační závislosti a čtvrtá hladina byla hladinou nejvyšší. Z naměřených hodnot byly pro každou látku vypočítány

8.3.3.1 Opakovatelnost

Tabulka 74 Výsledky opakovatelnosti měření pregabalínu, levetiracetamu, gabapentinu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		PREGABALIN				AEP		LEVETIRACETAM				AEP		GABAPENTIN			
Standard č.		H. 6	H. 7	M. 14	H. 15	Standard č.		H. 6	H. 7	H. 15	MH. 14	Standard č.		H. 6	H. 7	MH. 11	MH. 13
Koncentrace		12	30	1000	12000	Koncentrace		12	30	12000	22500	Koncentrace		12	30	4500	11250
měření	1	11.8	29.4	1021.4	12032.6	měření	1	11.3	29.6	12212.4	22531.8	měření	1	11.8	30.6	4470.6	11114.1
	2	12.3	29.3	969.6	11437.6		2	12	29.5	11960.1	22496.1		2	12.6	30.1	4492.9	11164.1
	3	12.3	31.7	1009.7	11399.4		3	11.7	30.7	12039.7	22917.6		3	12.1	30.8	4439.7	11437
	4	12.3	29.3	1000.3	11368.5		4	12	30.4	12001.7	22313		4	11.9	29.9	4426.5	11407.2
	5	12.1	29.1	998.3	12389.9		5	12.1	29.7	11968.8	22426.2		5	11.8	31.2	4561.6	11137.1
	6	12.5	30.2	1033.3	12250.9		6	12.6	30.6	12031.8	25922.1		6	11.8	29.9	4405.3	11577.8
	7	12.5	29.9	999.3	12314.9		7	12	29.7	12225.5	22396.7		7	12	29.6	4488.3	11419.1
	8	12.2	29.5	1004.8	12198.8		8	12.6	30.2	12136.3	22930		8	12.4	28.9	4433.5	11291.8
	9	12.2	29.7	972.3	11937.5		9	11.7	30.6	12132.2	22236.2		9	12.4	29	4466.4	11235.6
	10	12.2	29.9	966.6	11615		10	11.7	30.2	12233.4	23014.1		10	12.8	29.5	4564.5	11124.9
průměr		12.24	29.80	997.56	11894.51	průměr		11.97	30.12	12094.19	22918.38	průměr		12.16	29.95	4474.93	11290.87
SD		0.20	0.75	22.20	404.33	SD		0.41	0.46	106.94	1090.65	SD		0.37	0.75	54.04	161.67
RSD %		1.64	2.51	2.23	3.40	RSD %		3.39	1.52	0.88	4.76	RSD %		3.01	2.50	1.21	1.43
Recovery %		102.00	99.33	99.76	99.12	Recovery %		99.75	100.40	100.78	101.86	Recovery %		101.33	99.83	99.44	100.36
Odchylka %		-2.00	0.67	0.24	0.88	Odchylka %		-0.25	0.40	0.78	1.86	Odchylka %		1.33	-0.17	-0.56	0.36

Tabulka 75 Výsledky opakovatelnosti měření theofylinu, zonisamidu, brivaracetátu. MH. – mega high, H – high, M – medium

DILAT		THEOFYLIN				AEP	ZONISAMID				AEP	BRIVARACETAT					
Standard č.		H.7	H. 9	M.H. 13	M.H. 14	Standard č.	H. 8	H. 9	H. 15	MH. 14	Standard č.	M. 9	M. 10	M. 12	M. 14		
Koncentrace		60	120	11250	22500	Koncentrace	60	120	12000	22500	Koncentrace	20	50	200	1000		
měření	1	60.2	123.1	11131.3	22425.3	měření	1	58.4	120.3	11885.9	22689.1	měření	1	20	49.6	200.3	1002.9
	2	62.5	122.9	11420.6	22874.4		2	61.4	120.7	11879.3	22461.2		2	19.7	50.2	200.2	982.6
	3	61.6	116.8	11367.2	22067.5		3	60.9	119.8	11986.2	22640.9		3	20.2	49.7	199	985
	4	62.6	117.6	11249.3	22055.2		4	61.2	118.9	11964.5	22447.6		4	20.1	50.2	202.3	1035.1
	5	61.3	119.6	11258	22886.7		5	61	118.5	12097.7	22857.7		5	19.6	49.4	202.3	996.6
	6	59.3	120.3	11196.9	22146.5		6	61.6	119.2	11725.4	22664.7		6	19.6	50.5	199.6	978.6
	7	59.3	121.4	12087.3	22486.2		7	59.9	120.6	12390.3	22361.2		7	19.8	50.2	200.9	993
	8	61.1	119.9	11468.7	21821.3		8	57.8	122.4	12377.3	22415.6		8	19.6	50.4	202.8	1014.7
	9	60.4	122.9	11305.5	22474.4		9	58.1	118.5	12233.7	22553		9	20.1	49.7	200.3	996
	10	60	120.3	11172.9	22505.4		10	68	118.8	12595.7	22649.4		10	20.4	50	202.4	1005
průměr		60.83	120.48	11365.77	22374.29	průměr	60.83	119.77	12113.60	22574.04	průměr	19.91	49.99	201.01	998.95		
SD		1.19	2.17	275.62	350.97	SD	2.90	1.25	276.71	153.35	SD	0.29	0.37	1.34	16.78		
RSD %		1.96	1.80	2.43	1.57	RSD %	4.77	1.04	2.28	0.68	RSD %	1.45	0.74	0.67	1.68		
Recovery %		101.38	100.40	101.03	99.44	Recovery %	101.38	99.81	100.95	100.33	Recovery %	99.55	99.98	100.51	99.90		
Odchylka %		1.38	0.40	1.03	-0.56	Odchylka %	1.38	-0.19	0.95	0.33	Odchylka %	-0.45	-0.02	0.50	-0.11		

Tabulka 76 Výsledky opakovatelnosti měření karbamazepinu, rufinamidu, lakosamidu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		KARBAMAZEPIN				AEP		RUFINAMID				AEP		LAKOSAMID			
Standard č.		H. 7	H. 8	MH. 11	H. 15	Standard č.		H. 6	H. 7	MH. 11	H. 15	Standard č.		M. 7	H. 4	M. 14	H. 15
Koncentrace		30	60	4500	12000	Koncentrace		12	30	4500	12000	Koncentrace		5	12	1000	12000
měření	1	31.4	60	4446.5	12334.9	měření	1	12.1	29.3	4608	11853.9	měření	1	4.9	12.1	1043.9	11914.5
	2	29.8	60.8	4473.6	12047.6		2	12.5	30.8	4514.9	12086.4		2	4.9	12	1018	12005.5
	3	29.2	61.1	4523.8	12216.1		3	12.1	30.4	4509	12124.5		3	5	11.9	992.1	12076.1
	4	30.9	59.2	4571.6	12233.8		4	11.9	30	4436.2	11916		4	4.9	12	1016.1	12059
	5	29.6	59.5	4449.9	11826.3		5	12.1	30.4	4554.2	12258.7		5	4.9	11.9	1011.2	12003
	6	29.9	59.8	4477.6	12085.9		6	11.9	30.4	4585	11905.1		6	4.9	12	1011.4	12096.4
	7	28.9	61.1	4529.8	12307		7	12.2	29.7	4593.1	12082		7	4.9	12.1	1001.7	11972.8
	8	30.8	61.2	4441.5	11926		8	12.5	30.7	4528.7	11896.1		8	4.9	11.9	916.5	12000.9
	9	30.8	59	4518.6	12144.5		9	12.3	32.1	4578.2	11900		9	5	12.1	992.9	12101.4
	10	29.8	60.8	4577.9	12041.4		10	11.8	29.5	4532.9	12283.3		10	5	12	935.7	12000
průměr		30.11	60.25	4501.08	12116.35	průměr		12.14	30.33	4544.02	12030.60	průměr		4.93	12.00	993.95	12022.96
SD		0.82	0.85	50.53	163.40	SD		0.24	0.80	51.11	158.36	SD		0.05	0.08	38.90	59.32
RSD %		2.72	1.40	1.12	1.35	RSD %		1.99	2.64	1.12	1.32	RSD %		0.98	0.68	3.91	0.49
Recovery %		100.37	100.42	100.02	100.97	Recovery %		101.17	101.10	100.98	100.26	Recovery %		98.60	100.00	99.40	100.19
Odchylka %		0.37	0.42	0.02	0.97	Odchylka %		1.17	1.10	0.98	0.26	Odchylka %		-1.40	0.00	-0.61	0.19

Tabulka 77 Výsledky opakovatelnosti měření fenytoinu, epoxykarbamazepinu, stiripentolu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		FENYTOIN				AEP		EPOXYKARBAMAZEPIN				AEP		STIRIPENTOL			
Standard č.		H. 8	H. 9	MH. 11	MH.14	Standard č.		H. 8	H. 9	MH. 11	H. 15	Standard č.		H. 9	M. 12	M. 14	H. 15
Koncentrace		60	120	4500	22500	Koncentrace		60	120	4500	12000	Koncentrace		120	200	1000	12000
měření	1	59.9	119.5	4512.2	22381.9	měření	1	60.2	120.5	4521	11875.9	měření	1	119.4	198	1049.3	11986.3
	2	60.3	119.8	4503.3	22566.2		2	60	119.2	4460.6	12026.5		2	118.8	201.1	962.5	12219.9
	3	59.7	120	4527	22505.1		3	59.9	119.1	4520.6	12094.8		3	122.1	199.1	1004.2	12245
	4	59.7	120.3	4483	22626.7		4	60.4	120.9	4447.8	11971.8		4	118.7	198.1	1010.3	12159.5
	5	60.2	120.3	4548	22411.9		5	59.6	119.8	4549.4	12113.9		5	120.1	199.8	1002.9	11947.1
	6	60.1	119.8	4478.6	22522.7		6	59.7	119.7	4541.8	11979.8		6	119.4	200.7	1004.4	12056
	7	60.2	120.3	4962.5	22487.8		7	60.3	120.1	4471.8	12102.7		7	120.6	200.6	986.3	12126.7
	8	60	119.9	4498.5	22510.7		8	60.5	120.6	4526.8	11935.3		8	119.9	198.1	974.7	11892.2
	9	59.8	119.8	4550.3	22528.9		9	59.7	120.5	4467.7	12041.7		9	120.2	200.7	996	12130
	10	60	120	4538.2	22447.6		10	60.5	119.3	4562.8	12073.4		10	120.9	198.5	1053	12088.9
průměr		59.99	119.97	4560.16	22498.95	průměr		60.08	119.97	4507.03	12021.58	průměr		120.01	199.47	1004.36	12085.16
SD		0.21	0.27	143.62	71.89	SD		0.35	0.64	41.28	79.21	SD		1.03	1.25	28.77	115.42
RSD %		0.36	0.22	3.15	0.32	RSD %		0.58	0.54	0.92	0.66	RSD %		0.86	0.63	2.86	0.96
Recovery %		99.98	99.98	101.34	100.00	Recovery %		100.13	99.98	100.16	100.18	Recovery %		100.01	99.74	100.44	100.71
Odchylka %		-0.02	-0.03	1.34	0.00	Odchylka %		0.13	-0.03	0.16	0.18	Odchylka %		0.01	-0.27	0.44	0.71

Tabulka 78 Výsledky opakovatelnosti měření eslikarbamazepinu, lamotriginu, O-desmethyl venlafaxinu. MH. – mega high, H – high, L – low

AEP		ESLIKARBAMAZEPIN				AEP		LAMOTRIGIN				PSYCHO	O-DESMETHYL VENLAFAXIN				
Standard č.		H. 6	H. 7	H. 15	MH. 14	Standard č.		H. 7	H. 8	H. 9	H. 15	Standard č.	L. 4	L. 5	L. 12	L. 14	
Koncentrace		12	30	12000	22500	Koncentrace		30	60	120	12000	Koncentrace	0.1	0.4	80	400	
měření	1	12.5	30	12097.9	21983.8	měření	1	29.8	60.7	121.1	11899.5	měření	1	0.1	0.4	80	398.9
	2	12.1	30	12083.9	23011.9		2	30.3	60.3	119.3	12093.6		2	0.1	0.4	79.5	392.2
	3	12	30	12087.5	22299.2		3	29.6	59.8	120.1	11926.7		3	0.1	0.4	78.5	400.3
	4	12.4	30	12185.5	22420.2		4	30.1	59.5	119.8	12017		4	0.1	0.4	81.4	399.2
	5	12	30	12018.2	22850.8		5	29.2	59.6	119.1	11890.3		5	0.1	0.4	80.6	402.8
	6	12.5	30	12113.4	22249.5		6	29.7	60.3	121.2	12023.3		6	0.1	0.4	80.9	401.9
	7	12.4	30	11970.6	22120.4		7	30.2	59.2	120.7	12048.2		7	0.1	0.4	80.7	398.1
	8	12.1	30	11986.7	22533.2		8	29.8	59.6	119.2	11811.1		8	0.1	0.4	80	401.3
	9	12.1	30	12087.7	22667.8		9	29.8	59.9	119.7	12105.1		9	0.1	0.4	80	399.9
	10	12.3	30	12000.9	22654.2		10	30.1	60.4	120.4	12130.3		10	0.1	0.4	80.3	398.7
průměr		12.24	30.00	12063.23	22479.10	průměr		29.86	59.93	120.06	11994.51	průměr		0.10	0.40	80.19	399.33
SD		0.20	0.00	67.19	325.54	SD		0.33	0.48	0.77	106.89	SD		0.00	0.00	0.81	2.92
RSD %		1.64	0.00	0.56	1.45	RSD %		1.10	0.79	0.64	0.89	RSD %		0.00	0.00	1.01	0.73
Recovery %		102.00	100.00	100.53	99.91	Recovery %		99.53	99.88	100.05	99.95	Recovery %		100.00	100.00	100.24	99.83
Odchylka %		2.00	0.00	0.53	-0.09	Odchylka %		-0.47	-0.12	0.05	-0.05	Odchylka %		0.00	0.00	0.24	-0.17

Tabulka 79 Výsledky opakovatelnosti měření mirtazapinu, N-desmethyl diazepam, venlafaxinu. L – low

PSYCHO		MIRTAZAPIN				BZD	N-DESMETHYL DIAZEPAM				PSYCHO	VENLAFAXIN					
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.	L. 8	L. 10	H. 9	M. 14	Standard č.	L. 4	L. 5	L. 12	L. 14		
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace	4	10	120	1000	Koncentrace	0.1	0.4	80	400		
měření	1	0.4	1	9.9	100.1	měření	1	4	10.1	119.9	1057.4	měření	1	0.1	0.4	79.2	403.1
	2	0.4	1	9.9	97.9		2	4.1	9.9	119.7	945.5		2	0.1	0.4	79.2	400.1
	3	0.4	1	10	101.7		3	4	9.9	119.9	1020.6		3	0.1	0.4	80.1	400.8
	4	0.4	1	9.7	100.9		4	4.1	9.9	119.7	957.6		4	0.1	0.4	79.8	405.2
	5	0.4	1	9.9	99.3		5	4	10	119.7	1031.2		5	0.1	0.4	79.6	397.5
	6	0.4	1	9.9	100.7		6	3.9	10.1	119.6	1009.4		6	0.1	0.4	79.8	402.7
	7	0.4	1	9.9	99.3		7	4	9.9	121.4	1111.1		7	0.1	0.4	79.9	402.9
	8	0.4	1	9.9	100.5		8	3.9	10.1	119.5	986.3		8	0.1	0.4	80.4	400.9
	9	0.4	1	10	100		9	4	10	121.9	1034.9		9	0.1	0.4	81.8	402.4
	10	0.4	1	9.9			10	3.9	10.1	120.4	947.6		10	0.1	0.4	80.2	398.8
průměr		0.40	1.00	9.90	100.04	průměr	3.99	10.00	120.17	1010.16	průměr	0.10	0.40	80.00	401.44		
SD		0.00	0.00	0.08	1.11	SD	0.07	0.09	0.83	52.72	SD	0.00	0.00	0.74	2.27		
RSD %		0.00	0.00	0.82	1.11	RSD %	1.85	0.94	0.69	5.22	RSD %	0.00	0.00	0.93	0.57		
Recovery %		100.00	100.00	99.00	125.06	Recovery %	99.75	100.00	100.14	101.02	Recovery %	100.00	100.00	100.00	100.36		
Odchylka %		0.00	0.00	-1.00	25.06	Odchylka %	-0.25	0.00	0.14	1.02	Odchylka %	0.00	0.00	0.00	0.36		

Tabulka 80 Výsledky opakovatelnosti měření diazepam, N-desmethyl klobazamu, sulthiamu. H – high, M – medium, L – low

BZD		DIAZEPAM				BZD		N-DESMETHYL KLOBAZAM				AEP		SULTHIAM			
Standard č.		L. 10	M. 9	L. 14	M. 14	Standard č.		L. 12	H. 9	L. 14	M. 14	Standard č.		H. 6	H. 7	M. 14	H. 15
Koncentrace		10	20	400	1000	Koncentrace		80	120	400	1000	Koncentrace		12	30	1000	12000
měření	1	10.2	19.6	398.7	1011.9	měření	1	80.3	122	397.7	987.4	měření	1	12	29.2	1184.1	11356.2
	2	10	20.4	401.5	1007.7		2	81.7	120.8	411.5	1080.7		2	12	31.5	944.4	12280.6
	3	10	20.6	399.6	987.4		3	81.7	119.3	389.3	1047.7		3	12.4	30.7	996.9	11713.2
	4	10	20.6	395.6	1080.7		4	80	136	395.6	1098.4		4	12.1	30.7	937.5	12120.7
	5	10.2	20.2	399.1	1047.7		5	80.3	126.4	399.1	1008		5	12	29.4	1002.5	11263.4
	6	9.3	20.7	399.1	1098.4		6	80.7	126	399.5	1011.3		6	11.6	29.6	1042.9	12478.5
	7	11	20.3	397.5	1008		7	79.6	142	397.5	1041.2		7	11.6	29.1	1077.8	11725.9
	8	9.8	20.3	406.6	1011.3		8	81.8	132.9	406.6	1034.9		8	11.8	29.1	951.9	11829.2
	9	10	20.3	405	1041.2		9	79.1	120.6	405.2	947.6		9	12.2	29	1003.3	12133.4
	10	10.1	20.8	399.5	977.7		10	80.7	114	399.7	996.6		10	12	29.5	960.3	11826.3
průměr		10.06	20.38	400.22	1027.20	průměr		80.59	126.00	400.17	1025.38	průměr		11.97	29.78	1010.16	11872.74
SD		0.42	0.34	3.33	39.18	SD		0.92	8.59	6.23	44.79	SD		0.25	0.87	75.77	387.57
RSD %		4.17	1.66	0.83	3.81	RSD %		1.15	6.82	1.56	4.37	RSD %		2.09	2.91	7.50	3.26
Recovery %		100.60	101.90	100.06	102.72	Recovery %		100.74	105.00	100.04	102.54	Recovery %		99.75	99.27	101.02	98.94
Odchylka %		0.60	1.90	0.06	2.72	Odchylka %		0.74	5.00	0.04	2.54	Odchylka %		-0.25	-0.73	1.02	-1.06

Tabulka 81 Výsledky opakovatelnosti měření N-desmethyl olanzapinu, vortioxetinu, klobazamu. L – low

PSYCHO		N-DESMETHYL OLANZAPIN				PSYCHO		VORTIOXETIN				BZD		KLOBAZAM			
Standard č.		L. 4	L.5	L. 12	L. 14	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 8	L. 10	L. 12	L. 14
Koncentrace		0.1	0.4	80	400	Koncentrace		1	4	10	80	Koncentrace		4	10	80	400
měření	1	0.1	0.4	80.6	405	měření	1	0.9	3.9	9.5	79.9	měření	1	3.8	10	80	398.1
	2	0.1	0.4	81	398.4		2	1	4.1	10	79.9		2	3.8	9.7	79.6	402.9
	3	0.1	0.4	79.4	405.2		3	0.9	3.9	9.9	79.7		3	4.1	10	79.2	401.6
	4	0.1	0.4	81	406.4		4	1.1	4.1	9.9	81.6		4	4.1	9.5	80.1	407.2
	5	0.1	0.4	79.6	399.8		5	0.9	4	10	80.4		5	3.9	9.8	81.5	401.7
	6	0.1	0.4	82.7	398.3		6	1	4.1	10	79.9		6	4.2	9.9	80.3	399.9
	7	0.1	0.4	80.2	400.6		7	0.9	3.9	9.7	80.6		7	4.2	9.8	80	399.8
	8	0.1	0.4	80.7	402.6		8	1.1	3.9	10.7	79.8		8	3.9	9.7	81.3	399
	9	0.1	0.4	80.6	402.3		9	1	4.1	9.6	81.7		9	3.9	10	79.1	407.5
	10	0.1	0.4	81.9	395		10	1	4	10	80.8		10	3.8	9.4	79.3	394.7
průměr		0.10	0.40	80.77	401.36	průměr		0.98	4.00	9.93	80.43	průměr		3.97	9.78	80.04	401.24
SD		0.00	0.00	0.99	3.61	SD		0.08	0.09	0.33	0.74	SD		0.16	0.21	0.82	3.93
RSD %		0.00	0.00	1.22	0.90	RSD %		8.05	2.36	3.29	0.92	RSD %		4.12	2.14	1.03	0.98
Recovery %		100.00	100.00	100.96	100.34	Recovery %		98.00	100.00	99.30	100.54	Recovery %		99.25	97.80	100.05	100.31
Odchylka %		0.00	0.00	0.96	0.34	Odchylka %		-2.00	0.00	-0.70	0.54	Odchylka %		-0.75	-2.20	0.05	0.31

Tabulka 82 Výsledky opakovatelnosti měření sertralinu, flukonazolu, alprazolamu. MH. – mega high, H – high, L – low

PSYCHO		SERTRALIN				ATM		FLUKONAZOL				BZD		ALPRAZOLAM			
Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14	Standard č.		H. 8	H. 9	H. 15	MH. 14	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14
Koncentrace		1	4	80	400	Koncentrace		60	120	12000	22500	Koncentrace		1	4	80	400
měření	1	1.1	4	80.7	395.8	měření	1	59.4	121.4	11952.1	22560.6	měření	1	0.9	4	81	413.3
	2	0.8	3.9	79.8	391.1		2	59.8	119.8	11946.9	22527.8		2	1	4.1	81.1	412.5
	3	1.1	4	81.8	409.2		3	61.7	122.6	11525.1	22505.6		3	1.1	4.1	81	401.3
	4	1.1	4	80.3	399.8		4	62.5	120.8	12203.5	22492.4		4	1	4	78.9	404.4
	5	1	3.8	81.1	413		5	60.9	120	12261.1	22194.5		5	1	4.1	80.6	393.9
	6	1	4	81.6	409.1		6	61.7	121.6	12431.4	22249.1		6	1.1	4.1	81.4	407.2
	7	1.1	4.1	81	399.8		7	61.7	118.3	12118.1	22367.2		7	0.9	4.1	79.5	399.9
	8	1.1	4	80.7	407.6		8	59.9	120.7	12331.1	22863		8	1	4.2	79.3	415.2
	9	1.1	4	81.8	398.3		9	58.5	119.5	11967.5	22381.1		9	0.9	3.9	80.2	405.9
	10	1.1	4.2	80.9	419.2		10	60.2	118.9	12230.9	22528.8		10	0.9	4	80.4	395.2
průměr		1.05	4.00	80.97	404.29	průměr		60.63	120.36	12096.77	22467.01	průměr		0.98	4.06	80.34	404.88
SD		0.10	0.11	0.65	8.68	SD		1.27	1.31	260.48	186.88	SD		0.08	0.08	0.85	7.41
RSD %		9.26	2.64	0.80	2.15	RSD %		2.09	1.09	2.15	0.83	RSD %		8.05	2.08	1.06	1.83
Recovery %		105.00	100.00	101.21	101.07	Recovery %		101.05	100.30	100.81	99.85	Recovery %		98.00	101.50	100.43	101.22
Odchylka %		5.00	0.00	1.21	1.07	Odchylka %		1.05	0.30	0.81	-0.15	Odchylka %		-2.00	1.50	0.42	1.22

Tabulka 83 Výsledky opakovatelnosti N-desmethyl citalopramu, N-desmethyl klozapinu, olanzapinu., M – medium, L – low

PSYCHO		N-DESMETHYL CITALOPRAM				PSYCHO		N-DESMETHYL KLOZAPIN				PSYCHO		OLANZAPIN			
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 10	M. 9	L. 14	M. 14	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace		10	20	400	1000	Koncentrace		0.4	1	10	80
měření	1	0.4	1	10	80.6	měření	1	10	20.6	409	992.1	měření	1	0.4	1	9.7	81.2
	2	0.4	0.9	10.1	79.2		2	10.4	20.8	403.9	1001.9		2	0.4	1.1	10.1	80.7
	3	0.4	0.9	10.4	80.7		3	9.9	21.6	390.5	1004.7		3	0.4	0.8	10.3	79.7
	4	0.4	0.9	10.7	81.9		4	10.5	19.4	405.1	1004.2		4	0.5	0.9	9.6	80.9
	5	0.4	0.8	10.1	82.9		5	10.1	21.6	392.8	1098.6		5	0.4	1.2	9.9	81.4
	6	0.4	1.1	10.6	81.4		6	10.4	20	409.6	977.3		6	0.4	1.1	9.6	79.7
	7	0.4	0.9	9.9	78.3		7	10.1	19.3	397.1	1043.9		7	0.4	0.9	9.8	80.4
	8	0.4	0.9	9.8	80.7		8	10.1	20.7	403.8	999.4		8	0.4	0.9	9.5	81.7
	9	0.4	1	10.8	81.2		9	10	19.7	418.3	978.8		9	0.4	0.9	10.7	82.8
	10	0.4	0.9	10.1	80		10	10.5	20.3	406.1	968.9		10	0.4	0.9	9.6	78.9
průměr		0.40	0.93	10.25	80.69	průměr		10.20	20.40	403.62	1006.98	průměr		0.41	0.97	9.88	80.74
SD		0.00	0.08	0.35	1.31	SD		0.23	0.82	8.30	38.30	SD		0.03	0.13	0.38	1.13
RSD %		0.00	8.85	3.42	1.63	RSD %		2.22	4.02	2.06	3.80	RSD %		7.71	12.90	3.87	1.40
Recovery %		100.00	93.00	102.50	100.86	Recovery %		102.00	102.00	100.91	100.70	Recovery %		102.50	97.00	98.80	100.93
Odchylka %		0.00	-7.00	2.50	0.86	Odchylka %		2.00	2.00	0.91	0.70	Odchylka %		2.50	-3.00	-1.20	0.92

Tabulka 84 Výsledky opakovatelnosti měření citalopramu, klozapinu, perampanelu. M – medium, L – low

PSYCHO		CITALOPRAM				PSYCHO		KLOZAPIN				AEP		PERAMPANEL			
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 14	M. 14	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 14	M. 14
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace		1	4	400	1000	Koncentrace		0.4	1	400	1000
měření	1	0.4	1.1	10	80.2	měření	1	0.9	4	397.9	1004.5	měření	1	0.4	1	398.4	1013.6
	2	0.4	1	10.3	80.5		2	1.1	4	389.4	1024		2	0.4	1.1	403.1	983.7
	3	0.4	1.1	9.7	79.3		3	1	4	407.7	1021.3		3	0.4	1	402	1007.8
	4	0.4	1	10	81.7		4	1.2	3.8	402.5	1049.1		4	0.5	1.1	403.9	982.8
	5	0.5	1	10	81		5	1	4.2	413.8	969.2		5	0.4	1.1	396.7	989.2
	6	0.4	1	10.3	81.7		6	1	4.1	407.5	1032.7		6	0.4	1.1	406.1	1024.7
	7	0.4	1	10.2	79		7	1.1	4.2	404.7	1029.1		7	0.5	1.2	397.9	1019.3
	8	0.4	1.1	10.5	80		8	1.1	4.1	400.9	1023.5		8	0.4	1.1	408.3	994.6
	9	0.4	1.2	10.1	80.2		9	1	4	387.1	995.6		9	0.4	0.9	402.7	1037.5
	10	0.4	1.2	10.4	80		10	0.9	4	393.7	1010.3		10	0.4	1	402.4	989.9
průměr		0.41	1.07	10.15	80.36	průměr		1.03	4.04	400.52	1015.93	průměr		0.42	1.06	402.15	1004.31
SD		0.03	0.08	0.24	0.90	SD		0.09	0.12	8.53	22.27	SD		0.04	0.08	3.65	19.03
RSD %		7.71	7.69	2.33	1.12	RSD %		9.21	2.91	2.13	2.19	RSD %		10.04	7.96	0.91	1.89
Recovery %		102.50	107.00	101.50	100.45	Recovery %		103.00	101.00	100.13	101.59	Recovery %		105.00	106.00	100.54	100.43
Odchylka %		2.50	7.00	1.50	0.45	Odchylka %		3.00	1.00	0.13	1.59	Odchylka %		5.00	6.00	0.54	0.43

Tabulka 85 Výsledky opakovatelnosti měření topiramátu, trazodonu, haloperidolu. H – high, M – medium, L – low

AEP		TOPIRAMÁT				PSYCHO		TRAZODON				PSYCHO		HALOPERIDOL			
Standard č.		M. 7	H. 6	M. 14	H. 15	Standard č.		L. 7	M. 7	M. 12	M. 14	Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12
Konzentrace		5	12	1000	12000	Konzentrace		1	5	200	1000	Konzentrace		0.1	0.4	10	80
měření	1	4.8	12.4	1004.4	11882.1	měření	1	1.1	5.1	193.1	1031.1	měření	1	0.1	0.4	9.8	80.2
	2	4.9	11.7	995.7	12202.7		2	1.1	5.2	184.8	986.1		2	0.1	0.4	9.9	79.9
	3	5.1	12.2	1001.9	11599.5		3	1	5.1	191.5	1038.3		3	0.1	0.4	10.5	83.8
	4	5.6	11.5	1006.6	12164.6		4	1.1	5	186.8	1029.7		4	0.1	0.4	9.6	79.2
	5	5	11.9	1020.6	11876.5		5	1	5	191.1	1010.4		5	0.1	0.5	9.2	79.9
	6	5.1	12.6	1026.9	11970.1		6	1.3	5	207	1009.9		6	0.1	0.4	10	78.3
	7	4.6	11.8	1059.4	11885.4		7	1	5.1	193	1015.7		7	0.1	0.4	9.8	80.9
	8	5.2	11.8	990.9	11643.5		8	1	5.2	189.7	997.8		8	0.1	0.4	10.1	79.5
	9	5.3	12.8	1033.6	12227.1		9	1.2	4.9	193.4	1011.4		9	0.1	0.4	10.1	81.9
	10	4.8	11.6	1034.6	11821.7		10	1	5	197.3	1032.6		10	0.1	0.4	10.3	79
průměr		5.04	12.03	1017.46	11927.32	průměr		1.08	5.06	192.77	1016.30	průměr		0.10	0.41	9.93	80.26
SD		0.29	0.44	21.40	218.43	SD		0.10	0.10	6.12	16.68	SD		0.00	0.03	0.37	1.60
RSD %		5.70	3.70	2.10	1.83	RSD %		9.56	1.91	3.17	1.64	RSD %		0.00	7.71	3.68	1.99
Recovery %		100.80	100.25	101.75	99.39	Recovery %		108.00	101.20	96.39	101.63	Recovery %		100.00	102.50	99.30	100.33
Odchylka %		0.80	0.25	1.75	-0.61	Odchylka %		8.00	1.20	-3.61	1.63	Odchylka %		0.00	2.50	-0.70	0.33

Tabulka 86 Výsledky opakovatelnosti měření kvetiapinu, risperidonu, ziprasidonu. L – low

PSYCHO		KVETIAPIN				PSYCHO		RISPERIDON				PSYCHO		ZIPRASIDON			
Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14	Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 12	L. 14
Koncentrace		1	4	80	400	Koncentrace		0.1	0.4	10	80	Koncentrace		0.4	1	80	400
měření	1	1	4.2	78.7	402.5	měření	1	0.1	0.4	10.1	80.2	měření	1	0.4	1	80.6	402.1
	2	1	4.1	82.6	402.8		2	0.1	0.4	10	78.8		2	0.4	1.2	83	417
	3	0.9	3.8	80.2	413.3		3	0.1	0.4	9.9	82		3	0.5	1.1	78.7	408.5
	4	0.9	4.1	82.2	396.9		4	0.1	0.4	10.2	79.7		4	0.4	1	79.6	413.5
	5	1	4.1	79.9	399.4		5	0.1	0.4	10.4	84.3		5	0.5	1.2	80.4	407.6
	6	1	4.3	87.6	398.5		6	0.1	0.4	9.6	83.2		6	0.4	1.1	82.9	413.4
	7	1	4.2	78	409.1		7	0.1	0.4	10.1	78		7	0.4	1.1	80.9	257.1
	8	1	4.2	80.1	406.1		8	0.1	0.4	10.3	81		8	0.4	1.1	80.5	399.1
	9	0.9	4.1	80	414.7		9	0.1	0.4	10	84.7		9	0.4	1.1	82.1	397.2
	10	0.8	4	80.8	421		10	0.1	0.5	10	80.9		10	0.4	1.1	81.5	392.6
průměr		0.95	4.11	81.01	406.43	průměr		0.10	0.41	10.06	81.28	průměr		0.42	1.10	81.02	390.81
SD		0.07	0.14	2.70	7.94	SD		0.00	0.03	0.22	2.26	SD		0.04	0.07	1.38	47.64
RSD %		7.44	3.33	3.33	1.95	RSD %		0.00	7.71	2.21	2.78	RSD %		10.04	6.06	1.70	12.19
Recovery %		95.00	102.75	101.26	101.61	Recovery %		100.00	102.50	100.60	101.60	Recovery %		105.00	110.00	101.28	97.70
Odchylka %		-5.00	2.75	1.26	1.61	Odchylka %		0.00	2.50	0.60	1.60	Odchylka %		5.00	10.00	1.28	-2.30

Tabulka 87 Výsledky opakovatelnosti měření 9-hydroxy risperidonu, flupentixolu, flufenazinu. L– low

PSYCHO		9-HYDROXY RISPERIDON				PSYCHO		FLUPENTIXOL				PSYCHO		FLUFENAZIN			
Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 8	L. 10	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 10	L. 12
Koncentrace		0.1	0.4	10	80	Koncentrace		0.4	1	4	10	Koncentrace		1	4	10	80
měření	1	0.1	0.4	10	80.2	měření	1	0.4	1	4	10.1	měření	1	0.9	4	9.8	81.2
	2	0.1	0.4	10	80.2		2	0.5	1	4	9.7		2	0.9	3.9	9.6	78.9
	3	0.1	0.4	10.4	80.1		3	0.4	1	3.9	10.1		3	1.1	4.1	10.7	79.9
	4	0.1	0.5	10	81.1		4	0.4	1	3.9	10.1		4	0.9	3.9	10.1	79
	5	0.1	0.4	10.1	81		5	0.4	1	4.1	9.7		5	0.9	3.9	9.5	80.5
	6	0.1	0.4	10.1	79.6		6	0.5	1.1	3.9	10.4		6	1	3.9	10.1	80
	7	0.1	0.4	9.8	78.5		7	0.4	0.9	4	9.8		7	0.9	4.1	9.6	81.4
	8	0.1	0.4	10.2	79.6		8	0.4	0.8	4.1	9.8		8	0.9	4.2	10	79.5
	9	0.1	0.4	10	80.7		9	0.4	0.9	4.1	10.3		9	1	4.1	10.2	81.9
	10	0.1	0.4	9.9	82		10	0.4	0.9	4.2	9.8		10	0.9	4	9.9	79.8
průměr		0.10	0.41	10.05	80.30	průměr		0.42	0.96	4.02	9.98	průměr		0.94	4.01	9.95	80.21
SD		0.00	0.03	0.16	0.97	SD		0.04	0.08	0.10	0.25	SD		0.07	0.11	0.36	1.02
RSD %		0.00	7.71	1.64	1.21	RSD %		10.04	8.78	2.57	2.53	RSD %		7.44	2.74	3.58	1.27
Recovery %		100.00	102.50	100.50	100.38	Recovery %		105.00	96.00	100.50	99.80	Recovery %		94.00	100.25	99.50	100.26
Odchylka %		0.00	2.50	0.50	0.38	Odchylka %		5.00	-4.00	0.50	-0.20	Odchylka %		-6.00	0.25	-0.50	0.26

Tabulka 88 Výsledky opakovatelnosti měření dehydro aripiprazolu, aripiprazolu, posakonazolu. M – medium, L – low

PSYCHO		DEHYDRO ARIPIPAZOL				PSYCHO		ARIPIPAZOL				ATM		POSAKONAZOL			
Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14	Standard č.		L. 8	L. 10	L. 12	L. 14	Standard č.		M. 9	M. 10	M. 12	M. 14
Koncentrace		1	4	80	400	Koncentrace		4	10	80	400	Koncentrace		20	50	200	1000
měření	1	0.9	4.2	80.9	394.6	měření	1	3.9	9.8	79.4	392.4	měření	1	21.9	50.6	208.2	993.8
	2	1	4.1	80.9	398.7		2	4.2	10	78.8	393.6		2	21.1	49.9	200.1	943.1
	3	0.9	3.9	83.5	409.2		3	3.9	9.9	79.2	395.9		3	20	52.6	194.9	956.4
	4	1	4.2	81.9	399.5		4	4.1	9.3	83	401.1		4	19.8	50.2	202.1	1000.3
	5	0.9	3.8	81.8	409.8		5	4.1	9.3	78.9	394.3		5	19.2	52.7	194.2	1008.2
	6	1.2	4	80	394.8		6	4	10.9	78	400.4		6	20.3	50.5	199.5	960
	7	0.8	3.8	81.3	416.4		7	4.2	9.5	81.2	425		7	20.7	50.9	199.8	1050.9
	8	1.1	3.9	82.5	400		8	4.1	10.4	79.3	407.6		8	20.2	52.8	195.7	959.4
	9	1	4.1	81.5	402.6		9	4	9.6	81.7	410.1		9	20.4	48.6	205.9	1089
	10	1.2	4	80.1	408.9		10	4	9.9	81.3	404.8		10	20.6	48.3	197	982
průměr		1.00	4.00	81.44	403.45	průměr		4.05	9.86	80.08	402.52	průměr		20.42	50.71	199.74	994.31
SD		0.13	0.15	1.06	7.26	SD		0.11	0.50	1.60	9.96	SD		0.74	1.60	4.63	45.95
RSD %		13.33	3.73	1.31	1.80	RSD %		2.67	5.04	2.00	2.48	RSD %		3.60	3.16	2.32	4.62
Recovery %		100.00	100.00	101.80	100.86	Recovery %		101.25	98.60	100.10	100.63	Recovery %		102.10	101.42	99.87	99.43
Odchylka %		0.00	0.00	1.80	0.86	Odchylka %		1.25	-1.40	0.10	0.63	Odchylka %		2.10	1.42	-0.13	-0.57

Tabulka 89 Výsledky opakovatelnosti měření itrakonazolu, kyseliny valproové, fenobarbitalu. VPA – kyselina valproová MH. – mega high, H – high, M – medium

ATM		ITRAKONAZOL				AEP	KYSELINA VALPROOVÁ				AEP	FENOBARBITAL					
Standard č.		M. 9	M. 10	M. 12	M. 14	Standard č.	VPA 4	VPA 5	VPA 10	VPA 15	Standard č.	H. 8	H. 9	H. 15	MH. 14		
Koncentrace		20	50	200	1000	Koncentrace	312.5	625	31250	125000	Koncentrace	60	120	12000	22500		
měření	1	23.1	49.9	199.4	1014.4	měření	1	316	636.2	33775.3	123718	měření	1	60.7	121.2	12056.3	22601.8
	2	23.3	49.8	191.3	972.3		2	334.9	629.8	30892.1	123129.1		2	60	119.9	11916.6	21881
	3	22.8	50.7	190.5	1080.2		3	302.9	624.7	30967.9	128138.8		3	59.9	120	12113.8	22031.1
	4	23.5	51.8	197	959		4	325.2	675.4	31913.3	132326		4	59.7	120.6	12391.2	22572.6
	5	23.1	50	190.9	1035.9		5	306.6	659.9	29466	125117.1		5	62	120.7	11989.2	22447.1
	6	21.3	50.3	196.1	973.1		6	326.7	683.2	32288.1	129547.2		6	58.9	122.8	12030.9	22276.7
	7	21	50.6	195.6	993		7	320	642.1	32144.8	111593		7	62.2	120.4	12056.7	22602.6
	8	20.5	52	181.4	965.1		8	324.5	661.7	30636	126501.9		8	61.8	119.6	11912	22535.8
	9	20.3	53.5	200.8	1031.2		9	317.7	613.5	31891.6	124981.3		9	60.7	120.6	12227.3	22835.9
	10	19.7	48.9	186.3	1045.4		10	315.8	635.4	31662.2	130671.7		10	59.5	120.9	12336.8	22739.4
průměr		21.86	50.75	192.93	1006.96	průměr	319.03	646.19	31563.73	125572.41	průměr	60.54	120.67	12103.08	22452.40		
SD		1.44	1.34	6.03	40.71	SD	9.52	22.81	1157.59	5775.93	SD	1.14	0.89	165.66	303.79		
RSD %		6.60	2.63	3.12	4.04	RSD %	2.98	3.53	3.67	4.60	RSD %	1.88	0.74	1.37	1.35		
Recovery %		109.30	101.50	96.47	100.70	Recovery %	102.09	103.39	101.00	100.46	Recovery %	100.90	100.56	100.86	99.79		
Odchylka %		9.30	1.50	-3.54	0.70	Odchylka %	2.09	3.39	1.00	0.46	Odchylka %	0.90	0.56	0.86	-0.21		

8.3.3.2 Mezilehlá preciznost

Tabulka 90 Výsledky mezilehlé preciznosti měření pregabalínu, levetiracetamu, gabapentinu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		PREGABALIN				AEP		LEVETIRACETAM				AEP		GABAPENTIN			
Standard č.		H. 6	H. 7	M. 14	H. 15	Standard č.		H. 6	H. 7	H. 15	M.H. 14	Standard č.		H. 6	H. 7	M.H. 11	M.H. 13
Koncentrace		12	30	1000	12000	Koncentrace		12	30	4500	22500	Koncentrace		12	30	4500	11250
měření	1	11.2	29.3	990.2	12095	měření	1	12.8	33.4	4556.8	22152.6	měření	1	11.8	29.9	4560.9	11230.1
	2	12.3	29.3	980.8	12395.5		2	12.5	36.5	4576.2	22547.9		2	12.3	29.6	4611.2	11282.5
	3	12.3	31.2	992.3	11849.7		3	12.5	37.3	4574.9	22165.8		3	12.5	29.5	4567.7	11324.7
	4	12.4	31.5	1000.1	12122.3		4	12.2	34.8	4532.1	22277.8		4	11.9	29.7	4505.9	11377.8
	5	12.2	29	1015.9	12016.9		5	12.1	33.1	4509.9	22566.1		5	12	30.2	4600	11486.4
	6	11.8	31	1005.8	11686.5		6	11.7	30.4	4802.4	22689.5		6	12.5	30.1	4545.1	11597.5
	7	12.3	29.9	1003.1	12048.6		7	13.1	30.1	4761	22366.6		7	12.2	30.8	4592.4	11337.6
	8	12.6	28.6	1004.2	11562.7		8	11.7	30.7	4888	22115.8		8	12.3	29	4526.1	11187.5
	9	11.6	29.3	983	12328.8		9	12.6	30.3	4802	22522.3		9	12.4	30.1	4527.8	11172.4
	10	12	30.8	1005.2	12088.9		10	13.1	30.5	4758.6	22624.84		10	12.5	29.5	4617.4	11765.1
průměr		12.07	29.99	998.06	12019.49	průměr		12.43	32.71	4676.19	22402.92	průměr		12.24	29.84	4565.45	11376.16
SD		0.42	1.04	11.14	259.78	SD		0.51	2.73	138.86	213.85	SD		0.26	0.49	38.96	189.67
RSD %		3.52	3.47	1.12	2.16	RSD %		4.07	8.36	2.97	0.95	RSD %		2.12	1.66	0.85	1.67
Recovery %		100.58	99.97	99.81	100.16	Recovery %		103.58	109.03	103.92	99.57	Recovery %		102.00	99.47	101.45	101.12
Odchylka %		-0.58	0.03	0.19	-0.16	Odchylka %		3.58	9.03	3.92	-0.43	Odchylka %		2.00	-0.53	1.45	1.12

Tabulka 91 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření theofylinu, zonisamidu, brivaracetátu. MH. – mega high, H – high, M – medium

DILAT		THEOFYLIN				AEP		ZONISAMID				AEP		BRIVARACETAT			
Standard č.		H.7	H. 9	M.H. 13	M.H. 14	Standard č.		H. 8	H. 9	H. 15	M.H. 14	Standard č.		M. 9	M. 10	M. 12	M. 14
Koncentrace		60	120	11250	22500	Koncentrace		60	120	12000	22500	Koncentrace		20	50	200	1000
měření	1	62.4	121.6	11542.3	22739.5	měření	1	66.1	118.7	12029.7	22301	měření	1	19.5	49.9	200	981.6
	2	59.1	120.6	11389.7	22858.6		2	58.2	121.6	11733.8	22555.6		2	19.9	49.3	197	998.3
	3	60.4	120.4	11317.8	22825.8		3	59.6	119.1	12087.5	22697		3	20	50.1	205	1019
	4	61.6	120.2	11360.9	22380.3		4	59.6	118.1	11919.3	22643.9		4	19.9	49.9	200	1007.2
	5	58.5	120	11293.5	22373.5		5	60.8	120	11975.4	22646.7		5	19.7	50.4	199.9	1000.3
	6	59.1	121.3	11152.4	22348.4		6	57.3	118	11707.4	22499.1		6	19.5	50.8	198.3	978.4
	7	61.8	117.8	11732.2	22521.2		7	60.6	119.2	11721	22521.8		7	20.3	50.5	198.9	1010.4
	8	59.4	119.3	11145	22259.7		8	60.2	118.3	12124.1	22339.8		8	20.1	49.6	202.7	1005.3
	9	60.9	119.3	11401.9	22306.3		9	59.9	118.2	12190.5	22289.5		9	20.2	49.4	199.6	1004.5
	10	60.6	120.3	11343.6	22553.5		10	60.1	120	12080	22813.4		10	20	49.5	200.8	1012.3
průměr		60.38	120.08	11367.93	22516.68	průměr		60.24	119.12	11956.87	22530.78	průměr		19.91	49.94	200.22	1001.73
SD		1.32	1.09	173.07	221.41	SD		2.32	1.14	179.34	177.30	SD		0.27	0.51	2.25	12.90
RSD %		2.19	0.91	1.52	0.98	RSD %		3.86	0.96	1.50	0.79	RSD %		1.37	1.01	1.13	1.29
Recovery %		100.63	100.07	101.05	100.07	Recovery %		100.40	99.27	99.64	100.14	Recovery %		99.55	99.88	100.11	100.17
Odchylka %		0.63	0.07	1.05	0.07	Odchylka %		0.40	-0.73	-0.36	0.14	Odchylka %		-0.45	-0.12	0.11	0.17

Tabulka 92 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření karbamazepinu, rufinamidu, lakosamidu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		KARBAMAZEPIN				AEP		RUFINAMID				AEP		LAKOSAMID			
Standard č.		H. 7	H. 8	M.H. 11	H. 15	Standard č.		H. 6	H. 7	M.H. 11	H. 15	Standard č.		M. 5	H. 6	M. 14	H. 15
Koncentrace		30	60	4500	12000	Koncentrace		12	30	4500	12000	Koncentrace		5	12	1000	12000
měření	1	31.2	58.8	4581.2	12036.4	měření	1	12	30.7	4578.3	12141.3	měření	1	4.9	12.1	1041.4	12057.5
	2	29.7	59.7	4550	12337.6		2	12.1	31.1	4531.5	12402.7		2	4.9	12.1	1020.4	12054.8
	3	29.6	61.1	4619.2	11897.2		3	11.9	29.6	4528.8	12308.4		3	5.1	12.1	998.9	11982.5
	4	29.9	58.9	4514.6	12174.9		4	11.9	29.9	4527.1	12064.3		4	5.1	11.9	1008.3	12032.3
	5	30.2	59	4521	12406.6		5	11.6	29.6	4572.8	11857		5	5	12	1007	12034.3
	6	29.1	60.7	4426.5	12186.5		6	11.9	29.6	4547.1	12185.8		6	5	12.1	1032.7	11978.4
	7	30.7	60.8	4642.7	12152.7		7	12.2	29.8	4502.4	12127.4		7	5	12.1	1018.6	12054.7
	8	29.9	59.9	4663.1	11821.6		8	12.2	28.9	4574.8	11737.1		8	4.9	12.1	1011.3	11986.4
	9	29.5	60.6	4685.1	12243.9		9	11.6	30.7	4445.8	11891.4		9	5	12.1	1035.6	12041.7
	10	31.4	59.9	4472.8	12099		10	12.2	30.1	4541.8	12316		10	5	12	997.6	11988
průměr		30.12	59.94	4567.62	12135.64	průměr		11.96	30.00	4535.04	12103.14	průměr		4.99	12.06	1017.18	12021.06
SD		0.75	0.84	85.38	181.66	SD		0.23	0.66	39.74	217.81	SD		0.07	0.07	15.33	33.21
RSD %		2.50	1.41	1.87	1.50	RSD %		1.90	2.21	0.88	1.80	RSD %		1.48	0.58	1.51	0.28
Recovery %		100.40	99.90	101.50	101.13	Recovery %		99.67	100.00	100.78	100.86	Recovery %		99.80	100.50	101.72	100.18
Odchylka %		0.40	-0.10	1.50	1.13	Odchylka %		-0.33	0.00	0.78	0.86	Odchylka %		-0.20	0.50	1.72	0.18

Tabulka 93 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření fenytoinu, epoxykarbamazepinu, stiripentolu. MH. – mega high, H – high, M – medium

AEP		FENYTOIN				AEP		EPOXY-KARBAMAZEPIN				AEP		STIRIPENTOL			
Standard č.		H. 8	H. 9	MH. 11	MH. 14	Standard č.		H. 8	H. 9	MH. 11	H. 15	Standard č.		H. 9	M. 12	M. 14	H. 15
Koncentrace		60	120	4500	22500	Koncentrace		60	120	4500	12000	Koncentrace		120	200	1000	12000
měření	1	60.3	119.9	4484.1	22486.9	měření	1	60.6	120.5	4480.7	12067	měření	1	119.2	199.3	1008.5	11946.3
	2	60.2	119.6	4443.7	22525		2	56.7	119.7	4496.9	12064.6		2	119.7	197.9	995.6	11921.8
	3	59.8	119.8	4525.3	22497.9		3	54.7	120.1	4543.6	12025.3		3	119.2	200.1	983.8	11894.3
	4	60.4	120	4473.4	22338.9		4	65.6	120.2	4528.7	11983.4		4	120	200.2	989.8	12054.7
	5	60.5	119.9	4533.8	22460.1		5	55.1	120.6	4448	12076.4		5	120.1	199.7	987.7	11900.8
	6	60.2	120	4521.8	22588.6		6	60.6	120.7	4462.5	11962.5		6	120.7	200.8	1026.6	12133.8
	7	60.3	119.9	4479.8	22619.9		7	60.1	119.3	4482	12061.8		7	119.7	204.5	995.6	11946.3
	8	60.1	120.2	4527.9	22497.9		8	58	120.6	4441.9	12074.5		8	118.9	200.1	989.8	12054.7
	9	59.9	119.9	4492.1	22588.6		9	60.6	120.9	4496.9	12025.3		9	121.1	200.2	1008.5	12054.7
	10	59.9	120	4523	22460.1		10	57.1	120.9	4448	11983.4		10	120	199.7	995.6	11921.8
průměr		60.16	119.92	4500.49	22506.39	průměr		58.91	120.35	4482.92	12032.42	průměr		119.86	200.25	998.15	11982.92
SD		0.23	0.15	30.12	81.38	SD		3.27	0.53	34.50	42.94	SD		0.68	1.68	12.90	83.65
RSD %		0.39	0.13	0.67	0.36	RSD %		5.54	0.44	0.77	0.36	RSD %		0.57	0.84	1.29	0.70
Recovery %		100.27	99.93	100.01	100.03	Recovery %		98.18	100.29	99.62	100.27	Recovery %		99.88	100.13	99.82	99.86
Odchylka %		0.27	-0.07	0.01	0.03	Odchylka %		-1.82	0.29	-0.38	0.27	Odchylka %		-0.12	0.13	-0.18	-0.14

Tabulka 94 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření eslikarbamazepinu, lamotriginu, O-desmethyl venlafaxinu. MH. – mega high, H – high, L – low

AEP		ESLIKARBAMAZEPIN				AEP		LAMOTRIGIN				PSYCHO		O-DESMETHYL VENLAFAXIN			
Standard č.		H.6	H. 7	H. 15	MH. 14	Standard č.		H. 7	H. 8	H. 9	H. 15	Standard č.		L. 4	L. 5	L. 12	L. 14
Koncentrace		12	30	12000	22500	Koncentrace		30	60	120	12000	Koncentrace		0.1	0.4	80	400
měření	1	12	29.8	12051.8	22434.8	měření	1	30.7	59.5	120.7	11941.2	měření	1	0.1	0.4	79.3	398.6
	2	11.9	29.7	11943.1	22488		2	30.3	59.8	120.5	11929.1		2	0.1	0.4	80.8	402.1
	3	12	29.7	11968.3	22464.7		3	30	59.4	119.2	12058.4		3	0.1	0.4	80.4	399.3
	4	12.1	29.9	11998.6	22495.3		4	29.6	59.7	120.9	12012.8		4	0.1	0.4	79.8	401
	5	12.1	30.1	12092	22534.8		5	30.3	59.4	120.7	11923.5		5	0.1	0.4	80.4	401.8
	6	11.9	29.8	12043.7	22478.2		6	29.8	60	120.7	11915.7		6	0.1	0.4	80.9	401.8
	7	11.9	29.9	11915.8	22557.1		7	30.2	59	120.5	12012.8		7	0.1	0.4	80.36	399.8
	8	11.9	29.8	12051.8	22495.3		8	29.7	59.9	120.5	12012.8		8	0.1	0.4	79.5	400.4
	9	11.9	30.2	11998.6	22488		9	29.8	60	120.7	12058.4		9	0.1	0.4	79	400.4
	10	12	29.7	11968.3	22495.3		10	29.5	60	120.5	11941.2		10	0.1	0.4	80.3	401
průměr		11.97	29.86	12003.20	22493.15	průměr		29.99	59.67	120.49	11980.59	průměr		0.10	0.40	80.08	400.62
SD		0.08	0.17	55.76	33.88	SD		0.38	0.34	0.47	56.22	SD		0.00	0.00	0.64	1.15
RSD %		0.69	0.57	0.46	0.15	RSD %		1.26	0.56	0.39	0.47	RSD %		0.00	0.00	0.80	0.29
Recovery %		99.75	99.53	100.03	99.97	Recovery %		99.97	99.45	100.41	99.84	Recovery %		100.00	100.00	100.10	100.16
Odchylka %		-0.25	-0.47	0.03	-0.03	Odchylka %		-0.03	-0.55	0.41	-0.16	Odchylka %		0.00	0.00	0.09	0.16

Tabulka 95 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření mirtazapinu, N-desmethyl diazepam, venlafaxinu. L – low

PSYCHO		MIRTAZAPIN				BZD	N-DESMETHYL DIAZEPAM				PSYCHO	VENLAFAXIN					
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.	L. 8	L. 10	H. 9	M. 14	Standard č.	L. 4	L. 5	L. 12	L. 14		
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace	4	10	120	1000	Koncentrace	0.1	0.4	80	400		
měření	1	0.4	1	10.1	80	měření	1	3.9	10	120.8	999.9	měření	1	0.1	0.4	80.6	400.7
	2	0.4	1	10	80.2		2	4	10.1	120.1	1000.6		2	0.1	0.4	79.4	399.7
	3	0.4	1	10.1	80.2		3	4	10.1	120.1	992.3		3	0.1	0.4	80.2	401.4
	4	0.4	1	10	80.1		4	4	9.9	120.4	992.7		4	0.1	0.4	79.5	400.5
	5	0.4	1	10.2	79.8		5	4	10	120.4	987.7		5	0.1	0.4	80.8	400.7
	6	0.4	1.1	10.1	80.2		6	4.1	10	119.6	1000.6		6	0.1	0.4	80.2	399.9
	7	0.4	1	10.1	79.5		7	3.9	10	119.5	985.5		7	0.1	0.4	80.3	401.6
	8	0.4	1	10	79.9		8	4	10.1	120.1	1006.8		8	0.1	0.4	79.5	398.5
	9	0.4	1	10.2	80		9	4.1	10.1	120.1	989.1		9	0.1	0.4	80.7	399.7
	10	0.4	1	10	80		10	4	10	120.1	992.7		10	0.1	0.4	80	400.5
průměr		0.40	1.01	10.08	79.99	průměr	4.00	10.03	120.12	994.79	průměr	0.10	0.40	80.12	400.32		
SD		0.00	0.03	0.08	0.22	SD	0.07	0.07	0.38	6.85	SD	0.00	0.00	0.51	0.91		
RSD %		0.00	3.13	0.78	0.27	RSD %	1.67	0.67	0.31	0.69	RSD %	0.00	0.00	0.64	0.23		
Recovery %		100.00	101.00	100.80	99.99	Recovery %	100.00	100.30	100.10	99.48	Recovery %	100.00	100.00	100.15	100.08		
Odchylka %		0.00	1.00	0.80	-0.01	Odchylka %	0.00	0.30	0.10	-0.52	Odchylka %	0.00	0.00	0.15	0.08		

Tabulka 96 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření diazepam, N-desmethyl klobazamu, sulthiamu. H – high, M – medium, L – low

BZD		DIAZEPAM				BZD		N-DESMETHYL KLOBAZAM				AEP		SULTHIAM			
Standard č.		L. 10	M. 8	L. 14	M. 14	Standard č.		H. 8	H. 9	L. 14	M. 14	Standard č.		H. 6	H.7	M. 14	H. 15
Koncentrace		10	20	400	1000	Koncentrace		60	120	400	1000	Koncentrace		12	30	1000	12000
měření	1	9.9	19	404.9	1015.9	měření	1	59	121.6	399.3	1028.3	měření	1	11.9	30.1	1014.3	12015
	2	10	19.9	401.1	1015.6		2	60	121.7	399.4	1034.7		2	12.2	29.9	1007.6	11926.3
	3	10	20.4	399	1000.9		3	59.8	119.1	404.5	1028.4		3	12	30.2	1029.2	11940.3
	4	9.9	19.7	398.2	1005.9		4	59.8	121.8	399.2	1023.5		4	12.2	29.6	1034.1	11980.8
	5	9.9	19.3	404	1015.4		5	61.6	118.1	403.4	1020		5	12.1	30.3	1039.8	11980.8
	6	10.1	19.9	404.4	1009.8		6	61.8	121	403	1028.4		6	12	30.3	1037.9	12015
	7	9.9	19.1	396.9	1039.2		7	59.1	121.9	400.6	1023.5		7	12	30.2	1045.8	12015
	8	9.8	20.4	401.6	1005.9		8	61.2	118.9	399.4	1020		8	12.3	29.9	1034.1	11940.3
	9	10	20.6	395.7	1000.9		9	61.6	121.3	399.4	1023.5		9	12.1	29.8	1014.3	11940.3
	10	10	20.6	399	1000.9		10	58.9	122.2	400.6	1028.3		10	12.1	29.8	1034.1	11940.3
průměr		9.95	19.89	400.48	1011.04	průměr		60.28	120.76	400.88	1025.86	průměr		12.09	30.01	1029.12	11969.41
SD		0.08	0.61	3.23	11.64	SD		1.16	1.48	2.00	4.57	SD		0.12	0.24	12.68	36.12
RSD %		0.85	3.06	0.81	1.15	RSD %		1.92	1.22	0.50	0.45	RSD %		0.99	0.81	1.23	0.30
Recovery %		99.50	99.45	100.12	101.10	Recovery %		100.47	100.63	100.22	102.59	Recovery %		100.75	100.03	102.91	99.75
Odchylka %		-0.50	-0.55	0.12	1.10	Odchylka %		0.47	0.63	0.22	2.59	Odchylka %		0.75	0.03	2.91	-0.25

Tabulka 97 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření N-desmethyl olanzapinu, vortioxetinu, klobazamu. L – low

PSYCHO		N-DESMETHYL OLANZAPIN				PSYCHO		VORTIOXETIN				BZD		KLOBAZAM			
Standard č.		L. 4	L. 5	L. 12	L. 14	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 8	L. 10	L. 12	L. 14
Koncentrace		0.1	0.4	80	400	Koncentrace		1	4	10	80	Koncentrace		4	10	80	400
měření	1	0.1	0.4	79.2	397.9	měření	1	0.9	3.9	10.2	80.5	měření	1	4	9.4	80.5	399.7
	2	0.1	0.4	80.5	397.9		2	0.9	3.9	9.5	80.1		2	3.8	9.7	80.4	394.1
	3	0.1	0.4	80.3	400		3	1	3.9	9.6	79.8		3	3.9	9.6	79.5	394
	4	0.1	0.4	80.8	397		4	0.9	4	9.8	81.4		4	4.1	9.7	80.9	396.1
	5	0.1	0.4	79.4	400.4		5	1	4	9.8	80.8		5	4	9.6	78.9	395.4
	6	0.1	0.4	80	404.7		6	1	3.9	10.2	79.8		6	3.8	9.6	79.8	393
	7	0.1	0.4	80	399.2		7	1	3.8	10.4	79.2		7	4.1	10.1	80.5	403.8
	8	0.1	0.4	80.3	401.9		8	1	3.8	9.8	82.3		8	4.1	9.7	79.2	396.7
	9	0.1	0.4	80.4	401.9		9	0.9	4	10	80.9		9	4	9.6	81.2	394.1
	10	0.1	0.4	80	400		10	1	4	10.1	81		10	3.8	10.2	82.1	403.1
průměr		0.10	0.40	80.09	400.09	průměr		0.96	3.92	9.94	80.58	průměr		3.96	9.72	80.30	397.00
SD		0.00	0.00	0.49	2.31	SD		0.05	0.08	0.29	0.90	SD		0.13	0.24	0.98	3.89
RSD %		0.00	0.00	0.61	0.58	RSD %		5.38	2.01	2.89	1.12	RSD %		3.19	2.51	1.21	0.98
Recovery %		100.00	100.00	100.11	100.02	Recovery %		96.00	98.00	99.40	100.73	Recovery %		99.00	97.20	100.38	99.25
Odchylka %		0.00	0.00	0.11	0.02	Odchylka %		-4.00	-2.00	-0.60	0.72	Odchylka %		-1.00	-2.80	0.38	-0.75

Tabulka 98 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření sertralinu, flukonazolu, alprazolamu. MH. – mega high, H – high, L – low

PSYCHO		SERTRALIN				ATM		FLUKONAZOL				BZD		ALPRAZOLAM			
Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14	Standard č.		H. 8	H. 9	H. 15	MH. 14	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14
Koncentrace		1	4	80	400	Koncentrace		60	120	12000	22500	Koncentrace		1	4	80	400
měření	1	0.9	4	81.5	405.9	měření	1	61.5	120.8	12361.4	22223.8	měření	1	1	4.1	80.5	403.8
	2	1.1	4	78.9	396.8		2	62	119.1	11868.9	22205		2	1	4.1	79.2	405.8
	3	1	3.8	78.8	414.9		3	62.9	119.1	12475	22958.7		3	1	3.9	79.7	405.4
	4	1	4	81.5	412.8		4	61.7	120.7	12208	22169.6		4	1	4.3	81.8	399.2
	5	1	3.9	79	393.8		5	58.9	119.3	12062.5	22156		5	1	4.1	79.9	404.1
	6	1.1	4	79.9	411.2		6	57.8	120.7	12257.5	22904.2		6	1	4.1	82	407.4
	7	1	3.9	81	405		7	60.9	121.7	11887.4	22603.3		7	1.1	4	81.8	398.6
	8	1.1	4	80.3	393.3		8	59.4	120.7	12017.6	22128.2		8	1.1	4	81.8	389.6
	9	0.9	4	80.7	405		9	58.5	119.8	11719.2	22378.3		9	1.1	4.1	80.6	403
	10	1.1	3.9	80.3	391.3		10	58.3	120.8	12471.4	21859.3		10	0.9	4.1	81.8	399.1
průměr		1.02	3.95	80.19	403.00	průměr		60.19	120.27	12132.89	22358.64	průměr		1.02	4.08	80.91	401.60
SD		0.08	0.07	1.03	8.66	SD		1.81	0.89	263.39	355.74	SD		0.06	0.10	1.06	5.20
RSD %		7.73	1.79	1.28	2.15	RSD %		3.01	0.74	2.17	1.59	RSD %		6.20	2.53	1.30	1.30
Recovery %		102.00	98.75	100.24	100.75	Recovery %		100.32	100.23	101.11	99.37	Recovery %		102.00	102.00	101.14	100.40
Odchylka %		2.00	-1.25	0.24	0.75	Odchylka %		0.32	0.23	1.11	-0.63	Odchylka %		2.00	2.00	1.14	0.40

Tabulka 99 Výsledky mezilehlé preciznosti i N-desmethyl citalopramu, N-desmethyl klozapinu, olanzapinu., M – medium, L – low

PSYCHO		N-DESMETHYL CITALOPRAM				PSYCHO		N-DESMETHYL KLOZAPIN				PSYCHO		OLANZAPINE			
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 10	M. 9	L. 14	M. 14	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace		10	20	400	1000	Koncentrace		0.4	1	10	80
měření	1	0.4	1	9.8	80.9	měření	1	10	20.5	401.8	1004.9	měření	1	0.4	1	10	79.5
	2	0.4	1	10	78.9		2	9.7	20.9	402.4	1028.6		2	0.3	0.9	10.3	80.2
	3	0.4	1	10.1	79.6		3	9.9	20.5	402.7	1023.7		3	0.4	0.9	10.1	80.8
	4	0.4	1	9.8	80.7		4	9.9	20.9	393.5	1022.7		4	0.4	1	9.5	81.3
	5	0.4	1	10.2	80.8		5	9.4	20.3	411.5	968.2		5	0.3	1	9.6	80.1
	6	0.4	1.1	10.3	81.2		6	10.7	20.3	412.6	1051.2		6	0.4	1.1	9.4	80
	7	0.4	0.9	9.7	80.1		7	10	19.8	393.2	1072.3		7	0.3	0.9	9.7	80.2
	8	0.4	1	10.1	81.8		8	9.5	20.8	408.6	1080.5		8	0.4	1	10.1	78.7
	9	0.4	1	10	79.8		9	10.1	21.9	391.3	1024		9	0.4	1	10	80
	10	0.4	1	10	80.1		10	10.3	19	409.6	983.1		10	0.4	1	10	80.1
průměr		0.40	1.00	10.00	80.39	průměr		9.95	20.49	402.72	1025.92	průměr		0.37	0.98	9.87	80.09
SD		0.00	0.05	0.19	0.85	SD		0.38	0.76	7.91	35.59	SD		0.05	0.06	0.30	0.69
RSD %		0.00	4.71	1.89	1.06	RSD %		3.80	3.71	1.97	3.47	RSD %		13.06	6.45	3.02	0.86
Recovery %		100.00	100.00	100.00	100.49	Recovery %		99.50	102.45	100.68	102.59	Recovery %		92.50	98.00	98.70	100.11
Odchylka %		0.00	0.00	0.00	0.49	Odchylka %		-0.50	2.45	0.68	2.59	Odchylka %		-7.50	-2.00	-1.30	0.11

Tabulka 100 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření citalopramu, klozapinu, perampanelu. M – medium, L – low

PSYCHO		CITALOPRAM				PSYCHO		KLOZAPIN				AEP		PERAMPANEL			
Standard č.		L. 5	L. 7	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 14	M. 14	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 14	M. 14
Koncentrace		0.4	1	10	80	Koncentrace		1	4	400	1000	Koncentrace		0.4	1	400	1000
měření	1	0.4	1	10.1	79.8	měření	1	0.9	4	402.9	1000.5	měření	1	0.4	1.1	408	1013.5
	2	0.3	0.9	10.5	81.2		2	0.9	4	405.1	1001.2		2	0.4	1.1	392	1010.9
	3	0.4	0.9	10.6	80.2		3	1.1	3.9	399	1002.1		3	0.4	0.9	393.2	1008
	4	0.4	1	9.9	80		4	0.9	4	405.4	1004.5		4	0.4	1	405.4	1004.9
	5	0.4	1	9.9	80.2		5	1.1	4	404	1000.8		5	0.5	1	407.8	1003.9
	6	0.4	1.1	9.7	79.9		6	1	4	403.1	1000.8		6	0.5	1.1	399.9	1001.8
	7	0.4	1.1	9.7	81		7	1	4	398.1	1002.5		7	0.4	1	393	1039.2
	8	0.4	1	10.1	79.5		8	1	3.8	396.7	1000.5		8	0.4	1	398.8	1004.7
	9	0.4	1	10.1	80.2		9	1	3.9	404.5	1001.2		9	0.4	1.2	397.7	1039.9
	10	0.4	1	10.1	79.5		10	0.9	4	399	1001.2		10	0.4	1.1	399.2	1001.8
průměr		0.39	1.00	10.07	80.15	průměr		0.98	3.96	401.78	1001.53	průměr		0.42	1.05	399.50	1012.86
SD		0.03	0.07	0.30	0.57	SD		0.08	0.07	3.24	1.23	SD		0.04	0.08	5.95	14.56
RSD %		8.11	6.67	2.96	0.71	RSD %		8.05	1.77	0.81	0.12	RSD %		10.04	8.09	1.49	1.44
Recovery %		97.50	100.00	100.70	100.19	Recovery %		98.00	99.00	100.45	100.15	Recovery %		105.00	105.00	99.88	101.29
Odchylka %		-2.50	0.00	0.70	0.19	Odchylka %		-2.00	-1.00	0.44	0.15	Odchylka %		5.00	5.00	-0.13	1.29

Tabulka 101 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření topiramátu, trazodonu, kvetiapinu. H – high, M – medium, L – low

AEP		TOPIRAMAT				PSYCHO	TRAZODON				PSYCHO	KVETIAPIN					
Standard č.		M. 7	H.6	M. 14	H. 15	Standard č.	M. 5	M. 7	M. 12	M. 14	Standard č.	L.7	L. 8	L. 12	L. 14		
Koncentrace		5	12	1000	12000	Koncentrace	1	5	200	1000	Koncentrace	1	4	80	400		
měření	1	5.2	12.1	994.6	11949.7	měření	1	1.2	5	203.5	1004.3	měření	1	0.9	3.9	79.4	401.6
	2	5.2	12	1015.7	11935.2		2	1.2	5	193.8	1012.6		2	0.9	4.2	80.2	400.7
	3	4.9	11.9	1016.9	12016.4		3	1	5	198.2	999.4		3	1	4.1	80.3	406.7
	4	5.2	11.6	1002.2	12014.3		4	1	4.8	199.8	1002		4	0.9	4	78.8	403.5
	5	5.1	11.7	1001.9	12063.4		5	0.9	4.8	198.8	1016.5		5	0.9	4	80.2	396
	6	5	12	993.2	12077.4		6	0.9	4.9	206.2	1000.5		6	1	4.2	79.1	399.6
	7	5	12.2	1009.6	12014.3		7	1.1	5	200.1	1002.3		7	0.9	4	79.6	397.7
	8	4.9	11.8	1015.7	12016.4		8	1	5	204.2	999.4		8	1	4	79.6	394.3
	9	4.9	11.9	1017.5	11949.7		9	1.1	5	199.3	1004.3		9	0.9	3.9	80.2	400.7
	10	5	12	1001.9	12063.4		10	1.1	5	194.5	1000.5		10	1.1	4	80.2	400.7
průměr		5.04	11.92	1006.92	12010.02	průměr	1.05	4.95	199.84	1004.18	průměr	0.95	4.03	79.76	400.15		
SD		0.13	0.18	9.34	50.81	SD	0.11	0.08	3.97	5.81	SD	0.07	0.11	0.54	3.57		
RSD %		2.51	1.52	0.93	0.42	RSD %	10.29	1.72	1.99	0.58	RSD %	7.44	2.63	0.67	0.89		
Recovery %		100.80	99.33	100.69	100.08	Recovery %	105.00	99.00	99.92	100.42	Recovery %	95.00	100.75	99.70	100.04		
Odchylka %		0.80	-0.67	0.69	0.08	Odchylka %	5.00	-1.00	-0.08	0.42	Odchylka %	-5.00	0.75	-0.30	0.04		

Tabulka 102 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření haloperidolu, risperidonu, ziprasidonu. L – low

PSYCHO		HALOPERIDOL				PSYCHO		RISPERIDON				PSYCHO		ZIPRASIDON			
Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 12	L. 14
Koncentrace		0.1	0.4	10	80	Koncentrace		0.1	0.4	10	80	Koncentrace		0.4	1	80	400
měření	1	0.1	0.3	10.2	81.7	měření	1	0.1	0.4	10.4	80.1	měření	1	0.4	1	80.7	401.9
	2	0.1	0.4	9.4	80.8		2	0.1	0.4	10.7	81.2		2	0.4	1.1	80.2	390.8
	3	0.1	0.4	9.7	78.1		3	0.1	0.4	9.8	82.5		3	0.4	1.1	80.2	404.7
	4	0.1	0.4	9.7	80.2		4	0.1	0.4	10.3	81.3		4	0.4	1	78.2	396.7
	5	0.1	0.4	9.6	80.9		5	0.1	0.4	10.1	80.3		5	0.4	0.9	78.9	413.2
	6	0.1	0.4	9.2	78.9		6	0.1	0.4	10.4	82.2		6	0.4	1	81	389.1
	7	0.1	0.4	9.6	81.4		7	0.1	0.4	10.9	80.1		7	0.4	1	76	418.8
	8	0.1	0.4	9.7	78.7		8	0.1	0.4	10.1	78.5		8	0.4	1	79.9	418.1
	9	0.1	0.4	10.3	80.2		9	0.1	0.4	10.1	79.7		9	0.5	1.2	79.4	403.8
	10	0.1	0.3	10.2	80.2		10	0.1	0.5	10.4	80.7		10	0.5	1.2	80.1	396.6
průměr		0.10	0.38	9.76	80.11	průměr		0.10	0.41	10.32	80.66	průměr		0.42	1.05	79.46	403.37
SD		0.00	0.04	0.36	1.19	SD		0.00	0.03	0.32	1.19	SD		0.04	0.10	1.47	10.58
RSD %		0.00	11.10	3.72	1.49	RSD %		0.00	7.71	3.09	1.48	RSD %		10.04	9.26	1.85	2.62
Recovery %		100.00	95.00	97.60	100.14	Recovery %		100.00	102.50	103.20	100.83	Recovery %		105.00	105.00	99.33	100.84
Odchylka %		0.00	-5.00	-2.40	0.14	Odchylka %		0.00	2.50	3.20	0.83	Odchylka %		5.00	5.00	-0.67	0.84

Tabulka 103 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření 9-hydroxy risperidonu, flupentixolu, flufenazinu. L– low

PSYCHO		9-HYDROXY RISPERIDON				PSYCHO		FLUPENTIXOL				PSYCHO		FLUFENAZIN			
Standard č.		L. 4	L. 5	L. 10	L. 12	Standard č.		L. 5	L. 7	L. 8	L. 10	Standard č.		L. 7	L. 8	L. 10	L. 12
Koncentrace		0.1	0.4	10	80	Koncentrace		0.4	1	4	10	Koncentrace		1	4	10	80
měření	1	0.1	0.4	9.8	80.4	měření	1	0.4	1	4	10.1	měření	1	1	3.9	10.8	80.9
	2	0.1	0.4	10.7	80.1		2	0.4	0.9	4.1	9.9		2	0.9	4.1	10.8	79.6
	3	0.1	0.4	11.5	80.4		3	0.4	1.1	4.1	10		3	1	3.9	10.2	79.4
	4	0.1	0.4	10.4	80.1		4	0.4	1.1	3.9	10.7		4	0.9	3.9	10.2	80.2
	5	0.1	0.4	10.8	81.5		5	0.4	1.1	4.1	10.2		5	1	4	10.5	78.7
	6	0.1	0.4	10.8	80.2		6	0.4	1.1	3.9	9.6		6	0.9	4	9.8	79.5
	7	0.1	0.4	9.9	81.2		7	0.4	1	3.9	10.2		7	0.9	4	9.4	79.8
	8	0.1	0.4	10.5	79.7		8	0.4	1.1	4.1	10.7		8	1	4.1	10.3	80.7
	9	0.1	0.4	9.8	80.9		9	0.4	1.1	4	10.4		9	1.1	4.1	10.2	81.1
	10	0.1	0.5	10.3	79.6		10	0.3	1.2	4.1	10.7		10	0.8	3.9	10.4	80.2
průměr		0.10	0.41	10.45	80.41	průměr		0.39	1.07	4.02	10.25	průměr		0.95	3.99	10.26	80.01
SD		0.00	0.03	0.54	0.62	SD		0.03	0.08	0.09	0.37	SD		0.08	0.09	0.42	0.75
RSD %		0.00	7.71	5.13	0.77	RSD %		8.11	7.69	2.29	3.66	RSD %		8.95	2.19	4.14	0.94
Recovery %		100.00	102.50	104.50	100.51	Recovery %		97.50	107.00	100.50	102.50	Recovery %		95.00	99.75	102.60	100.01
Odchylka %		0.00	2.50	4.50	0.51	Odchylka %		-2.50	7.00	0.50	2.50	Odchylka %		-5.00	-0.25	2.60	0.01

Tabulka 104 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření dehydro aripiprazolu, aripiprazolu, posakonazolu. M – medium, L – low

AEP		DEHYDRO ARIPIRAZOL				AEP		ARIPIRAZOL				AEP		POSAKONAZOL			
Standard č.		L. 7	L. 8	L. 12	L. 14	Standard č.		L. 8	L. 10	L. 12	L. 14	Standard č.		M. 9	M. 10	M. 12	M. 14
Koncentrace		1	4	80	400	Koncentrace		4	10	80	400	Koncentrace		20	50	200	1000
měření	1	1	4	80.8	393	měření	1	3.8	10	80.4	397.5	měření	1	20.6	50.8	193.9	1007.1
	2	0.9	4.4	78.4	406.3		2	4.2	9.7	79.7	403.6		2	20.7	49.4	197.8	979.3
	3	1.1	3.8	79.7	392.1		3	4	10.3	81.7	396.3		3	19.6	51.1	196.8	1020.6
	4	0.8	3.9	79.8	406.5		4	4.1	10.4	81.4	393.8		4	19.6	49.8	199.3	980.9
	5	0.8	3.8	82.6	397.1		5	4.2	10.4	81	412.4		5	19.8	51.2	199	993.3
	6	0.9	4.1	79.2	398.1		6	4.3	10.5	81.9	404.1		6	19.8	51.5	200.5	1026.5
	7	1	4	80.6	403.7		7	4.4	10.1	81	404.5		7	14.4	50	201.1	1007.1
	8	1.2	4	80.6	395.4		8	4.3	10.1	82	397.5		8	20.8	50.3	199.1	1007.1
	9	0.9	3.9	80.8	397.1		9	4.3	10.2	78.3	396.3		9	19.8	50.1	205.4	993.3
	10	1	4	79.7	398.1		10	4	10.2	81.6	397.5		10	20.8	50	204.9	980.9
průměr		0.96	3.99	80.22	398.74	průměr		4.16	10.19	80.90	400.35	průměr		19.59	50.42	199.78	999.61
SD		0.13	0.17	1.14	5.12	SD		0.18	0.23	1.16	5.65	SD		1.89	0.69	3.48	16.75
RSD %		13.18	4.33	1.42	1.29	RSD %		4.42	2.29	1.43	1.41	RSD %		9.66	1.37	1.74	1.68
Recovery %		96.00	99.75	100.28	99.69	Recovery %		104.00	101.90	101.13	100.09	Recovery %		97.95	100.84	99.89	99.96
Odchylka %		-4.00	-0.25	0.28	-0.32	Odchylka %		4.00	1.90	1.13	0.09	Odchylka %		-2.05	0.84	-0.11	-0.04

Tabulka 105 Výsledky mezilehlé preciznosti i měření itrakonazolu, kyseliny valproové, fenobarbitalu. VPA – kyselina valproová MH. – mega high, H – high, M – medium

ATM		ITRAKONAZOL				AEP		KYSELINA VALPROOVÁ				AEP		FENOBARBITAL			
Standard č.		M. 9	M. 10	M. 12	M. 14	Standard č.		VPA 4	VPA 5	VPA 10	VPA 15	Standard č.		H. 8	H. 9	H. 15	MH. 14
Koncentrace		20	50	200	1000	Koncentrace		312.5	625	31250	125000	Koncentrace		60	120	12000	22500
měření	1	21.6	50.7	203.6	1000.8	měření	1	329.4	650.4	31965.5	125741.4	měření	1	59.4	119.3	11906.4	22532.8
	2	21.1	50.2	195.6	1002.4		2	347.5	623.2	31193.8	126833.1		2	61.7	118	12108.3	22436.2
	3	21.7	50.7	198.4	1038.5		3	325	600.7	31812.1	122741.6		3	60.4	121.5	11968.9	22532.8
	4	20.3	51.5	199.2	1047.3		4	346.4	594.1	31543	123143		4	59.4	120	11961.6	22677.1
	5	21.3	51.3	201.5	1034.6		5	320	614.5	32472.4	123630.1		5	59.9	120.1	12028.6	22436.2
	6	20.3	50.4	201.3	1002.4		6	322	602	31193.8	125741.4		6	59.8	119.3	12036.7	22532.8
	7	20.6	50.2	200.6	1000.8		7	314.1	658.4	31543	126833.1		7	59.6	121.2	12036.7	22436.2
	8	20.2	50.7	197.8	1000.8		8	348.8	602	31543	125741.4		8	60.3	119.3	12028.6	22532.8
	9	19.7	50.2	206.2	1034.6		9	322	623.2	31812.1	126833.1		9	59.6	120	12028.6	22532.8
	10	20	50.7	200.9	1002.4		10	320	623.2	31965.5	125741.4		10	59.9	120	12036.7	22532.8
průměr		20.68	50.66	200.51	1016.46	průměr		329.52	619.17	31704.42	125297.96	průměr		60.00	119.87	12014.11	22518.25
SD		0.70	0.45	3.01	19.50	SD		13.05	21.46	387.15	1556.96	SD		0.69	1.00	55.21	72.03
RSD %		3.38	0.89	1.50	1.92	RSD %		3.96	3.47	1.22	1.24	RSD %		1.14	0.83	0.46	0.32
Recovery %		103.40	101.32	100.26	101.65	Recovery %		105.45	99.07	101.45	100.24	Recovery %		100.00	99.89	100.12	100.08
Odchylka %		3.40	1.32	0.25	1.65	Odchylka %		5.45	-0.93	1.45	0.24	Odchylka %		0.00	-0.11	0.12	0.08

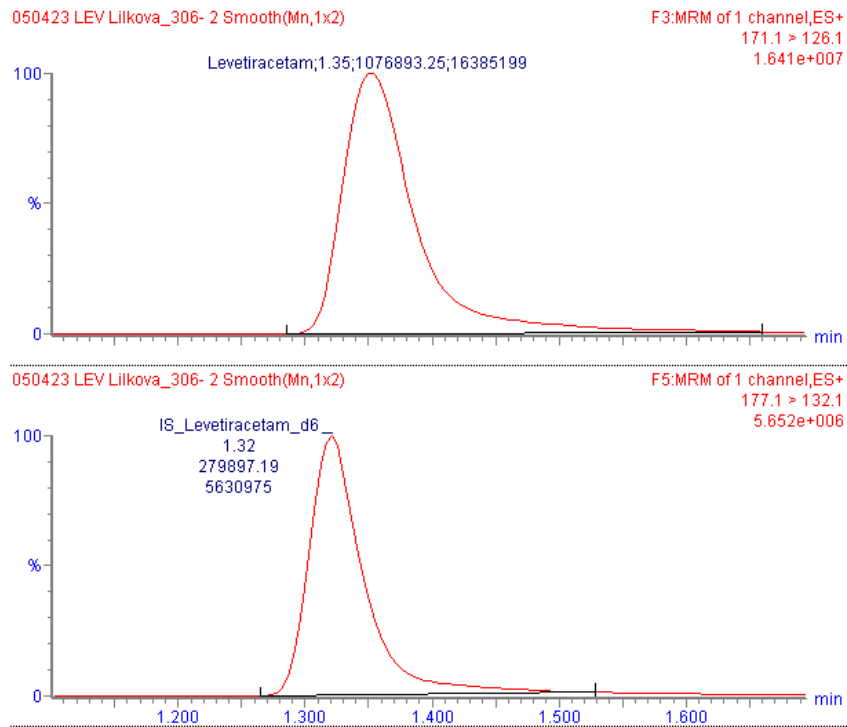
8.4 Analýza komerčních QC kontrol a reálných patientských vzorků

Nově vyvinutá a validovaná metoda pro stanovení 48 látek spadajících do různých lékových skupin pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla použita pro analýzu komerčních QC kontrol a patientských vzorků.

Seznam 10 různých komerčních kontrol a jejich koncentrací je uveden v kapitole 7.5. Každá komerční QC kontrola obsahovala minimálně dvě koncentrační hladiny. Tyto kontroly byly vždy nově připravovány a měřeny před analýzou patientských vzorků pro ověření spolehlivosti a přesnosti analytické metody. Výsledky QC kontrol nejsou uvedeny v diplomové práci.

Pomocí nově vyvinuté metody bylo analyzováno 30 patientských vzorků séra. V těchto reálných patientských vzorcích byly stanovovány hladiny léčiv: antiepileptik, benzodiazepinů, psychofarmak a antimykotik. Chromatogram č. 6 uvádí příklad patientského vzorku pro stanovení hladiny levetiracetamu, měřeného 5.4.2023. Každý pacient se připravuje a stanovuje v dubletu. Výsledná hodnota je průměr těchto dvou měření. V tomto konkrétním případě byl hladina levetiracetamu 24 649,5 ng/mL.

Pro srovnání byla naměřená hodnota LEV u tohoto pacienta kontrolována s již dříve vydaným výsledkem změřeného rutinní LC-MS technikou používanou na oddělení klinické farmakologie FNO. Výsledky obou stanovení byly velmi podobné.



Chromatogram 6 Stanovení levetiracetamu v pacientském vzorku séra

Závěr

Terapeutické monitorování léků, jako jsou antiepileptika, psychofarmaka (antidepresiva, antipsychotika), antiepileptika, antiarytmika, anxiolytika, antimykotika a bronchodilatancia jsou důležitým prvkem v klinické praxi. Správné dávkování těchto léků je klíčové pro dosažení optimálního terapeutického účinku a případné minimalizace nežádoucích účinků či lékových interakcí. Sledování koncentrace léčiv v biologické matrici jako je krev a sérum má význam v případě, pokud je prokázán vztah mezi koncentrací léčiva a jeho klinickým efektem. Vybrána léčiva pro vývoj metody spadají do třídy doporučení do kategorie: důrazně doporučeno (14), doporučeno (20), užitečné (13), potenciálně užitečné (5).

Z klinického pohledu může být nově vyvinutá metoda pro stanovení odlišných vybraných skupin léčiv v jedné analýze „nepraktické“ a to z důvodu toho, že se neočekává společné dávkování některých kombinací těchto látek u reálných vzorků. Nicméně nejsou neobvyklé případy nahlášení pozdějšího do vyšetření stanovení dalších látek u patientských vzorků. Výhodou nově vyvinuté jediné metody je časové zkrácení průchodu vzorku laboratoří od příjmu vzorku po nahlášení výsledku. Kliničtí farmakologové nebo farmaceuti mohou na základě těchto výsledků rychle posoudit účinnost léčby a navrhnout případné úpravy dávkování léků, což je z klinického hlediska velmi významné.

Z analytického hlediska existuje několik důvodů, proč je lepší stanovení více látek v jediné analýze zejména při použití LC-MS/MS. Prvním aspektem je jednotná úprava vzorku, která je nutná před analýzou. Pro různé skupiny léčiv mohou být různé techniky a postupy úpravy vzorku, což by mohlo být časově náročné a komplikované. Pokud jsou tyto látky stanovovány odděleně, znamená to větší spotřebu biologické matrice a potřebu více odběrů (většího množství vzorku) krve od pacienta, což může být nepříjemné a traumatizující. Nároky na menší objem biologické matrice může být zvláště výhodná u dětských pacientů a pacientů s obtížným odběrem krve. Jednotná úprava vzorku pro všechny analyty zkracuje čas analýzy oproti nutnosti vzorek zpracovávat více postupy a minimalizuje množství potřebného vzorku.

Další výhodou jedné analytické metody pro stanovení více látek je ekonomická efektivita. Simultánní analýza snižuje náklady spojené s analýzou vzorků, kalibrací přístroje a validací metody. To může být pro laboratoř ekonomicky výhodné a umožňuje rychlejší zpracování většího počtu vzorků.

Kombinace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií je jednou z nejpoužívanějších metod analýz pro stanovení terapeuticky významných léčiv z biologické matrice. Tato technika vykazuje vysokou selektivitu a citlivost díky kterým umožňuje detekovat velmi nízké koncentrace léčiv v krvi za použití malých objemů vzorků. Rychlost a přesnost s jakou je schopna poskytnout kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Jedná se o univerzální metodu, která je schopna analyzovat velké množství strukturně odlišných typů léčiv a jejich metabolitů.

Všechny analyty uvedené v této práci se v současnosti stanovují ze séra na oddělení klinické farmakologie, ústavu laboratorní medicíny ve fakultní nemocnici v Ostravě. Každá skupina těchto látek má samostatnou metodu stanovení včetně úpravy vzorku a jejich analýzy. V případě většího počtu analytů ve skupině léčiv psychofarmak a antiepileptik, existuje více metod úpravy vzorků a také instrumentálního stanovení. Jedná se zhruba okolo 12 analytických metod. Nově vyvinutá metoda by měla nahradit tyto původně rutinně používané techniky na oddělení. Velkou výhodou oproti původním metodám je jediná úprava vzorků pro všechny látky včetně LC-MS/MS analýzy. Hmotnostní spektrometr, na principu trojitého kvadrupólu, pracoval v režimu MRM, kdy MRM skenovací okna byla nastavena pro každou látku dle očekávaných retenčních časů což vedlo ke zvýšení citlivosti pro stanovované látky.

Práce se zabývala vývojem metody pro stanovení 62 nejrůznějších léčiv z důvodu jejich terapeutického monitorování na oddělení klinické farmakologie, Ústavu laboratorní medicíny, FN Ostrava pomocí LC-MS/MS. Metoda využívá jednoduchou a rychlou úpravu vzorků séra (200 μ L) a pro kvantifikaci používá celkově 29 vnitřních standardů (z toho 24 izotopově značených). Během vývoje byly optimalizovány podmínky kapalinové chromatografie, hmotnostní detekce a postupu úpravy séra. Z celkového počtu 62 analytů se podařilo částečně zvalidovat 48 látek (pregabalin, levetiracetam, gabapentin, theofylin, zonisamid, brivaracetát, karbamazepin, rufinamid, lakosamid, fenytoin, epoxykarbamazepin, stiripentol, eslikarbamazepin, lamotrigin, O-desmethyl venlafaxin, mirtazapin, N-desmethyl diazepam, venlafaxin, diazepam, N-desmethyl klobazam, sulthiam, N-desmethyl olanzapin, vortioxetin, klobazam, sertralin, flukonazol, alprazolam, N-desmethyl citalopram, N-desmethyl klozapin, olanzapin, citalopram, klozapin, perampnel, topiramát, trazodon, haloperidol, kvetiapin, risperidon, ziprasidon, 9-hydroxy risperidon, flufenazin, flupentixol, dehydro aripiprazol, aripiprazol, posakonazol, itrakonazol, kyselina valproová a fenobarbital).

Z důvodu chybějících standardů látek (amidaron, desmethylamidaron), nevyhovující úpravě vzorků séra (acyklovir a jeho metabolit, methotrexát a jeho metabolit, N-desmethyl sertralin) a

nesplňujícím validačním parametrům (bromazepam, vorikonazol, paroxetin, amisluprid, primidon, klonazepam) se nepodařilo tedy z celkového počtu 62 analytů z validovat 13 látek. Možným důvodem by mohla být kontaminace vody a porucha instrumentu, která se objevila v průběhu validace metody. Do budoucna se počítá s dokončením této rozsáhle analytické metody.

Pro kontrolu nově vyvinuté metody byly analyzovány komerční QC kontroly, které sloužily k ověření správnosti nově vyvinuté techniky. Na závěr byly ještě analyzovány patientské vzorky a naměřené hodnoty byly porovnávány s hodnotami, které byly stanoveny pomocí dříve z validovaných metod na oddělení klinické farmakologie.

Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) vytvořila pravidla pro provádění validací v bioanalytických metodách, včetně kritérií týkajících se parametrů specifických pro MS. Nově vyvinutá metoda byla validována na uvedené validační parametry: selektivita, linearita, opakovatelnost a mezilehlá preciznost. Po dokončení validace matricového efektu a splnění kritérií by mohla být nově vyvinutá metoda využívána pro rutinní terapeutické monitorování léčiv.

Seznam literatury

- [1] DREHER, J. *Psychofarmakoterapie: stručně, jasně, přehledně*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0133-7.
- [2] ŠVIHOVEC, J. et al. *Farmakologie*. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- [3] MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4.
- [4] GILMAN, S. E., E. SUCHA, M. KINGSBURY, N. J. HORTON, J. M. MURPHY a I. COLMAN. Depression and mortality in a longitudinal study: 1952–2011. *Canadian Medical Association Journal*. 2017, **189**(42), E1304-E1310. ISSN 0820-3946. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.170125
- [5] Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2010 © [cit. 2021-10-28]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl>
- [6] Schizophrenia. *World Health Organization* [online]. Ženeva: World Health Organization, © 2021 [cit. 2021-10-28]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
- [7] KUBA, R. Antiepileptika a jejich klinické použití v epileptologii. *Praktické lékařství*. 2010, **2010**(2), 62-66.
- [8] WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. <https://en.wikipedia.org/wiki/Theophylline>. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001–2021 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Theophylline>
- [9] KRÁTKÁ, K. *Vývoj metody pro terapeutické monitorování vybraných benzodiazepinů metodou kapalinové chromatografie*. Ostrava, 2021. Bakalářská práce. Ostravská univerzita, Lékařská fakulta, Katedra biomedicínských oborů. Vedoucí práce Mgr. Pavel Šišťík, Ph.D.
- [10] HIEMKE, C., N. BERGEMANN, H. CLEMENT, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*. 2018, **51**(01/02), 9-62. ISSN 0176-3679. Dostupné z: doi:10.1055/s-0043-116492
- [11] SCHABER, G., I. STEVENS, H. J. GAERTNER, K. DIETZ a U. BREYER-PFAFF. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002, **46**(5), 453-459. ISSN 0306-5251. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2125.1998.00822.x
- [12] CHILAKAPATI, J. a H. M. MEHENDALE. Butyrophenones*. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2005, 2005, 372-373. ISBN 9780123694003. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369400-0/00167-8
- [13] SAKURAMA, K., A. KAWAI, V. TUAN GIAM CHUANG, et al. Analysis of the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin: The Importance of a Chloro-Group in the Chemical Structure. *ACS Omega*. 2018, **3**(10), 13790-13797. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.8b02057
- [14] DEVANE, C. L. a C. B. NEMEROFF. Clinical Pharmacokinetics of Quetiapine. *Clinical Pharmacokinetics*. 2001, **40**(7), 509-522. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200140070-00003
- [15] OLANZAPINE tablet. *U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE: Daily Med* [online]. 2020 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=7c894d76-ec69-449d-b32a-544bf38db690>

- [16]MANNENS, G., W. MEULDERMANS, E. SNOECK a J. HEYKANTS. Plasma protein binding of risperidone and its distribution in blood. *Psychopharmacology*. 1994, **114**(4), 566-572. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/BF02244986
- [17]RAMPONO, J., J. H. KRISTENSEN, L. P. HACKETT, M. PAECH, R. KOHAN a K. F. ILETT. Citalopram and demethylcitalopram in human milk; distribution, excretion and effects in breast fed infants. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2000, **50**(3), 263-268. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00253.x
- [18]MOSELEY, B. D., H. CHANTEUX, J. M. NICOLAS, C. LALOYAUX, B. GIDAL a A. STOCKIS. A review of the drug–drug interactions of the antiepileptic drug brivaracetam. *Epilepsy Research*. 2020, **163**. ISSN 09201211. Dostupné z: doi:10.1016/j.eplepsyres.2020.106327
- [19]HUDDART, R., J. K. HICKS, L.B. RAMSEY, J. R. STRAWN, D. M. SMITH, M. BOBONIS BABILONIA, R. B. ALTMAN a T. E. KLEIN. PharmGKB summary: sertraline pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2020, **30**(2), 26-33. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0000000000000392
- [20]BUYSSE, D. J. a S. TYAGI. Clinical Pharmacology of Other Drugs Used as Hypnotics. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Elsevier, 2017, 432-445.e7. ISBN 9780323242882. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-24288-2.00042-8
- [21]U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Effexor® (venlafaxine hydrochloride) Tablets*. Silver Spring. Dostupné také z: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020151s054lbl.pdf
- [22]SANCHEZ, C., K. E. ASIN a F. ARTIGAS. *Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data*. 2015, **145**, 43-57. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.07.001
- [23]PATSALOS, P. N., M. ZUGMAN, C. LAKE, A. JAMES, N. RATNARAJ a J. W. SANDER. Serum protein binding of 25 antiepileptic drugs in a routine clinical setting: A comparison of free non-protein-bound concentrations. *Epilepsia*. 2017, **58**(7), 1234-1243. ISSN 00139580. Dostupné z: doi:10.1111/epi.13802
- [24]LO, J.C.Y. Carbamazepine. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, 665-667. ISBN 9780123864550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00705-3
- [25]RUTHERFOORD ROSE, S. Primidone. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2005, 522-524. ISBN 9780123694003. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369400-0/00793-6
- [26]WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Sultiame. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001–2021 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sultiame>
- [27]BROMFIELD, E. B. DRUG TREATMENT. *Neurology and Clinical Neuroscience*. Elsevier, 2007, 707-718. ISBN 978-0-323-03354-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-03354-1.50057-2
- [28]THEURETZBACHER, U., F. IHLE a H. DERENDORF. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile of Voriconazole. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006, **45**(7), 649-663. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200645070-00002
- [29]GREER, Nickie D. Posaconazole (Noxafil): A New Triazole Antifungal Agent. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2017, **20**(2), 188-196. ISSN 0899-8280. Dostupné z: doi:10.1080/08998280.2007.11928283
- [30]KACÍŘOVÁ, I. a M. GRUNDMANN. Therapeutic drug monitoring. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2020, **34**(2), 47-55. ISSN 12127973. Dostupné z: doi:10.36290/far.2020.011
- [31]PREUSS, C. V. a S. SHARMA. Theophylline. *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2021. 30085566. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519024/>

- [32] BROZMANOVÁ, H. Laboratory methods in therapeutic drug monitoring. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2020, **34**(2), 56-62. ISSN 12127973. Dostupné z: doi:10.36290/far.2020.012
- [33] SADÍLEK, M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 2020, **2020**(114), 133-144.
- [34] NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA a P. ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Praha: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [35] DE HOFFMANN, E. a V. STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Chichester: John Wiley, [2007]. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [36] FRIDECKÝ D., LEMR K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* 3. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2012, 20(41), 152-157. ISSN 1210-7921
- [37] Waters corporation, Application note: Analysis of Antiepileptic Drugs in Plasma for Clinical Research, Waters. chrome-extension://gphandlahdppfmccakmbngmbjnjjiahp/https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2020/720006788/720006788-en.pdf

Seznam literatury – tabulka

- (1) MA, W., X. GAO, H. GUO a W. CHEN. Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment. *Journal of Chromatography B* [online]. 2021, **1171** [cit. 2022-08-02]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2021.122608.122608
- (2) ZHU, R., X. DONG, D. ZHANG, X. LIU, Y. YE a Y. JIANG. Simultaneous Quantification of 38 Psychotropic Drugs and Relevant Metabolites in Blood using LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2021, **45**(4), 397-409 [cit. 2022-08-02]. ISSN 0146-4760. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bkaa085
- (3) CAO, Y., F. ZHAO, J. CHEN, et al. A simple and rapid LC-MS/MS method for the simultaneous determination of eight antipsychotics in human serum, and its application to therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1147** [cit. 2022-08-02]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2020.122129

- (4) DAI, J., L. GAO, F. PENG, L. YU, C. WANG, Y. WANG a C. DING. Simultaneous determination of twelve antiepileptic drugs in serum by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinesse Journal of Chromatography* [online]. 2020, **2020**(vol. 38) [cit. 2022-08-02]. Dostupné z: doi:10.3724/sp.j.1123.2019.12025
- (5) PARK, D., H. CHOI, M. JANG, H. CHANG, S. WOO a W. YANG. Simultaneous determination of 18 psychoactive agents and 6 metabolites in plasma using LC-MS/MS and application to actual plasma samples from conscription candidates. *Forensic Science International* [online]. 2018, **288**, 283-290 [cit. 2022-08-02]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2018.04.024
- (6) KUHN, J., C. GÖTTING a K. KLEESIEK. Simultaneous measurement of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma and serum by stable isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, **51**(1), 210-216 [cit. 2022-08-02]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.08.004
- (7) BANASZKIEWICZ, L., M. K. WOŹNIAK, M. KATA, E. DOMAGALSKA, M. WIERGOWSKI, B. SZPIECH a A. KOT-WASIK. Rapid and simple multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development, validation and application based on three years of toxicological analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, **191** [cit. 2022-08-02]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113569
- (8) DE BOECK, M., S. MISSOTTEN, W. DEHAEN, J. TYTGAT a E. CUYPERS. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with LC-MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. *Forensic Science International* [online]. 2017, **274**, 44-54 [cit. 2022-08-02]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2016.12.026
- (9) JENKINS, N., M. BLACK a H. G. SCHNEIDER. Simultaneous determination of voriconazole, posaconazole, itraconazole and hydroxy-itraconazole in human plasma using LCMS/MS. *Clinical Biochemistry* [online]. 2018, **53**, 110-115 [cit. 2022-08-02]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.01.004
- (10) SAITO, J., A. TANZAWA, Y. KOJO, H. MARUYAMA, T. ISAYAMA, K. SHOJI, Y. ITO a A. YAMATANI. A sensitive method for analyzing fluconazole in extremely small volumes of neonatal serum. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences* [online]. 2020, **6**(1) [cit. 2022-08-02]. ISSN 2055-0294. Dostupné z: doi:10.1186/s40780-020-00170-y
- (11) OGAWA, T., H. HATTORI, M. IWAI, K. ITO, K. IWAKURA, A. ISHII, O. SUZUKI a H. SENO. A rapid and simultaneous analysis of theophylline and its metabolites in human whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem

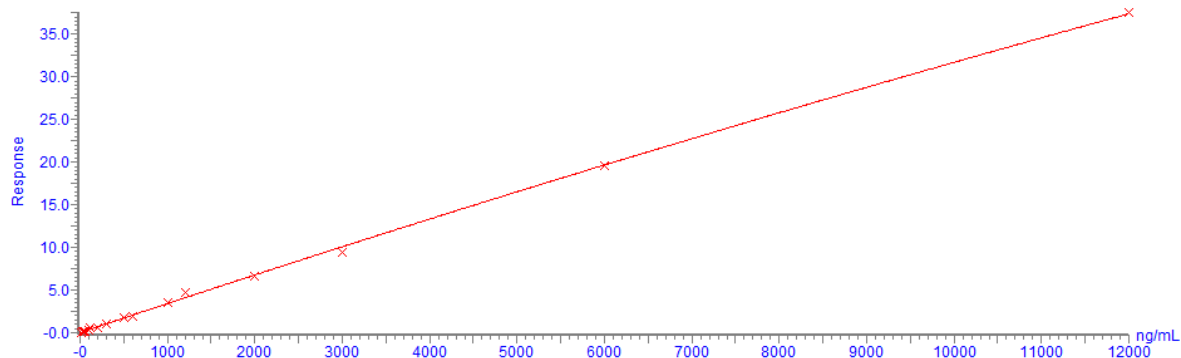
Seznam příloh

Příloha 1 Kalibrační křivka pregabalínu	158
Příloha 2 Kalibrační křivka levetiracetamu	158
Příloha 3 Kalibrační křivka gabapentinu	158
Příloha 4 Kalibrační křivka teofylinu	159
Příloha 5 Kalibrační křivka zonisamidu	159
Příloha 6 Kalibrační křivka brivaracetátu	159
Příloha 7 Kalibrační křivka primidonu.....	160
Příloha 8 Kalibrační křivka karbamazepinu.....	160
Příloha 9 Kalibrační křivka rufinamidu do 2250 ng/mL	160
Příloha 10 Kalibrační křivka rufinamidu od 1125 do 45000 ng/mL	161
Příloha 11 Kalibrační křivka lacosamidu	161
Příloha 12 Kalibrační křivka fenytoinu	161
Příloha 13 Kalibrační křivka epoxykarbamazepinu	162
Příloha 14 Kalibrační křivka stiripentolu	162
Příloha 15 Kalibrační křivka eslikarbamazepinu do 4500 ng/mL.....	162
Příloha 16 Kalibrační křivka eslikarbamazepinu od 1125 do 45000 ng/mL.....	163
Příloha 17 Kalibrační křivka lamotriginu	163
Příloha 18 Kalibrační křivka N-desmethyl venlafaxinu	163
Příloha 19 Kalibrační křivka mirtazapinu	164
Příloha 20 Kalibrační křivka nordiazepamu	164
Příloha 21 Kalibrační křivka venlafaxinu	164
Příloha 22 Kalibrační křivka diazepamu	165
Příloha 23 Kalibrační křivka N-desmethyl klobazamu	165
Příloha 24 Kalibrační křivka sulthiamu.....	165
Příloha 25 Kalibrační křivka N-desmethyl sertralínu	166
Příloha 26 Kalibrační křivka N-desmethyl olanzapinu	166
Příloha 27 Kalibrační křivka vortioxetinu	166
Příloha 28 Kalibrační křivka klobazamu	167
Příloha 29 Kalibrační křivka sertralínu	167
Příloha 30 Kalibrační křivka flukokonazolu.....	167
Příloha 31 Kalibrační křivka alprazolamu.....	168
Příloha 32 Kalibrační křivka N-desmethyl citalopramu	168
Příloha 33 Kalibrační křivka N-desmethyl klozapinu	168
Příloha 34 Kalibrační křivka olanzapinu	169
Příloha 35 Kalibrační křivka klonazepam	169
Příloha 36 Kalibrační křivka lorazepamu	169
Příloha 37 Kalibrační křivka citalopramu	170
Příloha 38 Kalibrační křivka klozapinu	170
Příloha 39 Kalibrační křivka paroxetinu	170
Příloha 40 Kalibrační křivka vorikonazolu.....	171
Příloha 41 Kalibrační křivka perampanel	171
Příloha 42 Kalibrační křivka topiramátu	171
Příloha 43 Kalibrační křivka amisulpridu	172

Příloha 44 Kalibrační křivka trazodonu	172
Příloha 45 Kalibrační křivka haloperidolu	172
Příloha 46 Kalibrační křivka quetiapin	173
Příloha 47 Kalibrační křivka risperidon	173
Příloha 48 Kalibrační křivka ziprasidon	173
Příloha 49 Kalibrační křivka 9-hydroxy risperidon	174
Příloha 50 Kalibrační křivka flupentixolu	174
Příloha 51 Kalibrační křivka flufenazinu.....	174
Příloha 52 Kalibrační křivka dehydro aripiprazolu	175
Příloha 53 Kalibrační křivka aripiprazolu	175
Příloha 54 Kalibrační křivka posakonazolu	175
Příloha 55 Kalibrační křivka itrakonazolu	176
Příloha 56 Kalibrační křivka kyseliny valproové.....	176
Příloha 57 Kalibrační křivka fenobarbitalu.....	176

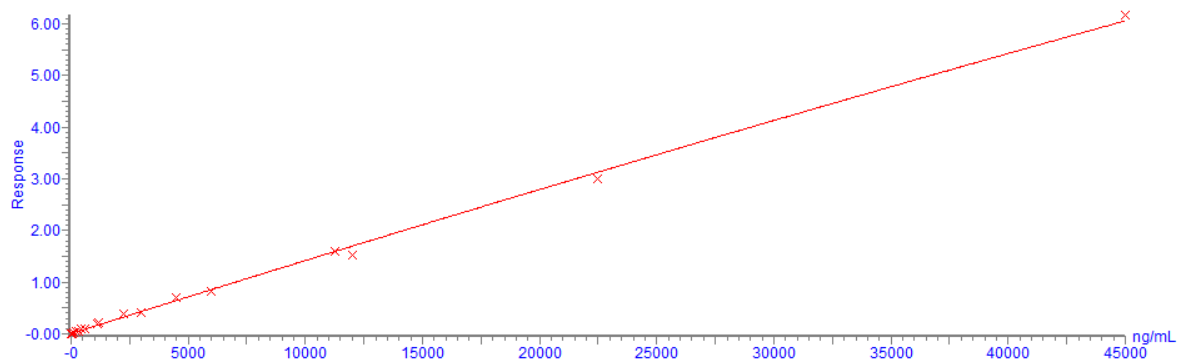
PŘÍLOHY

Compound name: Pregabalin
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.996412$
Calibration curve: $-2.67493e-008 * x^2 + 0.00343537 * x + 0.0113443$
Response type: Internal Std (Ref 61), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



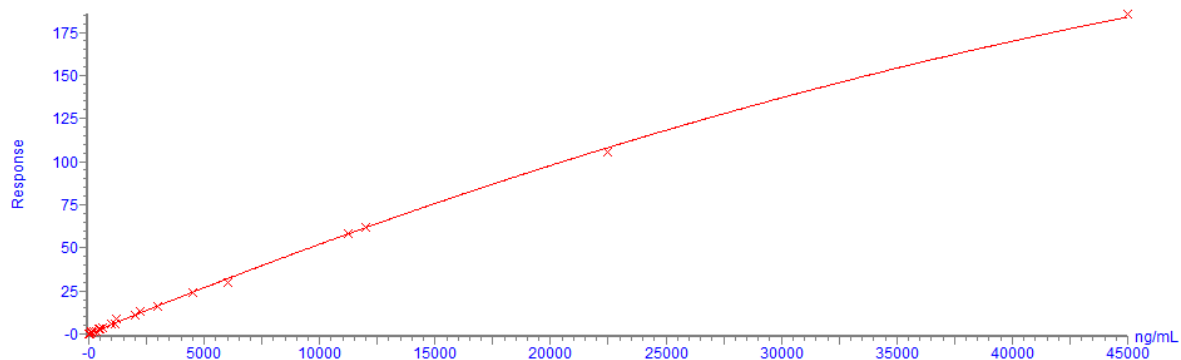
Příloha 1 Kalibrační křivka pregabalinu

Compound name: Levetiracetam
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.993794$
Calibration curve: $-1.9843e-010 * x^2 + 0.00014341 * x + 0.00435957$
Response type: Internal Std (Ref 62), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



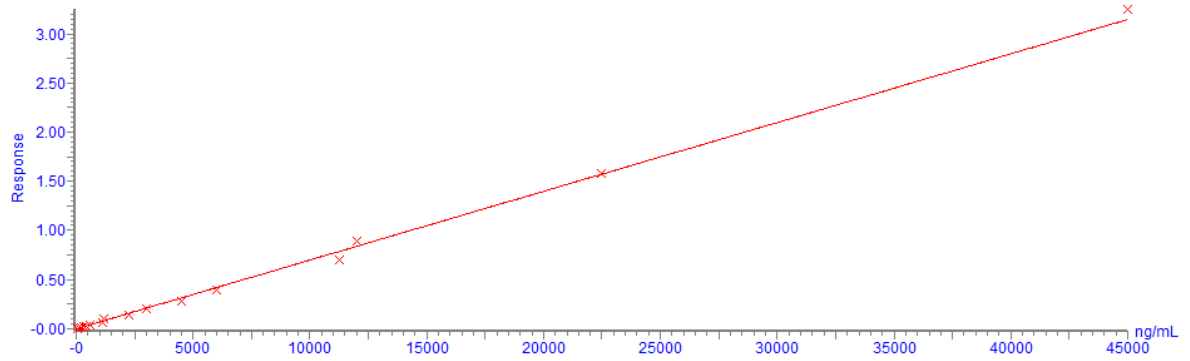
Příloha 2 Kalibrační křivka levetiracetamu

Compound name: Gabapentin
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.996450$
Calibration curve: $-3.20494e-008 * x^2 + 0.00552616 * x + 0.0355604$
Response type: Internal Std (Ref 61), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



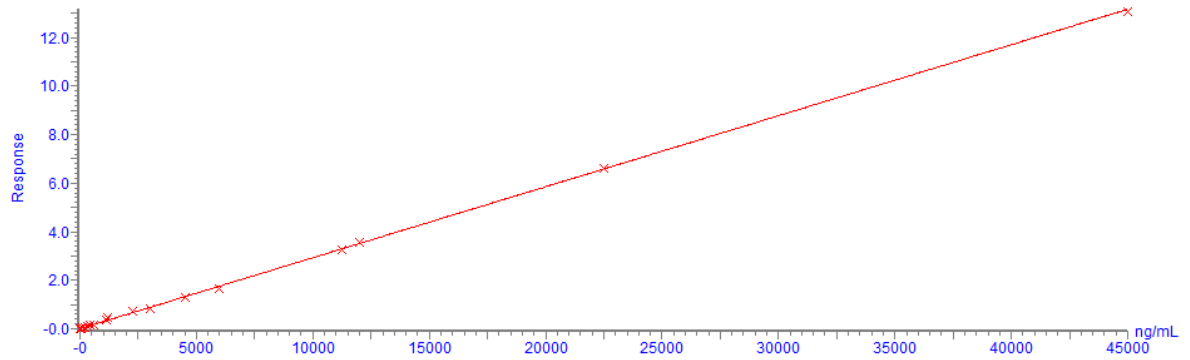
Příloha 3 Kalibrační křivka gabapentinu

Compound name: Theophylline
Correlation coefficient: $r = 0.998035$, $r^2 = 0.996073$
Calibration curve: $6.99753e-005 * x + -0.00229283$
Response type: Internal Std (Ref 64), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



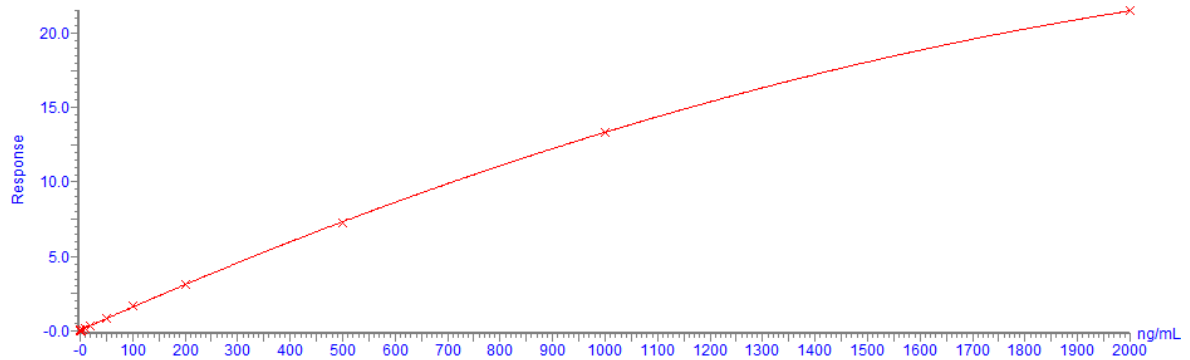
Příloha 4 Kalibrační křivka teofylinu

Compound name: Zonisamide
Correlation coefficient: $r = 0.998894$, $r^2 = 0.997788$
Calibration curve: $0.000292552 * x + 0.0036055$
Response type: Internal Std (Ref 63), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



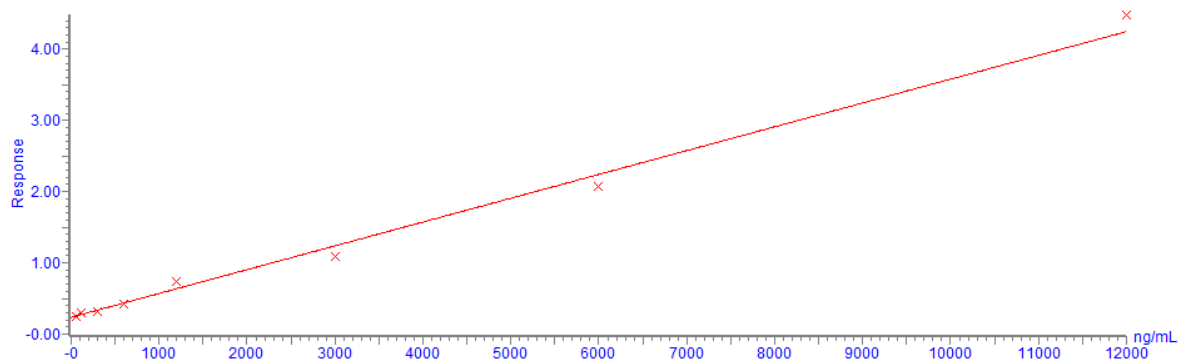
Příloha 5 Kalibrační křivka zonisamidu

Compound name: Brivaracetate
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.982057$
Calibration curve: $-2.57134e-006 * x^2 + 0.0158702 * x + 0.044565$
Response type: Internal Std (Ref 91), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



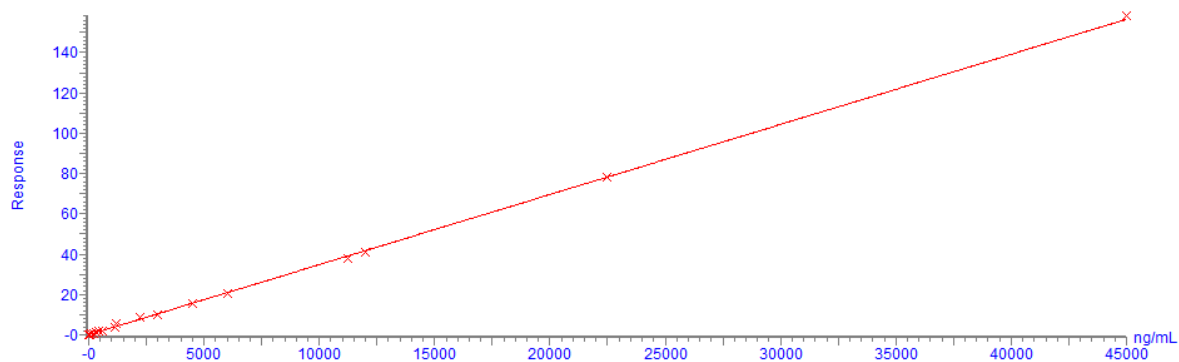
Příloha 6 Kalibrační křivka brivaracetátu

Compound name: Primidone
Correlation coefficient: $r = 0.993863$, $r^2 = 0.987763$
Calibration curve: $0.000334263 * x + 0.236319$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



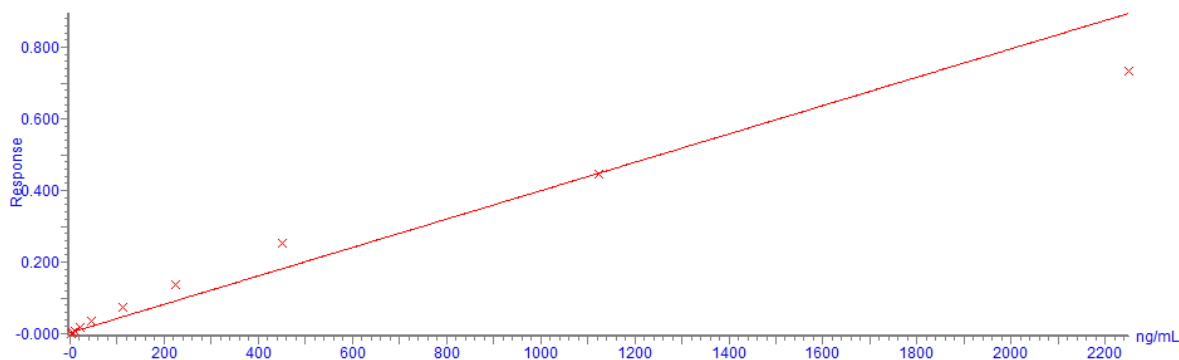
Příloha 7 Kalibrační křivka primidonu

Compound name: Carbamazepine
Correlation coefficient: $r = 0.998710$, $r^2 = 0.997422$
Calibration curve: $0.00347756 * x + 0.0358827$
Response type: Internal Std (Ref 66), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



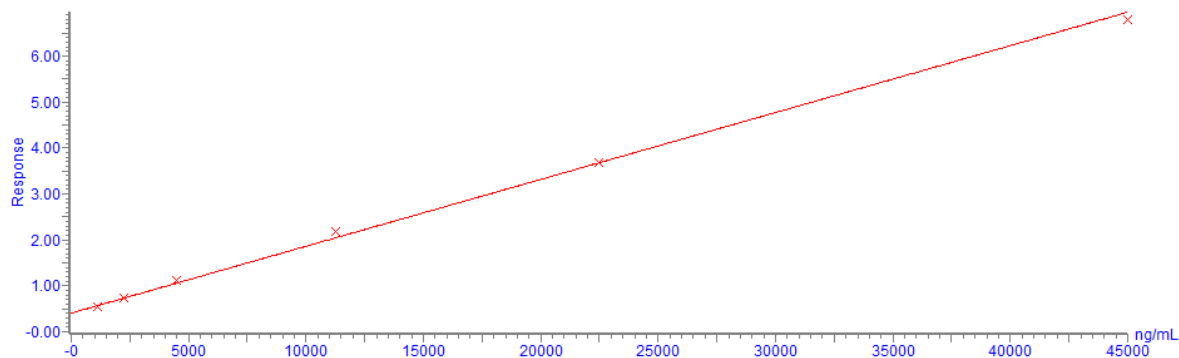
Příloha 8 Kalibrační křivka karbamazepinu

Compound name: Rufinamide
Correlation coefficient: $r = 0.965973$, $r^2 = 0.933105$
Calibration curve: $0.000396499 * x + 0.00289312$
Response type: Internal Std (Ref 68), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



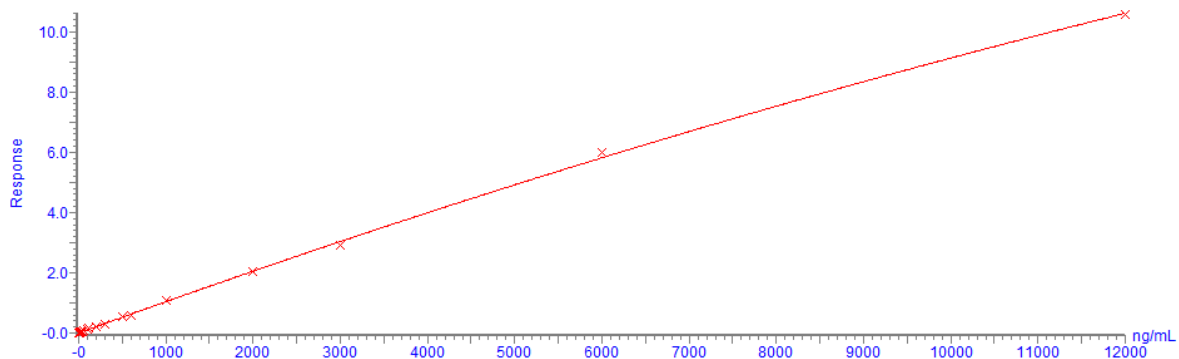
Příloha 9 Kalibrační křivka rufinamidu do 2250 ng/mL

Compound name: Rufinamide
Correlation coefficient: $r = 0.998762$, $r^2 = 0.997526$
Calibration curve: $0.000145427 * x + 0.405706$
Response type: Internal Std (Ref 68), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



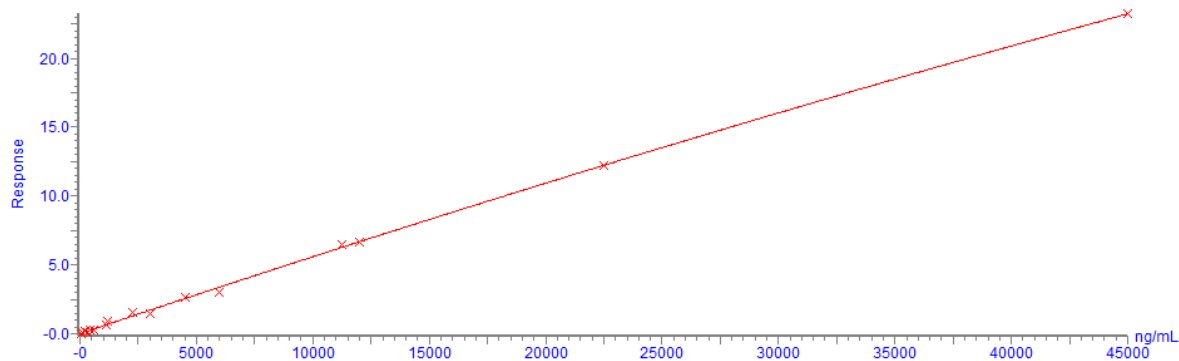
Příloha 10 Kalibrační křivka rufinamidu od 1125 do 45000 ng/mL

Compound name: Lacosamide
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.998520$
Calibration curve: $-1.41848e-008 * x^2 + 0.00105463 * x + 0.000562074$
Response type: Internal Std (Ref 68), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



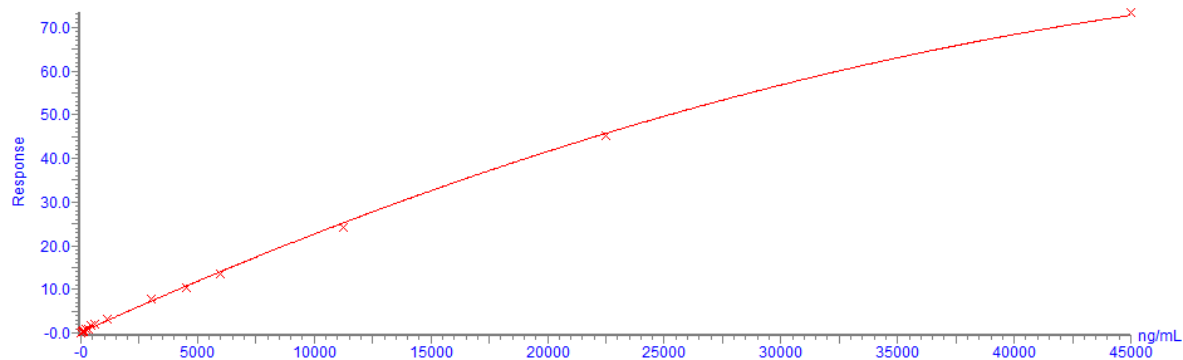
Příloha 11 Kalibrační křivka lacosamidu

Compound name: Phenytoin
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.996024$
Calibration curve: $-1.20523e-009 * x^2 + 0.000570384 * x + 0.00958115$
Response type: Internal Std (Ref 70), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



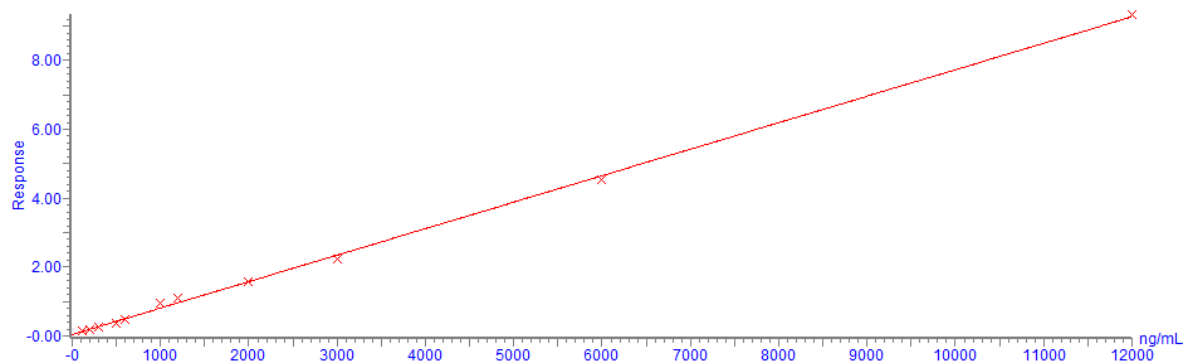
Příloha 12 Kalibrační křivka fenytoinu

Compound name: Epoxy-carbamazepine
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.995627$
 Calibration curve: $-1.83232e-008 * x^2 + 0.00243939 * x + 0.114389$
 Response type: Internal Std (Ref 85), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



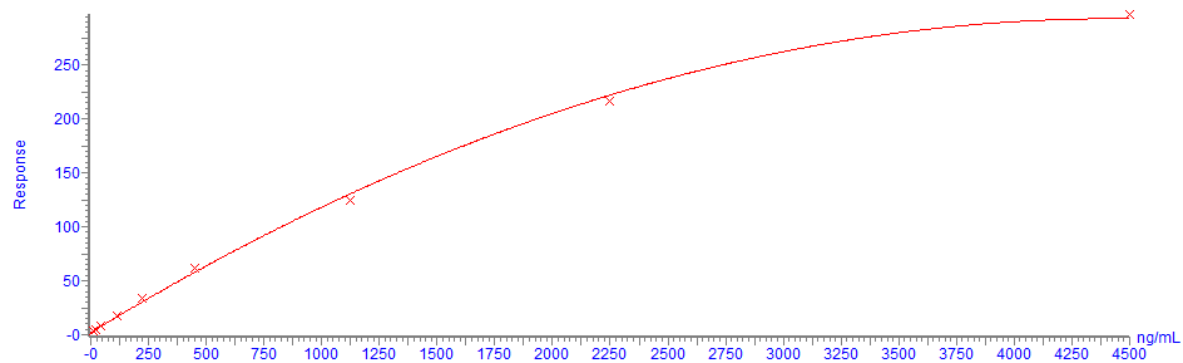
Příloha 13 Kalibrační křivka epoxykarbamazepinu

Compound name: Stiripentol
 Correlation coefficient: $r = 0.998099$, $r^2 = 0.996201$
 Calibration curve: $0.000769209 * x + 0.0391067$
 Response type: Internal Std (Ref 65), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



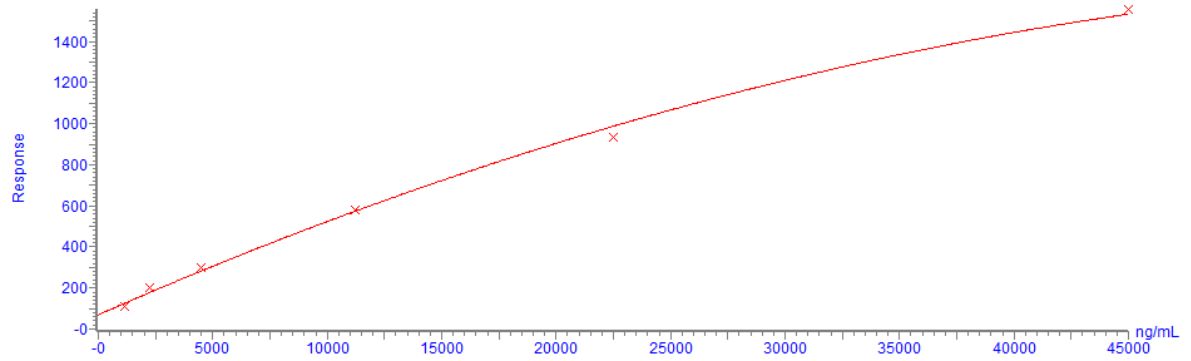
Příloha 14 Kalibrační křivka stiripentolu

Compound name: Eslicarbamazepine
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.997364$
 Calibration curve: $-1.47626e-005 * x^2 + 0.131103 * x + 1.90838$
 Response type: Internal Std (Ref 85), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



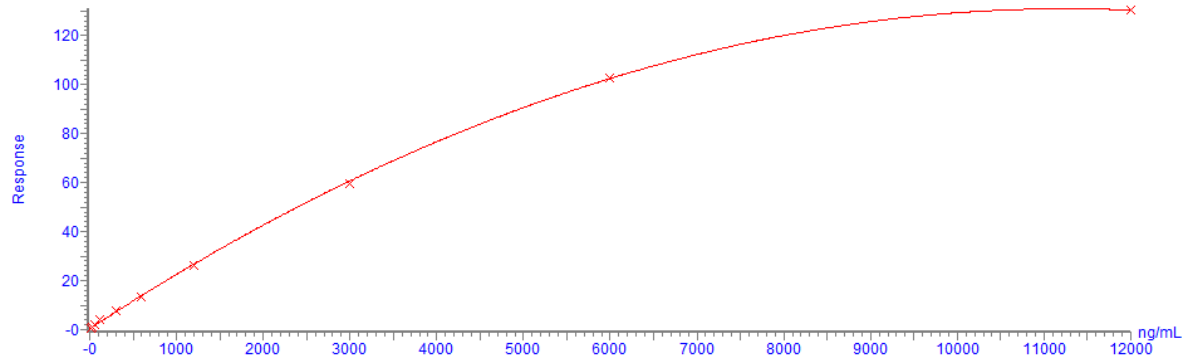
Příloha 15 Kalibrační křivka eslikarbamazepinu do 4500 ng/mL

Compound name: Eslicarbamazepine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.992795$
Calibration curve: $-3.68081e-007 * x^2 + 0.0490975 * x + 69.2982$
Response type: Internal Std (Ref 85), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



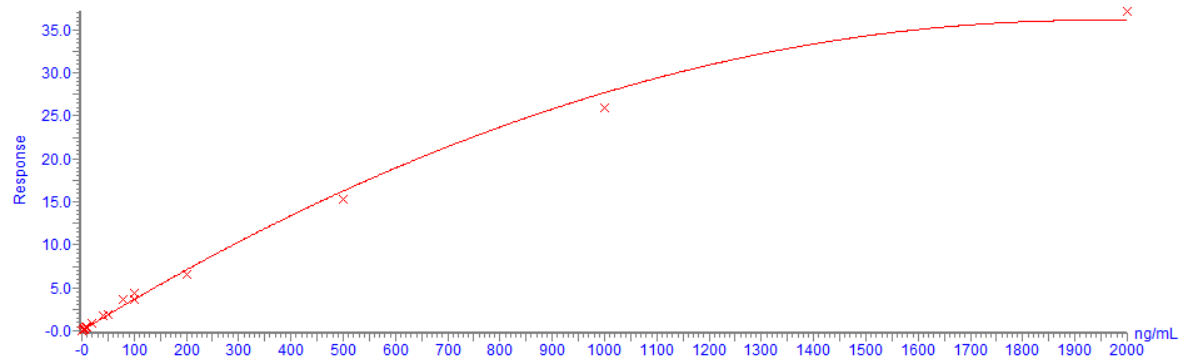
Příloha 16 Kalibrační křivka eslikarbamazepinu od 1125 do 45000 ng/mL

Compound name: Lamotrigine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.997093$
Calibration curve: $-1.03043e-006 * x^2 + 0.0231986 * x + 0.395631$
Response type: Internal Std (Ref 69), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



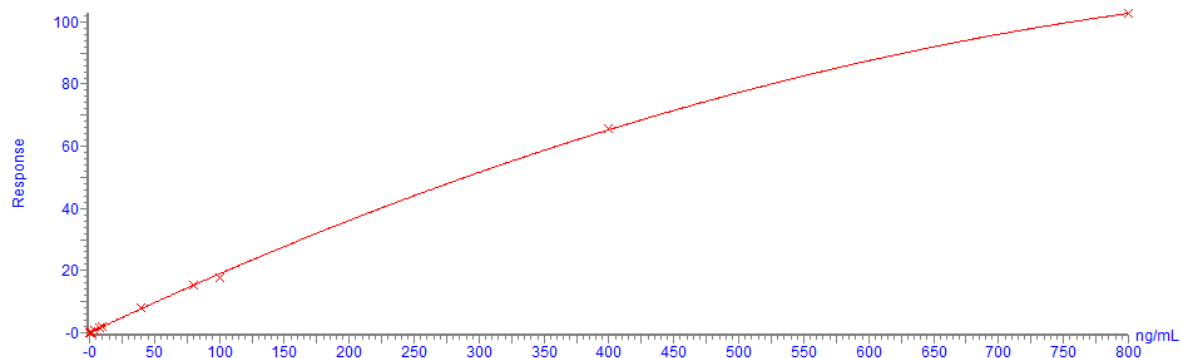
Příloha 17 Kalibrační křivka lamotriginu

Compound name: d_venlafaxine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.991475$
Calibration curve: $-9.65439e-006 * x^2 + 0.0373448 * x + 0.00320031$
Response type: Internal Std (Ref 71), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



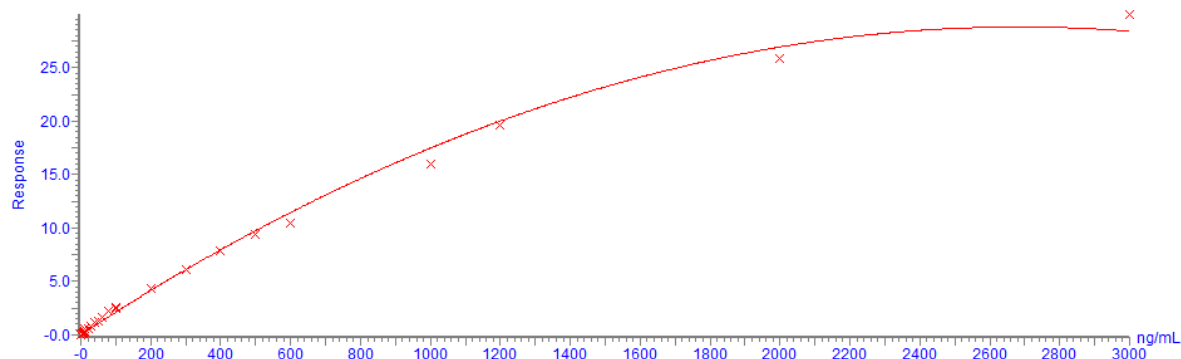
Příloha 18 Kalibrační křivka N-desmethyl venlafaxinu

Compound name: Mirtazapine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999156$
Calibration curve: $-8.72428e-005 * x^2 + 0.198246 * x + 0.00448403$
Response type: Internal Std (Ref 83), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



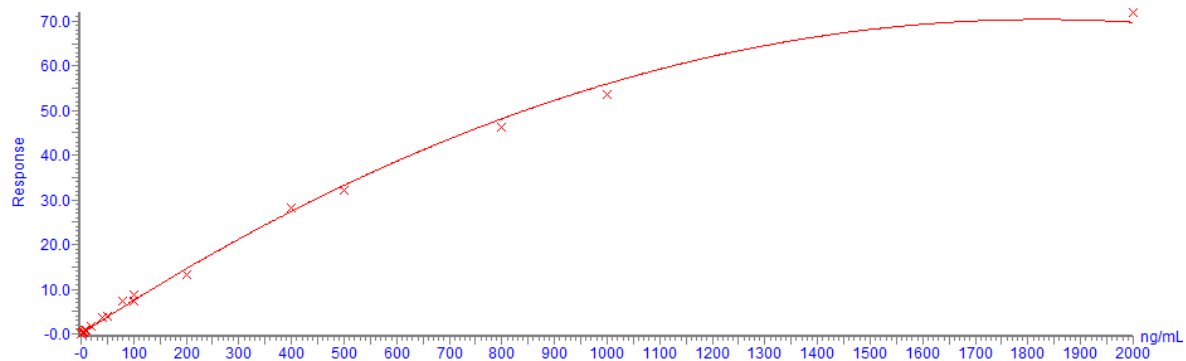
Příloha 19 Kalibrační křivka mirtazapinu

Compound name: Nor_diazepam
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.988425$
Calibration curve: $-3.99302e-006 * x^2 + 0.0214391 * x + 0.0325489$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



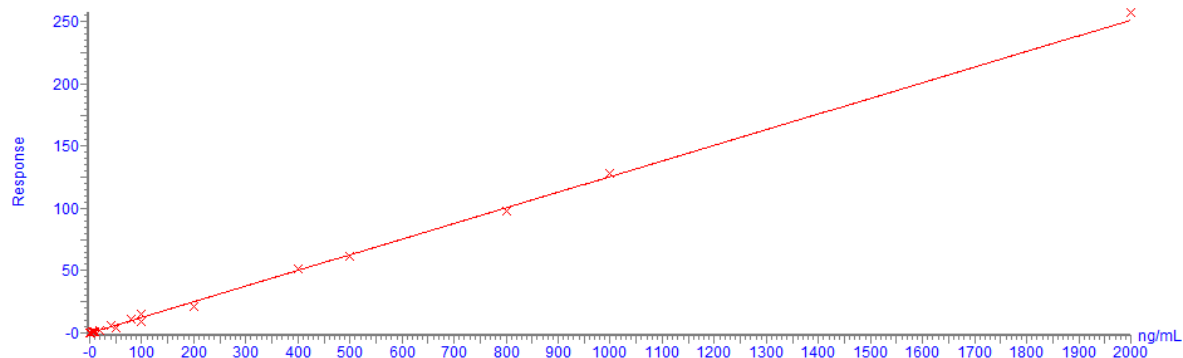
Příloha 20 Kalibrační křivka nordiazepamu

Compound name: Venlafaxine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.994584$
Calibration curve: $-2.11048e-005 * x^2 + 0.0770925 * x + 0.00348583$
Response type: Internal Std (Ref 71), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



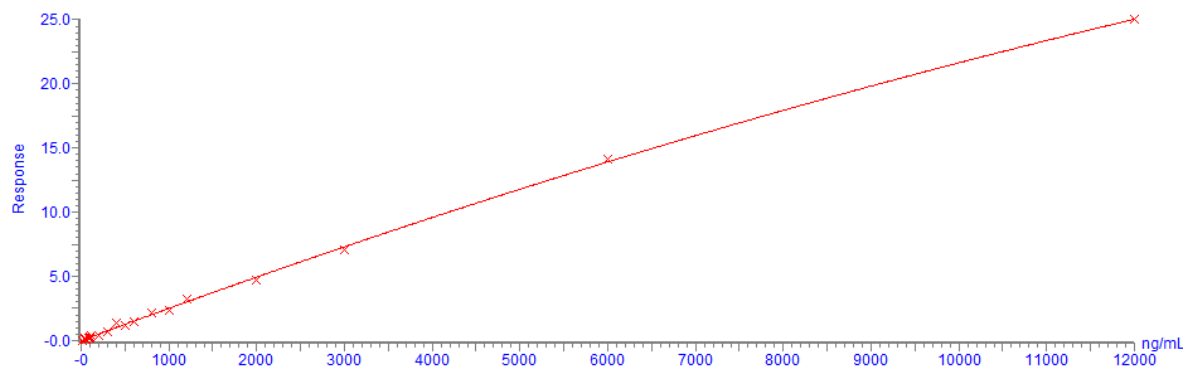
Příloha 21 Kalibrační křivka venlafaxinu

Compound name: Diazepam
Correlation coefficient: $r = 0.997799$, $r^2 = 0.995603$
Calibration curve: $0.125595 * x + -0.053776$
Response type: Internal Std (Ref 81), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



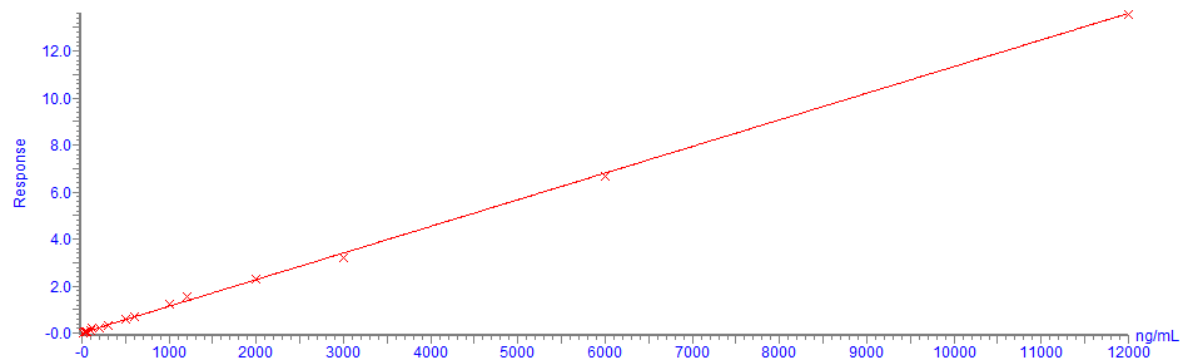
Příloha 22 Kalibrační křivka diazepamu

Compound name: N-desmethyloclobazam
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.993981$
Calibration curve: $-3.89615e-008 * x^2 + 0.00255524 * x + -0.00980355$
Response type: Internal Std (Ref 79), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



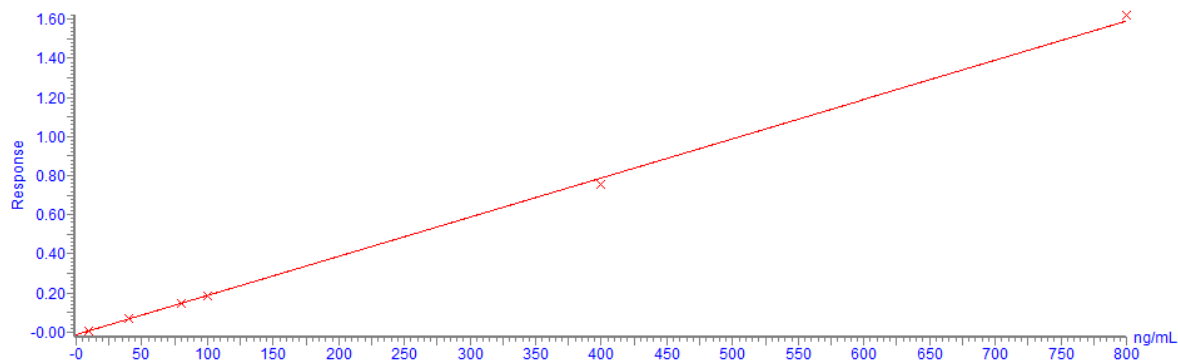
Příloha 23 Kalibrační křivka N-desmethyl klobazamu

Compound name: Sulthiame
Correlation coefficient: $r = 0.998207$, $r^2 = 0.996417$
Calibration curve: $0.00113356 * x + 0.00723093$
Response type: Internal Std (Ref 72), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



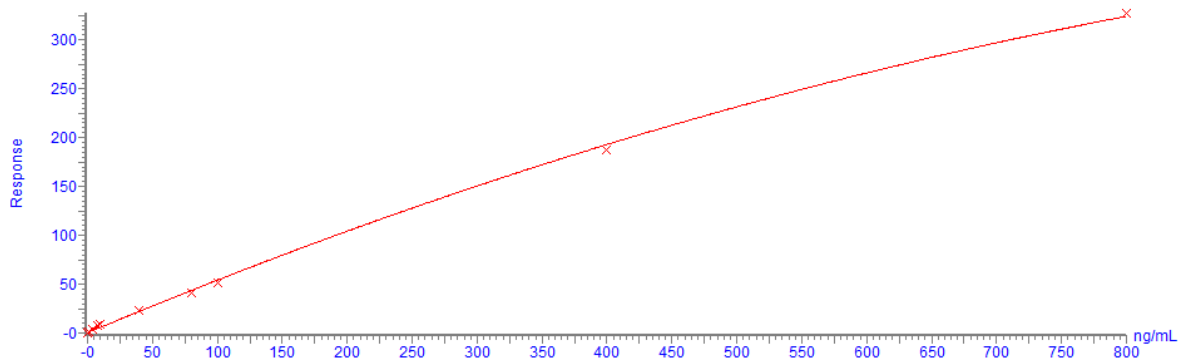
Příloha 24 Kalibrační křivka sulthiamu

Compound name: N-desmethyl sertraline
Correlation coefficient: $r = 0.999603$, $r^2 = 0.999206$
Calibration curve: $0.00200642 * x + -0.0141076$
Response type: Internal Std (Ref 74), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



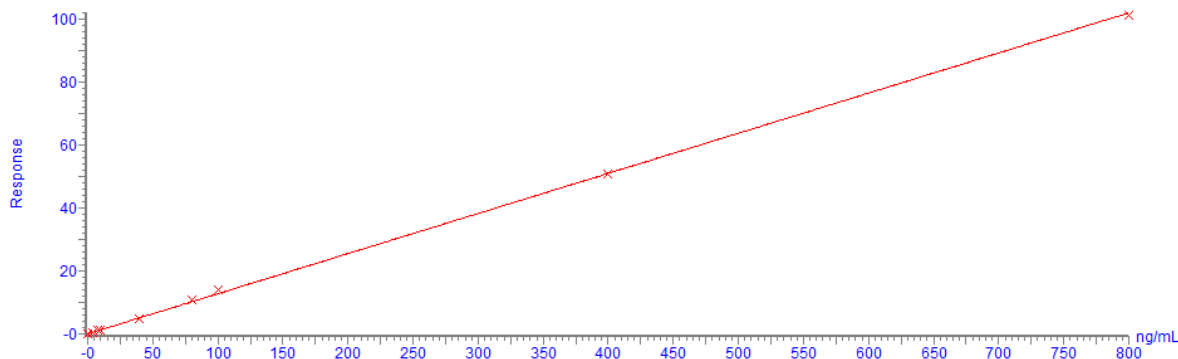
Příloha 25 Kalibrační křivka N-desmethyl sertralínu

Compound name: N-desmethyl olanzapine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.989855$
Calibration curve: $-0.000192279 * x^2 + 0.558731 * x + 0.195426$
Response type: Internal Std (Ref 78), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



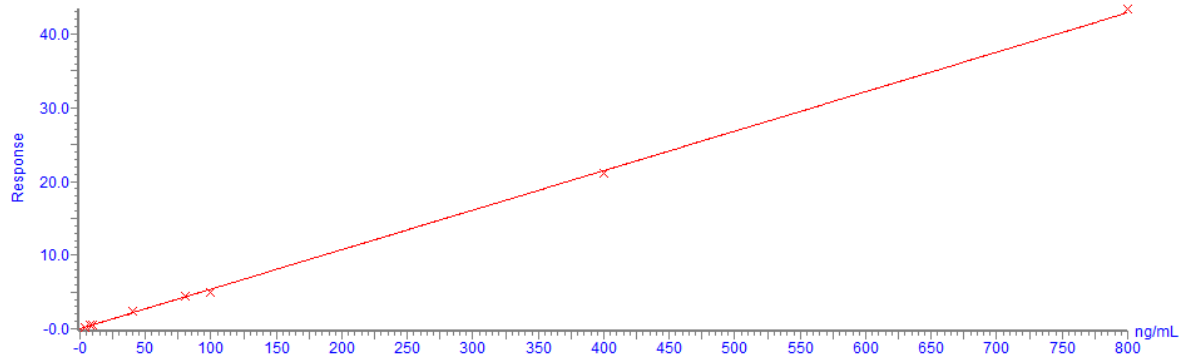
Příloha 26 Kalibrační křivka N-desmethyl olanzapinu

Compound name: Vortioxetine
Correlation coefficient: $r = 0.999540$, $r^2 = 0.999080$
Calibration curve: $0.127681 * x + 0.0238112$
Response type: Internal Std (Ref 73), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



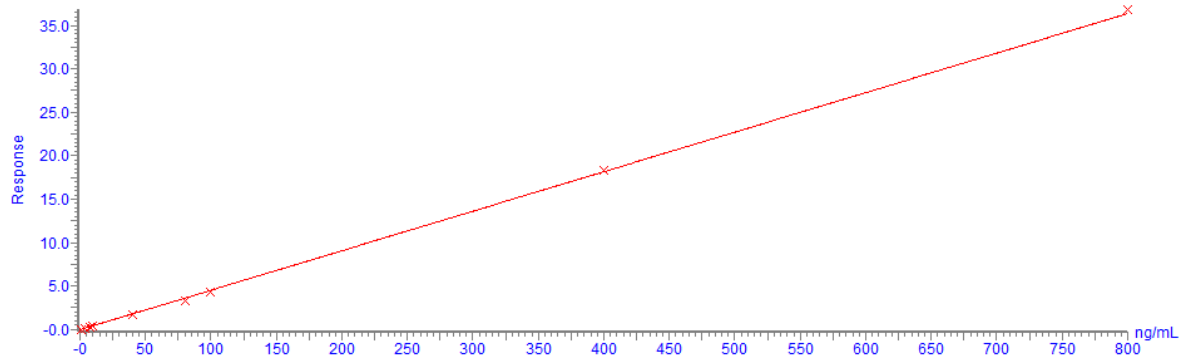
Příloha 27 Kalibrační křivka vortioxetinu

Compound name: Clobazam
Correlation coefficient: $r = 0.999515$, $r^2 = 0.999031$
Calibration curve: $0.0536065 * x + 0.0264336$
Response type: Internal Std (Ref 79), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



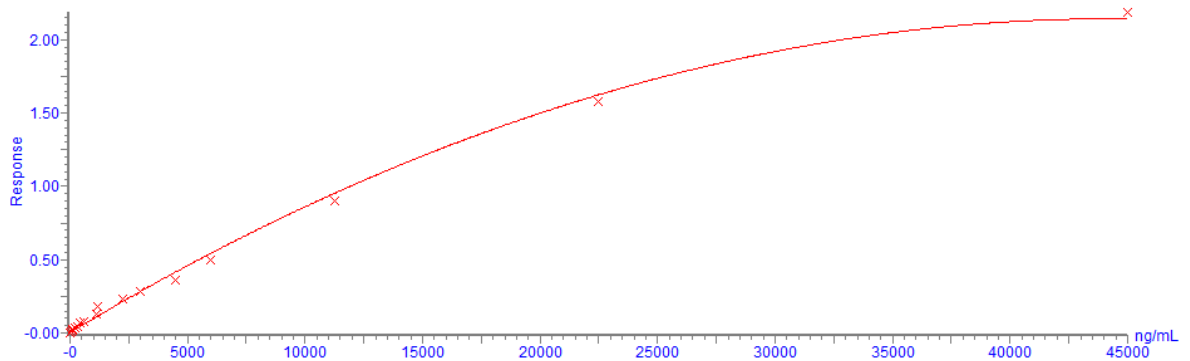
Příloha 28 Kalibrační křivka klobazamu

Compound name: Sertraline
Correlation coefficient: $r = 0.999612$, $r^2 = 0.999224$
Calibration curve: $0.045502 * x + -0.0348205$
Response type: Internal Std (Ref 74), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



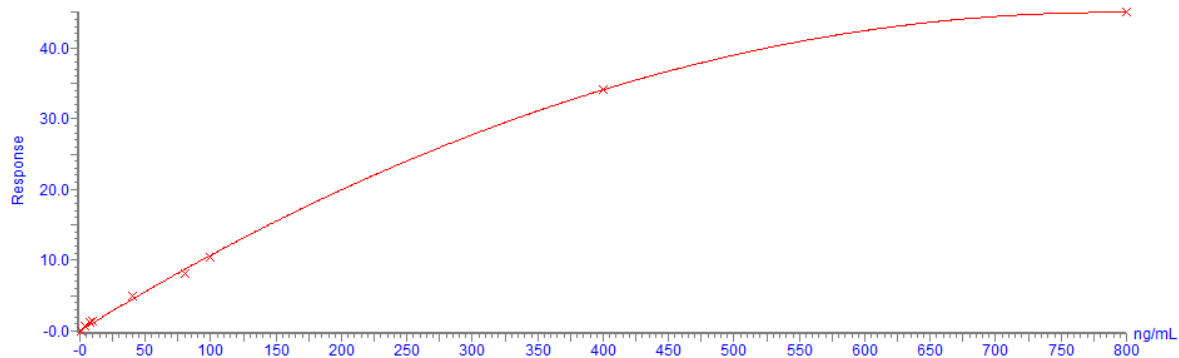
Příloha 29 Kalibrační křivka sertralínu

Compound name: Fluconazole
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.982676$
Calibration curve: $-1.08992e-009 * x^2 + 9.65656e-005 * x + 0.00391729$
Response type: Internal Std (Ref 68), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



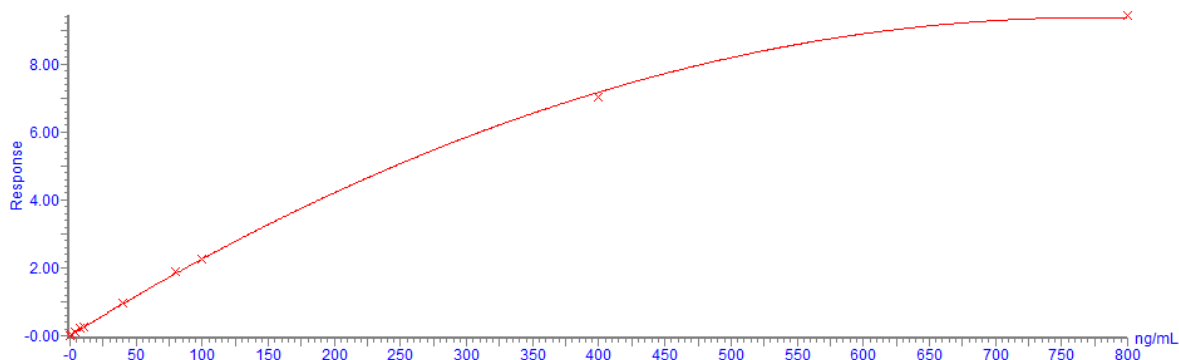
Příloha 30 Kalibrační křivka flukokonazolu

Compound name: Alprazolam
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.995990$
Calibration curve: $-7.22772e-005 * x^2 + 0.11399 * x + 0.0500035$
Response type: Internal Std (Ref 75), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



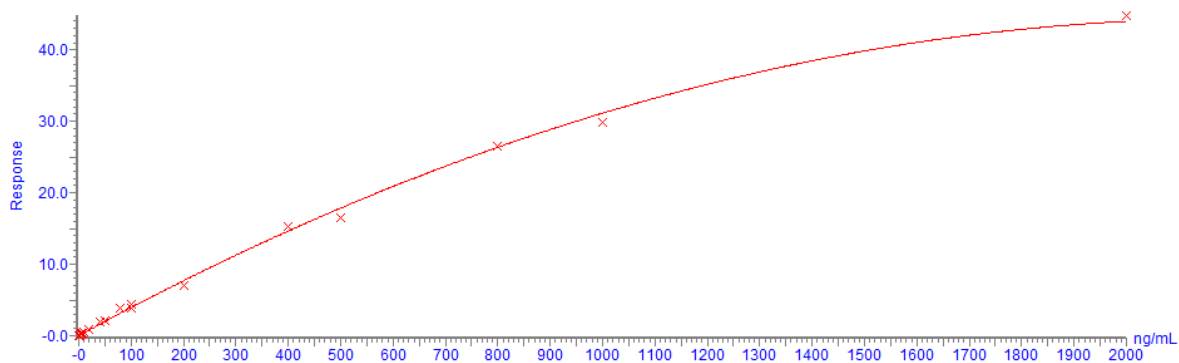
Příloha 31 Kalibrační křivka alprazolamu

Compound name: N-desmethyl citalopram
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999534$
Calibration curve: $-1.55861e-005 * x^2 + 0.024172 * x + 0.00148915$
Response type: Internal Std (Ref 82), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



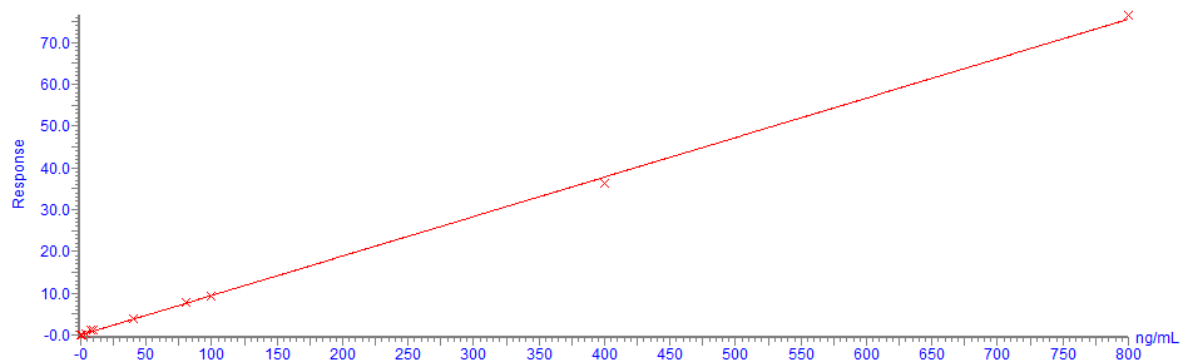
Příloha 32 Kalibrační křivka N-desmethyl citalopramu

Compound name: N-desmethyl clozapine
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.995146$
Calibration curve: $-9.14247e-006 * x^2 + 0.0402708 * x + 0.0116409$
Response type: Internal Std (Ref 83), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



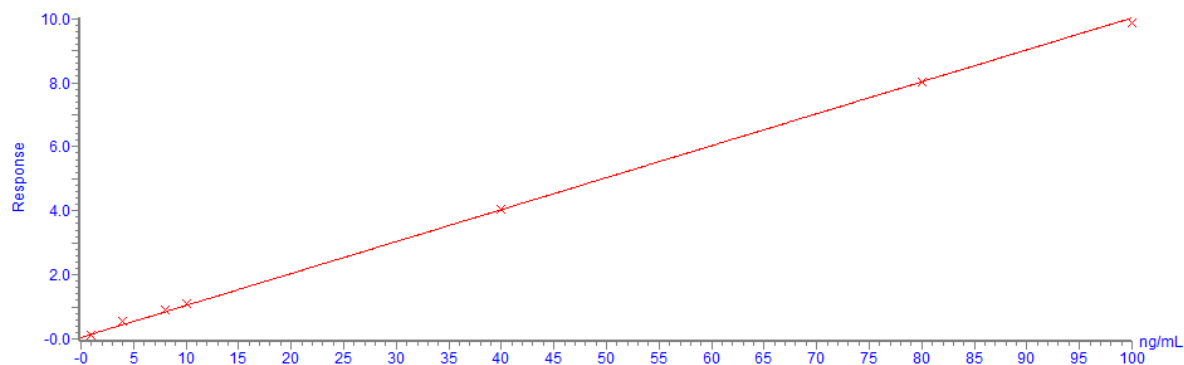
Příloha 33 Kalibrační křivka N-desmethyl klozapinu

Compound name: Olanzapine
Correlation coefficient: $r = 0.999175$, $r^2 = 0.998351$
Calibration curve: $0.0944583 * x + 0.0106167$
Response type: Internal Std (Ref 78), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



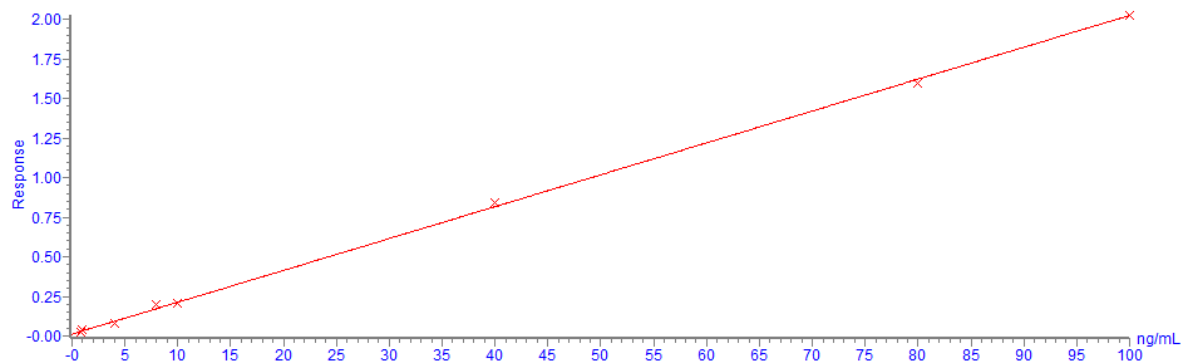
Příloha 34 Kalibrační křivka olanzapinu

Compound name: Clonazepam
Correlation coefficient: $r = 0.998952$, $r^2 = 0.997904$
Calibration curve: $0.0997876 * x + 0.0467651$
Response type: Internal Std (Ref 76), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



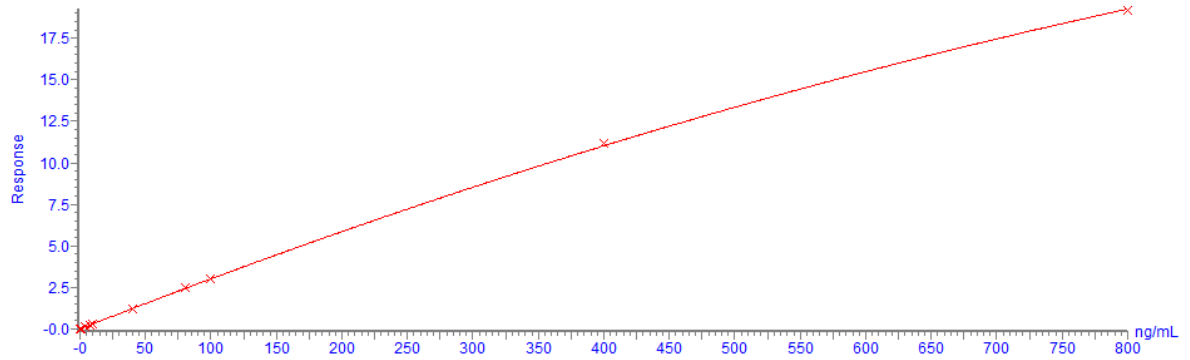
Příloha 35 Kalibrační křivka klonazepam

Compound name: Lorazepam
Correlation coefficient: $r = 0.998916$, $r^2 = 0.997833$
Calibration curve: $0.0201401 * x + 0.0116089$
Response type: Internal Std (Ref 80), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



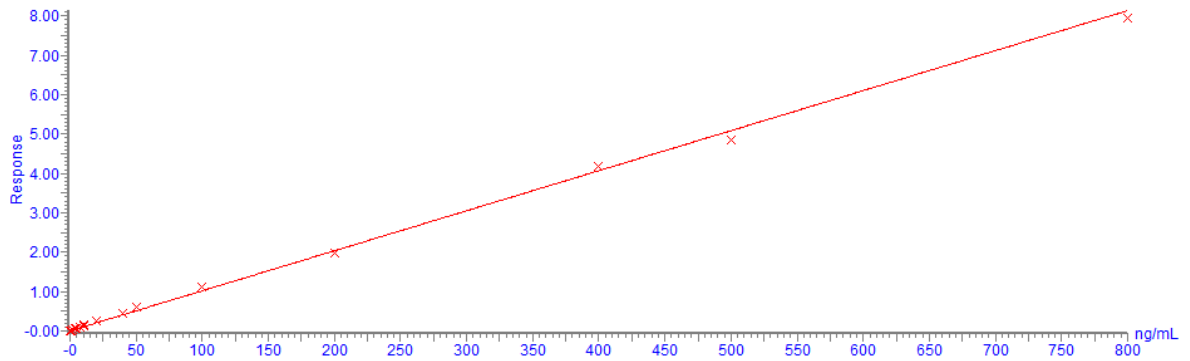
Příloha 36 Kalibrační křivka lorazepamu

Compound name: Citalopram
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999268$
Calibration curve: $-8.73248e-006 * x^2 + 0.0310447 * x + 0.00223163$
Response type: Internal Std (Ref 82), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



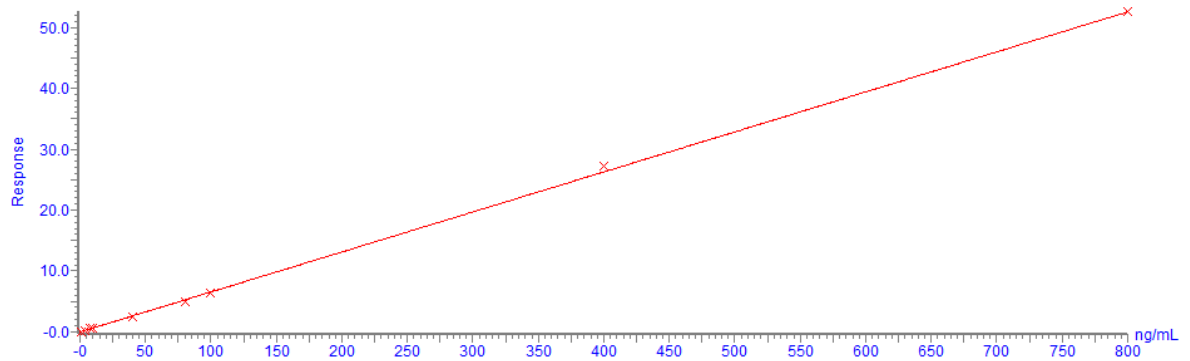
Příloha 37 Kalibrační křivka citalopramu

Compound name: Clozapine
Correlation coefficient: $r = 0.997631$, $r^2 = 0.995268$
Calibration curve: $0.0101686 * x + 0.00440329$
Response type: Internal Std (Ref 83), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



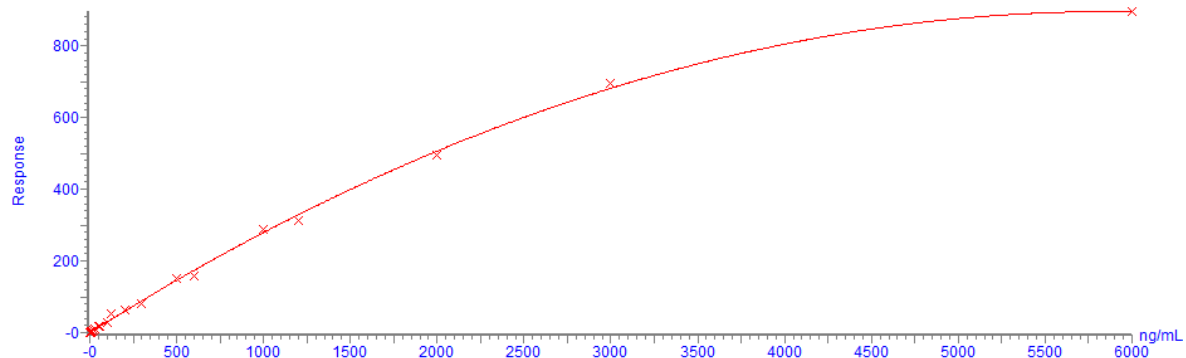
Příloha 38 Kalibrační křivka klozapinu

Compound name: Paroxetine
Correlation coefficient: $r = 0.999489$, $r^2 = 0.998979$
Calibration curve: $0.065752 * x + -0.0308118$
Response type: Internal Std (Ref 84), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



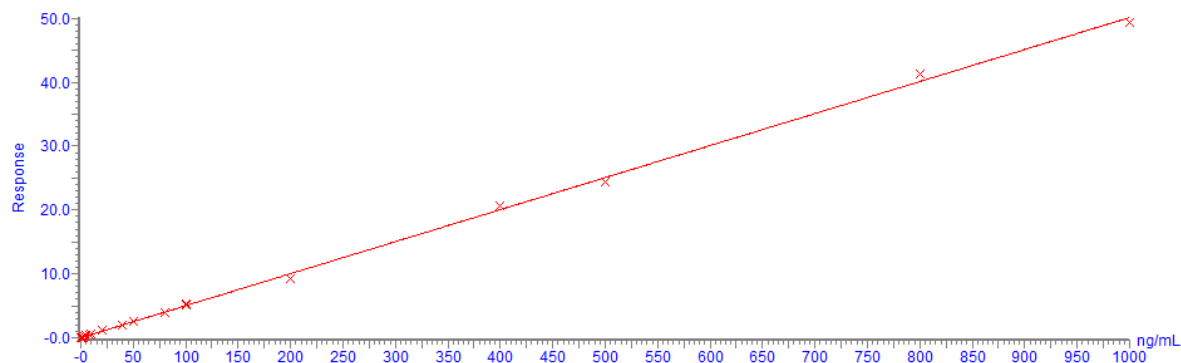
Příloha 39 Kalibrační křivka paroxetinu

Compound name: Voriconazole
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.994572$
Calibration curve: $-2.60183e-005 * x^2 + 0.305277 * x + 0.0497743$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



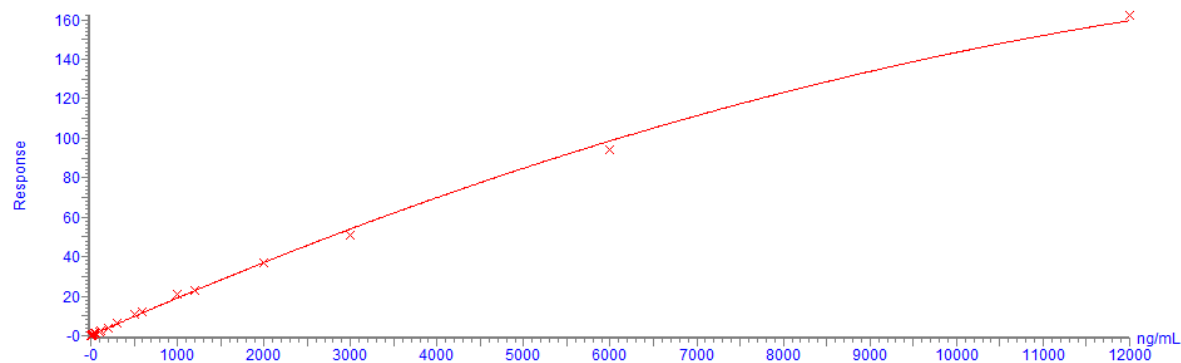
Příloha 40 Kalibrační křivka vorikonazolu

Compound name: Perampanel
Correlation coefficient: $r = 0.999143$, $r^2 = 0.998287$
Calibration curve: $0.050154 * x + 0.00785992$
Response type: Internal Std (Ref 66), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



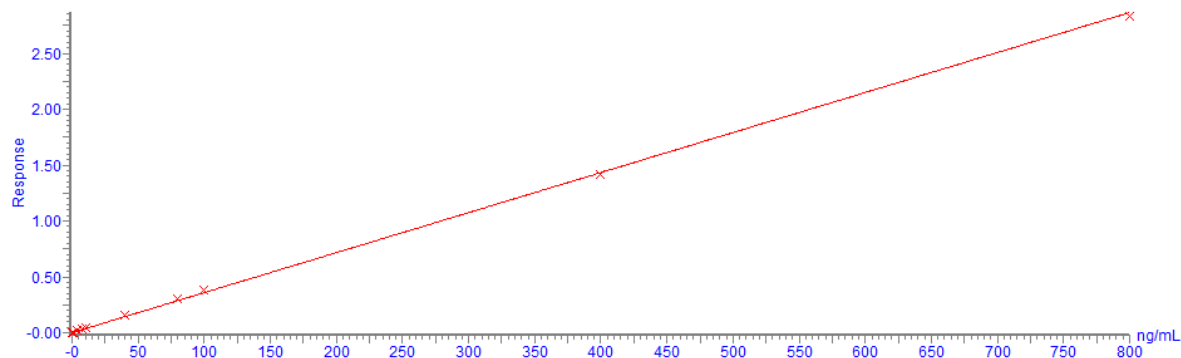
Příloha 41 Kalibrační křivka perampanel

Compound name: Topiramate
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.997473$
Calibration curve: $-5.23527e-007 * x^2 + 0.0195771 * x + 0.0613775$
Response type: Internal Std (Ref 85), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



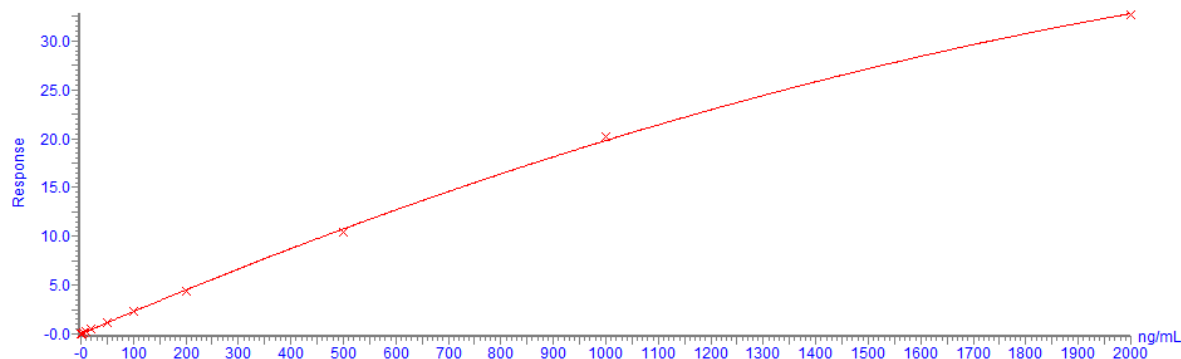
Příloha 42 Kalibrační křivka topiramátu

Compound name: Amisulpride
Correlation coefficient: $r = 0.999633$, $r^2 = 0.999267$
Calibration curve: $0.00358185 * x + 0.00087445$
Response type: Internal Std (Ref 63), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



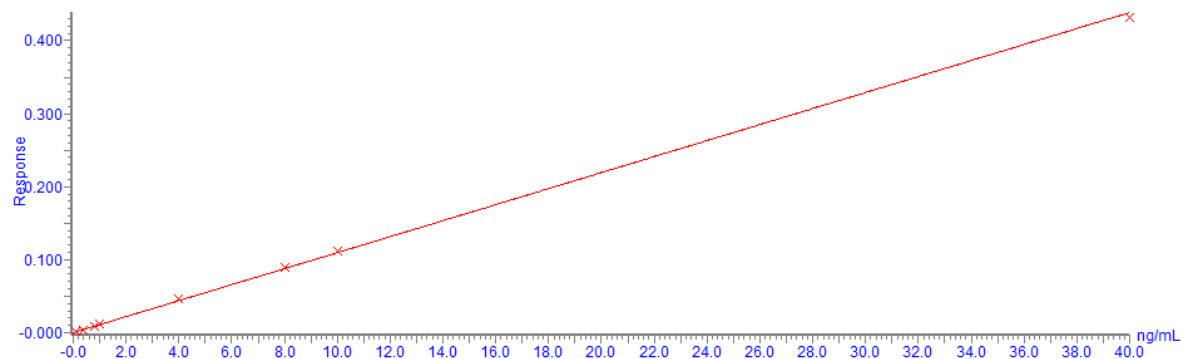
Příloha 43 Kalibrační křivka amisulpridu

Compound name: Trazodone
Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999539$
Calibration curve: $-3.40392e-006 * x^2 + 0.0232107 * x + 0.00242903$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



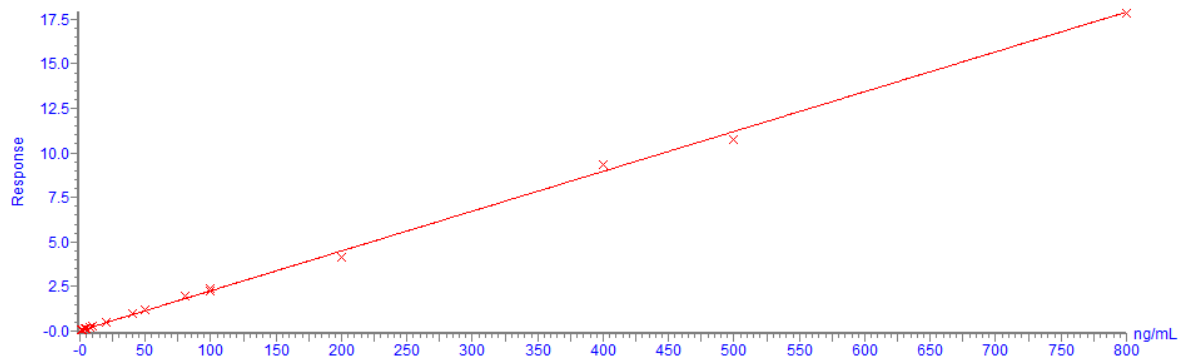
Příloha 44 Kalibrační křivka trazodonu

Compound name: Haloperidole
Correlation coefficient: $r = 0.999489$, $r^2 = 0.998978$
Calibration curve: $0.0109651 * x + 8.11335e-005$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



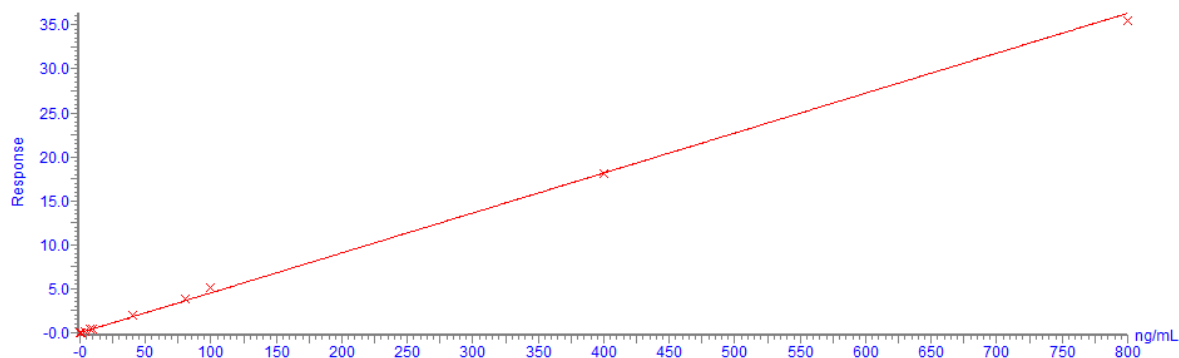
Příloha 45 Kalibrační křivka haloperidolu

Compound name: Quetiapine
Correlation coefficient: $r = 0.998895$, $r^2 = 0.997790$
Calibration curve: $0.0223515 * x + 0.0278406$
Response type: Internal Std (Ref 87), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



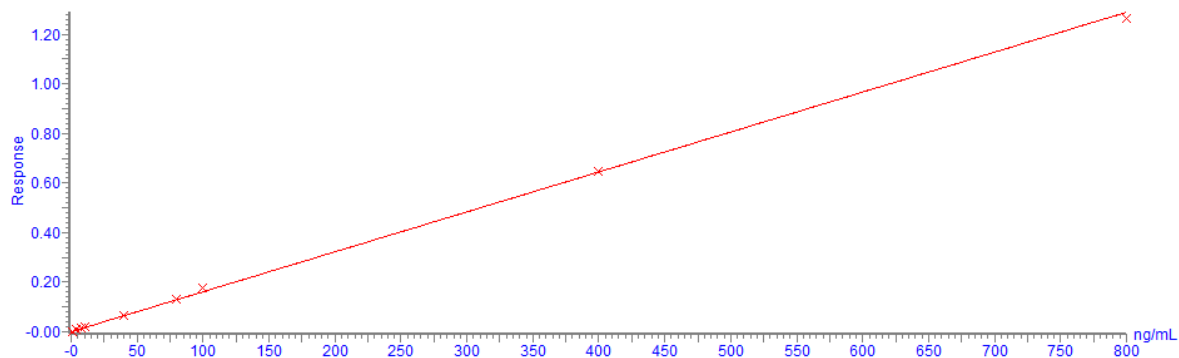
Příloha 46 Kalibrační křivka kvetiapinu

Compound name: Risperidone
Correlation coefficient: $r = 0.998973$, $r^2 = 0.997947$
Calibration curve: $0.0454201 * x + 0.00236188$
Response type: Internal Std (Ref 88), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



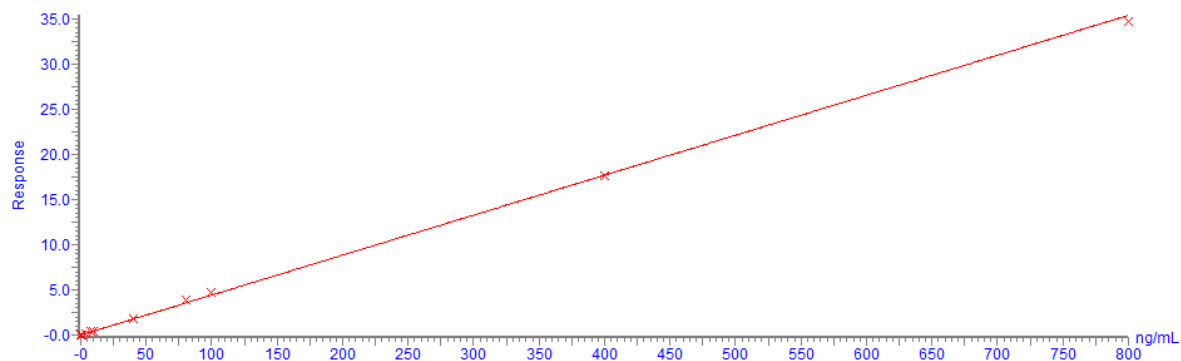
Příloha 47 Kalibrační křivka risperidon

Compound name: Ziprasidone
Correlation coefficient: $r = 0.999349$, $r^2 = 0.998698$
Calibration curve: $0.00161125 * x + 0.000546425$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



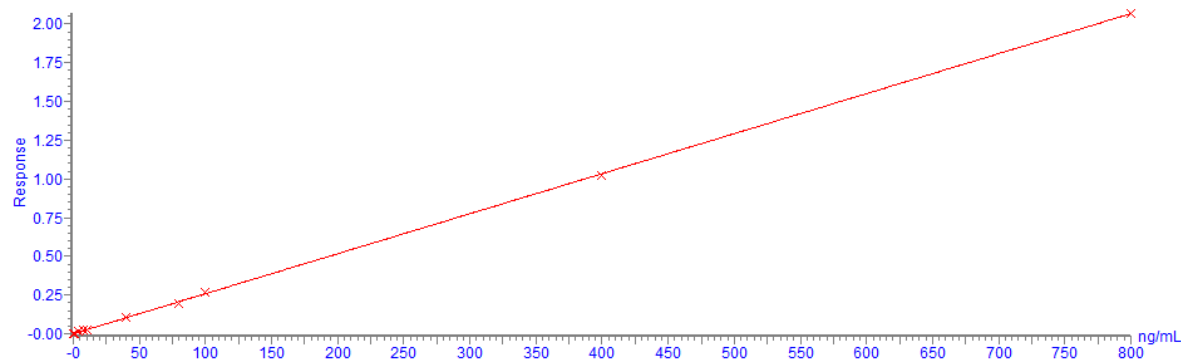
Příloha 48 Kalibrační křivka ziprasidon

Compound name: 9-hydroxy risperidone
Correlation coefficient: $r = 0.999399$, $r^2 = 0.998799$
Calibration curve: $0.0442274 * x + 0.00165006$
Response type: Internal Std (Ref 88), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



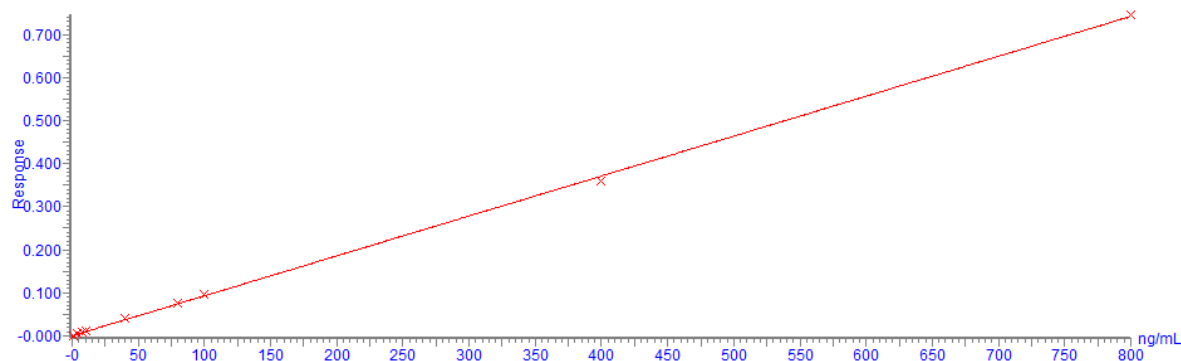
Příloha 49 Kalibrační křivka 9-hydroxy risperidon

Compound name: Flupentixol
Correlation coefficient: $r = 0.999655$, $r^2 = 0.999310$
Calibration curve: $0.00258365 * x + 0.000150838$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



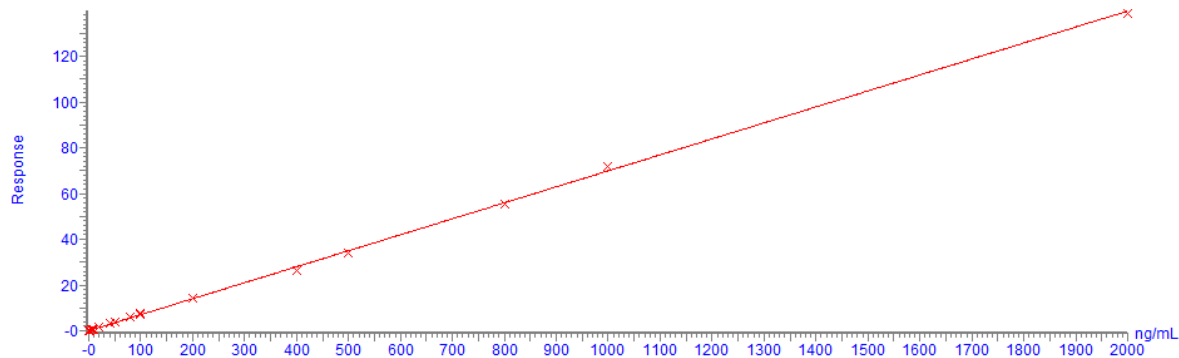
Příloha 50 Kalibrační křivka flupentixolu

Compound name: Fluphenazine
Correlation coefficient: $r = 0.999632$, $r^2 = 0.999265$
Calibration curve: $0.000926858 * x + 0.000476027$
Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



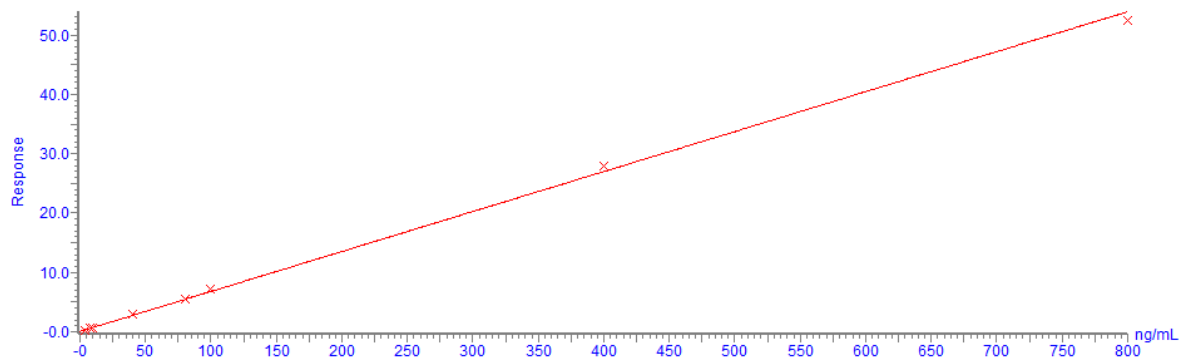
Příloha 51 Kalibrační křivka flufenazinu

Compound name: Dehydro aripiprazole
Correlation coefficient: $r = 0.999455$, $r^2 = 0.998910$
Calibration curve: $0.0698745 * x + 0.0561089$
Response type: Internal Std (Ref 89), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



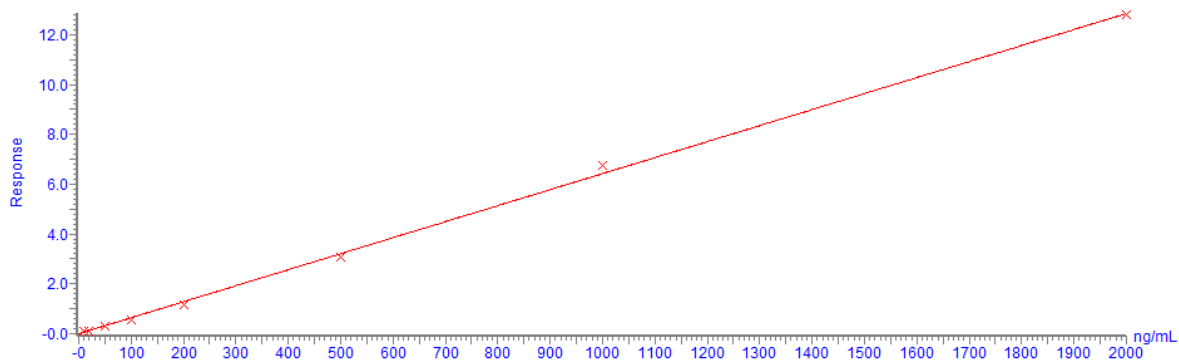
Příloha 52 Kalibrační křivka dehydro aripiprazolu

Compound name: Aripiprazole
Correlation coefficient: $r = 0.999414$, $r^2 = 0.998828$
Calibration curve: $0.0673457 * x + 0.0570115$
Response type: Internal Std (Ref 89), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



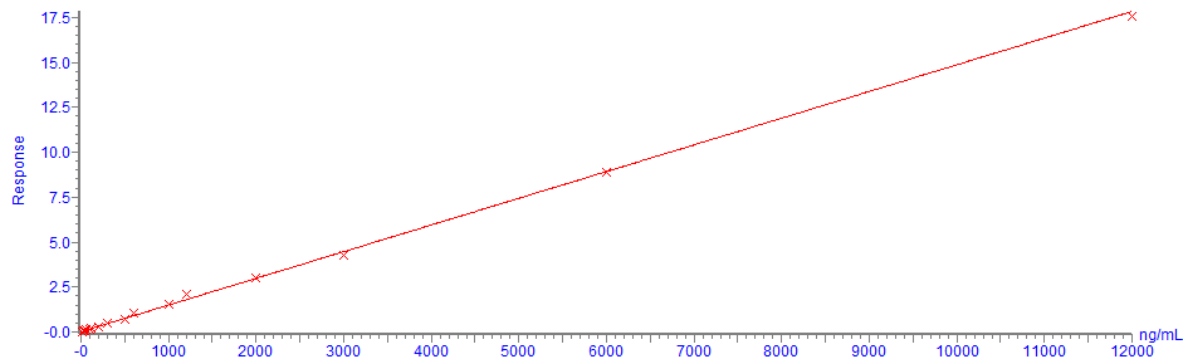
Příloha 53 Kalibrační křivka aripiprazolu

Compound name: Posaconazole
Correlation coefficient: $r = 0.998994$, $r^2 = 0.997990$
Calibration curve: $0.00643222 * x + -0.00778544$
Response type: Internal Std (Ref 92), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



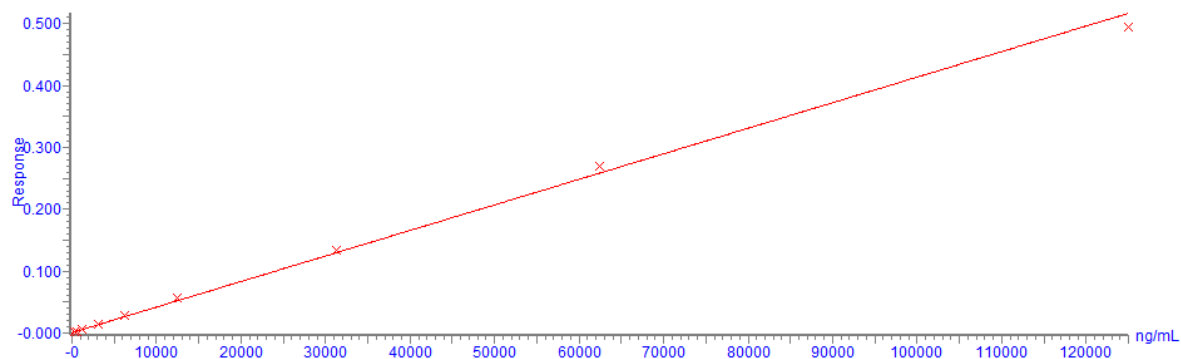
Příloha 54 Kalibrační křivka posakonazolu

Compound name: Itraconazole
Correlation coefficient: $r = 0.998643$, $r^2 = 0.997288$
Calibration curve: $0.0014854 * x + 0.0134399$
Response type: Internal Std (Ref 92), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



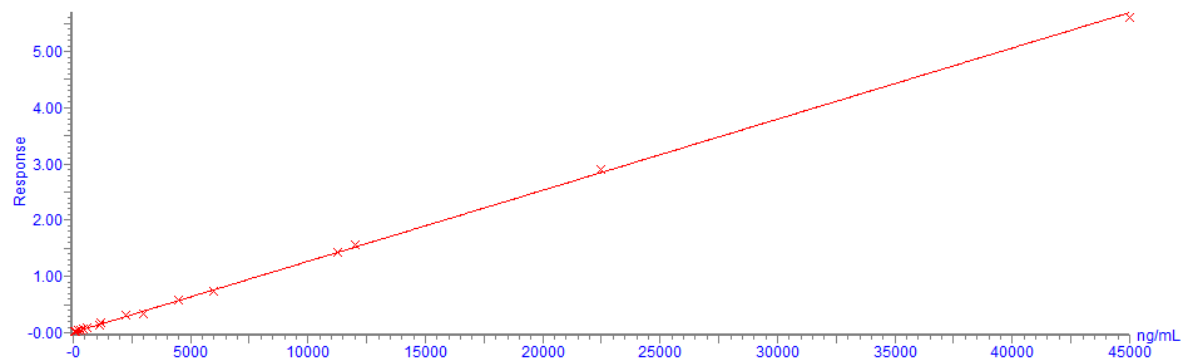
Příloha 55 Kalibrační křivka itraconazolu

Compound name: Valproic acid
Correlation coefficient: $r = 0.998830$, $r^2 = 0.997661$
Calibration curve: $4.12879e-006 * x + 0.000685884$
Response type: Internal Std (Ref 67), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Příloha 56 Kalibrační křivka kyseliny valproové

Compound name: Phenobarbital
Correlation coefficient: $r = 0.999384$, $r^2 = 0.998768$
Calibration curve: $0.000126436 * x + 0.00481257$
Response type: Internal Std (Ref 91), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Příloha 57 Kalibrační křivka fenobarbitalu

Prohlášení o mlčenlivosti

Já (jméno, příjmení) KATEŘINA KVAŤKA
datum narození 28.11.1998

se zavazuji zachovávat úplnou mlčenlivost o všech informacích, které jsem získal v souvislosti se sběrem dat ve Fakultní nemocnici Ostrava za účelem popsáním na str. 1 tohoto tiskopisu. Jedná se zejména o tyto informace:

1. Všechny informace týkající se osobních údajů pacientů:
 - a. jméno pacienta,
 - b. zdravotní stav pacienta,
 - c. hospitalizace/ambulantní péče ve FNO,
 - d. jiné.
2. Informace o zdravotnickém zařízení, klinice, ústavu, centru, odděleních, na kterých sběr dat probíhal.

Dále se zavazuji neposkytovat žádné informace o Fakultní nemocnici Ostrava sdělovacím prostředkům, prostřednictvím sociálních sítí, apod..

Jsem si vědom(a), že patientská data mohou čerpat pouze z dat pacientů, kteří k tomu udělili souhlas (viz záznam v „Prohlášení pacienta/zákonného zástupce – zdravotní služby: hospitalizace/ambulantní péče“).

Jsem si vědom(a), že získána data mohou ve své práci použít pouze v anonymní podobě, tzn. konkrétní pacient nesmí být žádným způsobem identifikovatelný.

Jsem si vědom(a), že povinnost mlčenlivosti nezaniká ukončením mé činnosti ve FNO.

Porušení výše uvedených zásad může být důvodem odebrání souhlasu ke sběru dat, rovněž může mít za následek důsledky plynoucí z porušení platné legislativy jak v rovině trestněprávní, tak v rovině občanskoprávní.

V Ostravě dne: 28.02.2023



podpis