

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Terezie Garláthyová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Analýza vybraných psychofarmak

Bc. Terezie Garláthyová

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Terezie Garláthyová**
Osobní číslo: **C21469**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Analýza vybraných psychofarmak**
Téma práce anglicky: **Analysis Of Selected Psychopharmaceuticals**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na psychofarmaka a možnosti jejich stanovení v biologických vzorcích.
2. V experimentální části vyvíjejte a zvalidujte metodu pro stanovení vybraných psychofarmak. Získanou metodu aplikujte na reálné vzorky.
3. Dosažené výsledky zhodnotte.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Vladimíra Gebauerová**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

LS.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem *Analýza vybraných psychofarmak* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Terezie Garláthyová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, doc. Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při vypracování práce. Současně bych chtěla poděkovat Ing. Vladimíře Gebauerové a jejímu kolektivu na Ústavu soudního lékařství v Ostravě, za cennou spolupráci, konzultace a poskytnutí možnosti uskutečnit experimentální část práce v jejich laboratoři.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá vývojem a validací analytické metody pro stanovení hladiny vybraných psychofarmak v biologických vzorcích pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Zaměřuje se na nová léčiva používaná v psychiatrii k léčbě bipolární poruchy, deprese, alkoholismu, schizofrenie a Alzheimerovy choroby. Teoretická část se zabývá popisem vlastností jednotlivých léčiv, chemických a farmakologických aspektů jejich účinku. Dále je popsána použitá analytická metoda a parametry validace. V experimentální části byla provedena validace metody a následně aplikována na reálné vzorky od pacientů. Práce se uskutečnila na Ústavu soudního lékařství v Ostravě.

KLÍČOVÁ SLOVA

psychofarmaka, bipolární porucha, alkoholismus, schizofrenie, Alzheimerova choroba, deprese, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace metody

TITLE

Analysis of Selected Psychofarmaceuticals

ANNOTATION

The thesis deals with the development and validation of an analytical method for the determination of selected psychopharmaceuticals in biological samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. It focuses on new drugs used in psychiatry for the treatment of bipolar disorder, depression, alcoholism, schizophrenia and Alzheimer's disease. The theoretical part deals with the description of the properties of individual drugs, chemical and pharmacological aspects of their action. Furthermore, the analytical method used and the validation parameters are described. In the experimental part, the method was validated and then applied to real samples from patients. The work was carried out at the Institute of Forensic Medicine in Ostrava.

KEYWORDS

psychopharmaceuticals, bipolar disorder, alcoholism, schizophrenia, Alzheimer's disease, depression, liquid chromatography, mass spectrometry, method validation

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK	12
SEZNAM ROVNIC	13
SEZNAM GRAFŮ	13
SEZNAM ZKRATEK	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
Úvod	16
1.1 Psychofarmaka	17
1.1.1 <i>Asenapin</i>	17
1.1.2 <i>Disulfiram</i>	20
1.1.3 <i>Flufenazin</i>	23
1.1.4 <i>Fluvoxamin</i>	25
1.1.5 <i>Galantamin</i>	28
1.1.6 <i>Memantin</i>	31
1.1.7 <i>Sertindol</i>	33
1.1.8 <i>Tranylcypromin</i>	35
1.2 Kapalinová chromatografie	40
1.2.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	40
1.3 Hmotnostní spektrometrie	44
1.3.1 <i>Kvadrupól</i>	44
1.3.2 <i>Tandemová hmotnostní spektrometrie</i>	45
1.4 Validace.....	47
1.4.1 <i>Selektivita</i>	47
1.4.2 <i>Linearita</i>	47
1.4.3 <i>Limit detekce (LOD)</i>	47
1.4.4 <i>Limit kvantifikace (LOQ)</i>	47
1.4.5 <i>Správnost výsledků</i>	48
1.4.6 <i>Rozptyl výsledků</i>	48
1.4.7 <i>Horwitzova rovnice</i>	49
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
2.1 Cíl práce	51
2.2 Použité chemikálie.....	51
2.2.1 <i>Příprava standardů</i>	51
2.2.2 <i>Analýza HPLC-MS</i>	51
2.3 Přístrojové vybavení.....	51

2.4	Pracovní postupy	52
2.4.1	<i>Příprava zásobních roztoků</i>	52
2.4.2	<i>Příprava směsného roztoku pro kvalitativní analýzu</i>	52
2.4.3	<i>Příprava kalibrační řady</i>	52
2.4.4	<i>Reálné vzorky</i>	53
2.4.5	<i>Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí</i>	53
2.5	Výsledky a vyhodnocení	55
2.5.1	<i>Kvalitativní analýza</i>	55
2.5.2	<i>Kalibrace</i>	57
2.5.3	<i>Validační parametry</i>	57
2.5.4	<i>Vyhodnocení</i>	57
2.5.5	<i>Reálné vzorky</i>	60
3	Závěr	62
4	Použitá literatura	63
5	PŘÍLOHY	71
	Příloha 1: Příprava zásobních roztoků, aparatura	71
	Příloha 2: Naměřená data, výpočty	74
5.1	Asenapin	74
5.2	Disulfiram	76
5.3	Flufenazin	78
5.4	Fluvoxamin	80
5.5	Galantamin	82
5.6	Memantin	84
5.7	Sertindol	86
5.8	Tranlylcypromin	88

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Asenapin; 5-chloro-2,3,3a,12b-tetrahydro-2-methyl-1H-dibenz[2,3:6,7] oxepino[4,5-c] pyrol [zdroj: vlastní].....	17
Obrázek 2 Biotransformace asenapinu [zdroj: vlastní]	19
Obrázek 3 Disulfiram; tetraethylthiuram disulfid [zdroj: vlastní]	20
Obrázek 4 Odbourávání alkoholu za fyziologických podmínek [zdroj: vlastní]	21
Obrázek 5 Biotransformace disulfiramu [zdroj: vlastní]	21
Obrázek 6 Flufenazin; 4-[3-(2-trifluoromethyl-10-fenothiazin)-propyl]-1-piperazinethanol [zdroj: vlastní].....	23
Obrázek 7 Fluvoxamim; 5-methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1-pentanon [zdroj: vlastní]	25
Obrázek 8 Mechanismus účinku SSRI [1].....	26
Obrázek 9 Produkty biotransformace fluvoxaminu [zdroj: vlastní]	27
Obrázek 10 Galantamin; (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-1-methyl-6H- benzofuro[3a,3,2-e,f][2]benzazepin-6-ol] [zdroj: vlastní]	28
Obrázek 11 Mechanismus působení galantaminu (převzato a upraveno z [34])	29
Obrázek 12 Memantin; 3,5-dimethyldamantan-1-amin [zdroj: vlastní]	31
Obrázek 13 Sertindol; 1-[2-[4-[5-chloro-1-(4-fluorofenyl)-1H-indol-3-yl]-1-piperidinyl]ethyl]-2-imidazolidinon [zdroj: vlastní]	33
Obrázek 14 Tranlylcypromin; trans-2-fenylcyklopropylamin [zdroj: vlastní]	35
Obrázek 15 Schéma kapalinového chromatografu (převzato a upraveno z [55])	41
Obrázek 16 Schéma smyčkového dávkovače (převzato z https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/kapalinova-chromatografie.pdf , staženo 28. 3. 2023)	42
Obrázek 17 Kvadrupól [55].....	45
Obrázek 18 Souhrnný chromatogram léčiv [zdroj:vlastní].....	58
Obrázek 19 Chromatogramy zvolených kvantifikačních iontů [zdroj: vlastní].....	59
Obrázek 20 Chromatogram pacienta 1, biologický materiál moč [zdroj: vlastní]	60
Obrázek 21 Chromatogram pacienta 2, biologický materiál moč [zdroj: vlastní]	61
Obrázek 22 Zásobní roztoky [zdroj: vlastní]	71
Obrázek 23 Krimpovací kleště, vialka [zdroj: vlastní]	71
Obrázek 24 Injekční stříkačka [zdroj: vlastní].....	72
Obrázek 25 Injekční stříkačka se stříkačkovým filtrem [zdroj: vlastní]	72
Obrázek 26 Kalibrační řada ve vialkách [zdroj: vlastní]	72
Obrázek 27 Kapalinový chromatograf Agilent 1290 II a hmotnostní spektrometr Agilent 6470 [zdroj:vlastní] .	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled farmakologických vlastností léčiv [2; 7]	38
Tabulka 2 Přehled chemických vlastností léčiv [10]	39
Tabulka 3 Hodnoty RSD _R při různých koncentracích [62]	49
Tabulka 4 Příprava zásobních roztoků	52
Tabulka 5 Kalibrační řada pro asenapin, flufenazin, galantamin, tranlycypromin	53
Tabulka 6 Kalibrační řada disulfiram, fluvoxamin, memantin, sertindol,	53
Tabulka 7 Gradientová eluce	54
Tabulka 8 Kvalitativní analýza směsného roztoku léčiv	55
Tabulka 9 Přehled fragmentačních přechodů léčiv, kolizní energie, retenčního času, výstup z MassHunter Source Optimizer	56
Tabulka 10 Ionty zvolené jako kvantifikační, včetně interního standardu propiverinu	57
Tabulka 11 Souhrn validovaných parametrů	58
Tabulka 12 Vzorky pacientů	60
Tabulka 13 Výsledky měření pro asenapin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	74
Tabulka 14 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro asenapin	75
Tabulka 15 Výsledky měření pro disulfiram, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	76
Tabulka 16 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro disulfiram	77
Tabulka 17 Výsledky měření pro flufenazin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	78
Tabulka 18 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro flufenazin	79
Tabulka 19 Výsledky měření pro fluvoxamin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	80
Tabulka 20 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro fluvoxamin	81
Tabulka 21 Výsledky měření pro galantamin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	82
Tabulka 22 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro galantamin	83
Tabulka 23 Výsledky měření pro memantin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	84
Tabulka 24 Zpětně vypočítané koncentrac, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro memantin	85
Tabulka 25 Výsledky měření pro sertindol, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	86
Tabulka 26 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro sertindol	87
Tabulka 27 Výsledky měření pro tranlycypromin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu	88
Tabulka 28 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro tranlycypromin	89

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Výpočet limitu detekce, s je šum základní linie	47
Rovnice 2 Výpočet limitu kvantifikace, s je šum základní linie.....	48
Rovnice 3 Výpočet bias [%], \bar{x} je aritmetický průměr získaných dat, x_{ref} je správná/referenční hodnota	48
Rovnice 4 Výpočet směrodatné odchylky z naměřené hodnoty (x_i), aritmetického průměru (\bar{x}) a počtu dat (n). ..	48
Rovnice 5 Výpočet relativní směrodatné odchylky RSD [%] ze směrodatné odchylky (σ) a aritmetického průměru hodnot (\bar{x})	48
Rovnice 6 Horwitzova rovnice dle Jung-Keun Lee, kde c je koncentrace vyjádřená bezrozměrným hmotnostním zlomkem, RSD_R [%] je variační koeficient	49
Rovnice 7 Predikované RSD_R ($PRSD_R$) [%] pro reprodukovatelnost [62]	50
Rovnice 8 Horwitzův poměr pro reprodukovatelnost [62]	50
Rovnice 9 Predikované RSD_r ($PRSD_r$) [%] pro opakovatelnost [59].....	50
Rovnice 10 Horwitzův poměr pro opakovatelnost [62].....	50

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační přímka asenapinu	74
Graf 2 Kalibrační přímka disulfiramu	76
Graf 3 Kalibrační přímka flufenazinu	78
Graf 4 Kalibrační přímka fluvoxaminu.....	80
Graf 5 Kalibrační přímka galantaminu	82
Graf 6 Kalibrační přímka memantinu	84
Graf 7 Kalibrační přímka sertindolu	86
Graf 8 Kalibrační přímka tranlycyprominu.....	88

SEZNAM ZKRATEK

ADH	alkoholdehydrogenáza
ALT	alaninaminotransferáza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	ionizace v kapalně fázi za atmosférického tlaku
ASG	asenapin-N-glukuronid
AST	aspartátaminotransferáza
CAS	Chemical Abstract Service Registry Number, identifikační číslo, pod nímž jsou chemické látky registrovány
CEN	Comité Européen de Normalisation, Evropský výbor pro normalizaci
CYP	cytochrom P450
CNS	centrální nervová soustava
DART	Direct Analysis in Real Time, iontový zdroj iontový zdroj umožňující přímou analýzu v reálném čase
DDC	kyselina diethyldithiokarbamová
DESI	Desorption Electrospray Ionization, desorpční ionizace elektrosprejem
DMA	N-demethylasenapin
EI	Electron Ionisation, elektronová ionizace
EKG	elektrokardiograf
ESI	Electrospray Ionisation, ionizace elektrosprejem
GABA	kyselina gama-aminomáselná
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMAO	inhibitor monoaminoxidáz
LC	Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie
LOD	Limit of Detection, limit detekce
LOQ	Limit of Quantification, limit kvantifikace
MAO	monoaminoxidáza
MF	mobilní fáze
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NDMA	N-methyl-D-aspartát
NP LC	kapalinová chromatografie normálními fázemi
RP LC	kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

RSD	relativní směrodatná odchylka
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin

1 TEORETICKÁ ČÁST

Úvod

Dnes, ve 21. století, v poměrně uspěchané době náročné na psychiku a duševní zdraví dosahuje psychiatrie, jakožto lékařský a vědní obor, svého největšího rozvoje. Vzhledem k socioekonomickým podmínkám posledních desítek let se právě neuropsychiatrické choroby staly jednou z nejvýznamnějších skupin onemocnění. S nástupem nových moderních technik a postupů došlo k vývoji i na poli farmakologickém. Nasazují se nová a účinnější léčiva a je nezbytné vyvíjet i metody na jejich analýzu, zejména v biologickém materiálu. V případě výskytu nežádoucích účinků u pacienta je nutné zjistit hladinu daného léčiva v těle, aby se dalo určit, zda je hladina terapeutická nebo došlo k předávkování, a je neodkladné podat antidota nebo zahájit jinou podpůrnou léčbu.

Toxikologická laboratoř Ústavu soudního lékařství v Ostravě se zabývá klinickou a forenzní toxikologií, a stanovení hladiny léčiv patří již k rutinním analýzám. Vzhledem k neustálému vývoji nových farmak a návykových látek je ale nutné sledovat aktuální dění a mít validované metody i na nejnovější látky, čemuž je věnovaná tato práce.

V teoretické části práce jsou představena nová psychiatrická léčiva, a to asenapin, disulfiram, flufenazin, fluvoxamin, galantamin, memantin, sertindol a tranylcypromin, z chemického a farmakologického hlediska, spolu s příkladem analýzy v biologickém materiálu. Dále je popsána metoda analýzy použitá v experimentální části a nezbytné parametry validace, bez kterých by metoda nemohla být schválena a využívána v praxi.

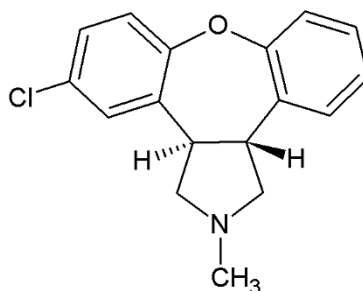
1.1 Psychofarmaka

Psychofarmaka (řecky *psyché* – duše, *farmakon* – lék), představují látky, které působením na CNS ovlivňují duševní činnost člověka. Patří mezi jedny z nejvíce předepisovaných léčiv, přičemž nejčastěji jsou předepisovány antidepresiva. Dříve byla psychofarmaka klasifikována dle chemické struktury, v praxi bývá často využíváno rozdělení dle aktivity na receptorech nervových buněk, ale nejvíce se, z převážně praktických důvodů, uplatňuje rozdělení dle klinického účinku, a to na:

- antidepresiva
- antipsychotika
- stabilizátory nálady
- anxiolytika
- sedativa

Kromě toho se vyskytují i léčiva určená k substituci návykových látek, léky podporující odvykací léčbu či úzce zaměřená léčiva. Z léčiv charakterizovaných v této práci budeme hovořit o antipsychotikách (asenapin, flufenazin, sertindol), antidepresivech (fluvoxamin, tranlycypromin), antidementivech (galantamin, memantin) a lécích určených k léčbě alkoholismu (disulfiram) [1].

1.1.1 Asenapin



Obrázek 1 Asenapin; 5-chloro-2,3,3a,12b-tetrahydro-2-methyl-1H-dibenz[2,3:6,7] oxepino[4,5-c] pyrol [zdroj: vlastní]

Asenapin (Sycrest) je antipsychotikum, užívané k léčbě středně těžkých až těžkých manických epizod u dospělých s bipolární poruchou prvního typu. V klinické praxi je využíván od roku 2009. [2; 3]

1.1.1.1 Chemické vlastnosti

Asenapin je tetracyklická sloučenina, 5-chloro-2,3,3a,12b-tetrahydro-2-methyl-1H-dibenz[2,3:6,7] oxepino[4,5-c] pyrol, ve které mají obě stereocentra konfiguraci S. Jedná

se o enantiomer (R,R)-asenapinu. V léčivech se vyskytuje ve formě maleátu, jenž má podobu bílého prášku. Samotný asenapin je, dle výrobce referenčního standardu (Toronto Research Chemicals), hnědá až tmavě hnědá lepkavá pevná látka. Asenapin je rozpustný v chloroformu a methanolu. [2; 4]

1.1.1.2 Farmakodynamika

Původ bipolární poruchy typu 1 zatím nebyl zcela objasněn, předpokládá se však, že asenapin ovlivňuje manické a psychické stavy prostřednictvím kombinovaného antagonismu vůči serotoninovým 5-HT_{2A} a dopaminovým D₂ receptorům. V menší míře má také vliv na další serotoninové receptory (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5HT_{2B} atd.), adrenergní α_1 a α_2 receptory či histaminové H₁ a H₂ receptory. K muskarinovým ani cholinergním receptorům asenapin nevykazuje znatelnou afinitu. [3; 5; 6]

1.1.1.3 Farmakokinetika

Po sublinguálním podání dosahuje asenapin maximální plazmatické koncentrace během 30 minut až 1,5 hodiny. Maximální biologická dostupnost¹ při sublinguálním podání 5 mg asenapinu je 35 %. U dalších způsobů podání je biologická dostupnost nižší než 2 %. Vypití tekutin či pozření potravy vede ke snížení biologické dostupnosti až o 19 %. [6]

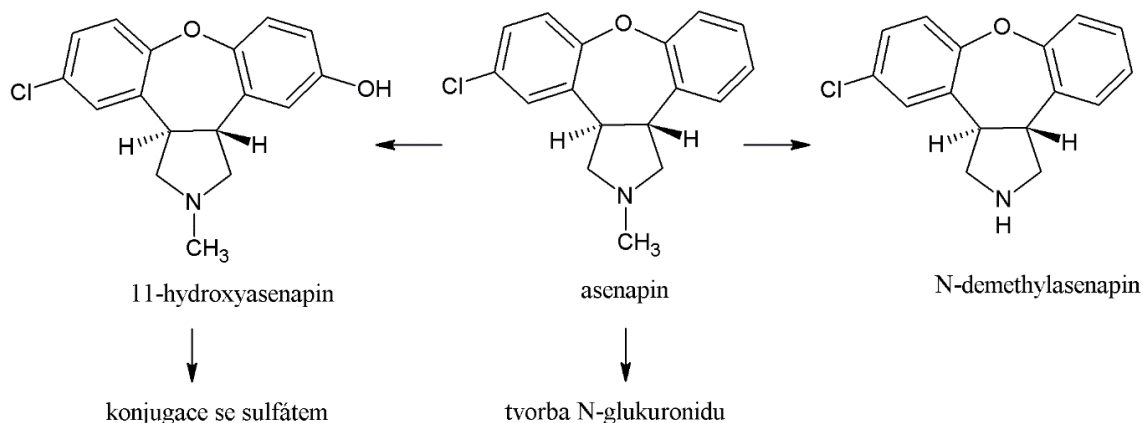
Asenapin je v organismu rychle distribuován, jeho distribuční objem² se pohybuje okolo 20–30 l/kg. Váže se na plazmatické proteiny (97–95 %), včetně albuminu a α -glykoproteinu. Biologický poločas³ činí 17–31 hodin. [2]

Biotransformace asenapinu probíhá přímou glukuronidací pomocí enzymů UGT1A4, cytochromu P450 (primárně CYP1A2, poté 2D6 a 3A4) zprostředkovanou oxidací a demethylací. V *in vivo* studii na zdravých dobrovolnících s radioaktivně značeným asenapinem byl v plazmě převládající metabolit N-glukuronid, dále pak N-demethylasenapin a N-karbamoyl glukuronid. Během této studie s radioaktivně značenou dávkou bylo zjištěno, že 50 % dávky bylo vyloučeno močí, 40 % stolicí. V moči byl přítomen asenapin-N-glukuronid (10–21 %), konjugovaný 11-hydroxyasenapin (>5 %), malé množství původního léčiva a demethylovaného asenapinu (<3 %). [3; 7]

¹ Procentuální podíl podaného léčiva, které se dostane do systémového oběhu. [69]

² Objem tekutiny, ve kterém by se léčivo muselo rozpustit, aby dosáhlo stejné koncentrace jako v plazmě. [69]

³ Čas potřebný k tomu, aby se aktuální koncentrace léčiva v plazmě snížila na polovinu. [69]



Obrázek 2 Biotransformace asenapinu [zdroj: vlastní]

1.1.1.4 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří úzkost a somnolence⁴. Dále se může projevit příbytek tělesné hmotnosti a zvýšená chuť k jídlu. Z poruch nervového systému může docházet k parkinsonismu, sedaci či závratím. Pacient se může cítit také více unavený. Méně často byly zaznamenány alergické reakce, hyperglykemie, synkopa⁵, syndrom neklidných nohou nebo i srdeční poruchy v podobě sinusové bradykardie a tachykardie, či blokády Tawarova raménka. U reprodukčních orgánů je možný výskyt sexuální dysfunkce, gynekomastie, a u žen galaktorey a amenorey. V rané fázi léčby asenapinem dochází také ke zvýšení hladin jaterních transamináz, konkrétně alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). [6]

Během studií *in vitro* bylo zjištěno, že asenapin má slabý inhibující účinek na enzym CYP2D6. Z tohoto důvodu je doporučeno opatrnosti při současném užívání asenapinu a léků, které jsou zároveň substráty nebo inhibitory CYP2D6, např. imipramin (antidepresivum) nebo dextrometorfan (antitusikum). [5; 6]

1.1.1.5 Předávkování

Doposud bylo hlášeno jen několik případů předávkování asenapinem, přičemž odhadované hodnoty dávek se pohybovaly v rozmezí 15–400 mg. Ve většině případů nebyl objasněn způsob podání. Většinou došlo k zesílení nežádoucích účinků, jako jsou agitovanost a zmatenost, orofaciální dystonie či asymptomatické nálezy na EKG (bradykardie, zpoždění nitrokomorového převodu). Terapeutická hladina: 1–5 µg/l, toxická hladina: > 10 µg/l. [6; 7]

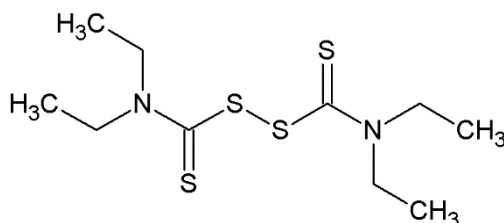
⁴ Stav, kdy je pacient spavý, ale lze jej lehce probudit. [63]

⁵ Náhlá, krátkodobá ztráta vědomí. [64]

1.1.1.6 Analýza v biologickém materiálu

Studie z roku 2011 měla za cíl validovat kvantifikační metodu pro asenapin. Boer, Meulman, Meijering a Wieling využili ke kvantifikaci metodu LC-MS/MS (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií), přičemž detekovány byly asenapin a jeho metabolity N-demethylasenapin (DMA), asenapin-N-glukuronid (ASG) a 11-O-sulfát asenapin (OSA). Kalibrační řady byly připraveny rozpuštěním standardů v ethanolu a naředěním do lidské plazmy. Roztoky o různých koncentracích poté byly přečištěny pomocí SPE kolonek (HLB Oasis). Analýza byla provedena na obrácených fázích s gradientovou elucí s následnou detekcí v MS/MS systému pomocí trojitého kvadrupólu. Sledovaný MRM (multiple reaction mode) přechod asenapinu v pozitivním módu byl m/z 286,1 \rightarrow 229,0. [8]

1.1.2 Disulfiram



Obrázek 3 Disulfiram; tetraethylthiuram disulfid [zdroj: vlastní]

Disulfiram (Antabus), je lék používaný k léčbě závislosti na alkoholu. Tato látka byla syntetizována již v roce 1881 a své využití měla ve strojírenství k vulkanizaci gumy. Ve zdravotnictví se začala používat v 30. letech 20. století k léčbě svrabu a jiných kožních onemocnění. V roce 1948 si vědci všimli neobvyklé reakce disulfiramů a alkoholu, a tak se tato látka začala používat právě v protialkoholové terapii. [2; 9]

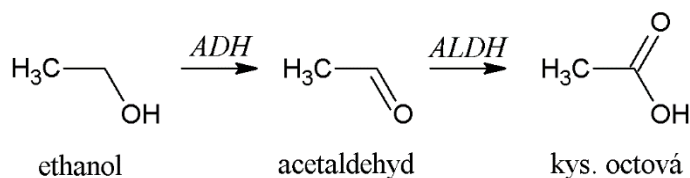
1.1.2.1 Chemické vlastnosti

Disulfiram, tetraethylthiuram disulfid, je organický disulfid vzniklý oxidativní dimerizací kyseliny N,N-diethyldithiokarbamové. Jedná se o bílý až světle hnědý prášek téměř bez zápachu. Chuť je kovová nebo česneková. Disulfiram je rozpustný v acetonu, benzenu, chloroformu a CS₂. [10; 11]

1.1.2.2 Farmakodynamika

Model mechanismu, jakým disulfiram působí, byl popsán v roce 1948 vědci Haldem a Jacobsenem. Disulfiram působí jako inhibitor enzymu CYP2E1, který je doprovodným enzymem isoenzymu alkoholdehydrogenázy (ADH), jenž během biotransformace ethanolu přeměňuje ethanol na acetaldehyd. Inhibice tohoto enzymu má za následek zvýšenou hladinu acetaldehydu v plazmě a dechu. Zvýšená koncentrace acetaldehydu způsobuje zčervenání kůže

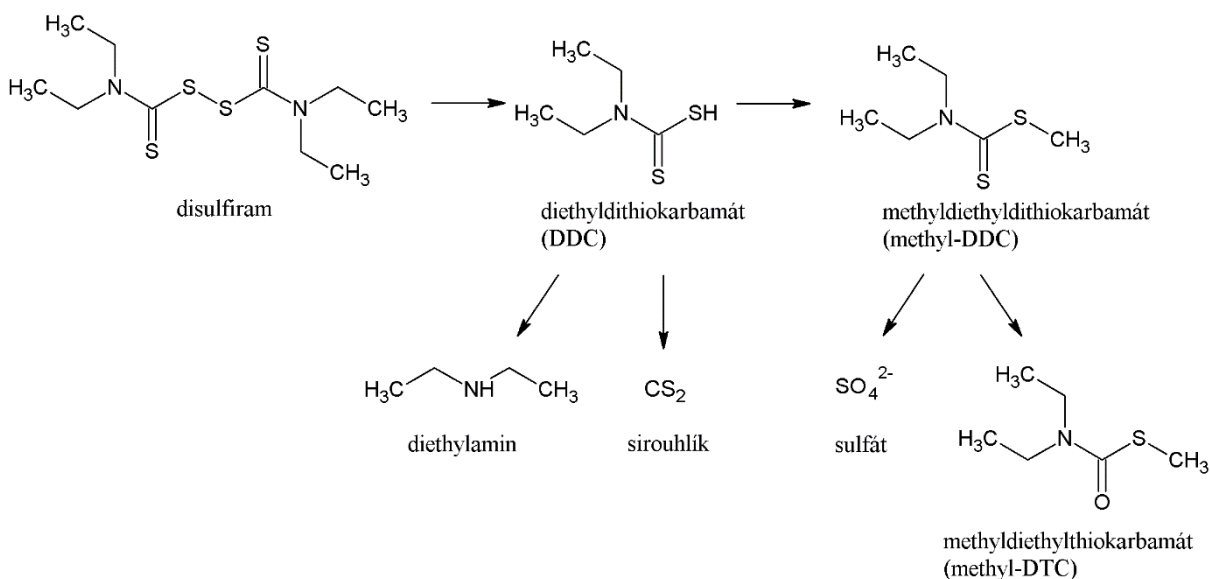
v důsledku kožní vazodilatace, a hypotenze, v důsledku snížení diastolického krevního tlaku. Dále nastávají pocity tepla, dušnost, bolest hlavy a nevolnost. Intenzita a doba trvání těchto nepříjemných projevů, jsou přímo úměrné době, po kterou je koncentrace acetaldehydu v krvi vysoká. Reakce na vysoké koncentrace acetaldehydu jsou u všech jedinců individuální. [9; 12]



Obrázek 4 Odbourávání alkoholu za fyziologických podmínek [zdroj: vlastní]

1.1.2.3 Farmakokinetika

Disulfiram se podává rozpuštěný ve sklenici vody, jeho příjem je tedy perorální. Po pozření disulfiramu je vstřebávání variabilní (asi 80 %), látka je distribuována do ledvin, slinivky břišní, jater a tukových tkání, kde má tendenci se ukládat. Maximální plazmatická koncentrace disulfiramu, 0,38 mg/ml, nastává po 5 hodinách od podání. V kyselém prostředí probíhá přeměna na kyselinu diethyldithiokarbamovou (DDC). DDC dále podléhá konjugaci s kyselinou glukuronovou, rozkladu na sirouhlík (CS₂) a diethylamin, nebo methylaci a oxidaci na sulfát. [2; 13; 14]



Obrázek 5 Biotransformace disulfiramu [zdroj: vlastní]

Jednotlivé metabolity jsou v těle distribuovány do gastrointestinálního traktu, krve, srdce, nadledvinek, sleziny, varlat či štítné žlázy. Disulfiram a DDC se vážou *in vitro*,

ale i *in vivo* na skupiny proteinů obsahující volné thiolové skupiny. Disulfiram a methylester kyseliny diethylkarbamové se mohou vázat i na albumin. [14]

Biologický poločas v plazmě je u disulfiramu 7 hodin, u diethyldithiokarbamové kyseliny 15 hodin a sirouhlíku okolo 9 hodin. Účinná látka (asi 20 %) zůstává v těle až 2 týdny po požití, k reakci s alkoholem tedy může dojít i 14 dní po poslední dávce disulfiramu. [10]

1.1.2.4 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří ospalost, bolesti hlavy, nevolnost, deprese, zápach či kovová nebo česneková chuť v ústech. Méně často se vyskytují alergické kožní reakce nebo pokles libida. Léčivo může být i hepatotoxické, může dojít ke zvýšení hodnot jaterních transamináz, k výskytu cholestatického ikteru nebo velmi vzácně může nastat nekróza a akutní selhání jater. Po požití alkoholu je možný výskyt reakce na zvýšenou hladinu acetaldehydu v podobě tzv. disulfiramové reakce; tachykardie, palpitace, zvýšené pocení, dušnost, hypotenze, v těžkých případech kolaps, arytmie, bezvědomí či epileptické stavy. Ve velmi vzácných případech byla zaznamenána i smrt v důsledku poškození jater. [2; 12; 13]

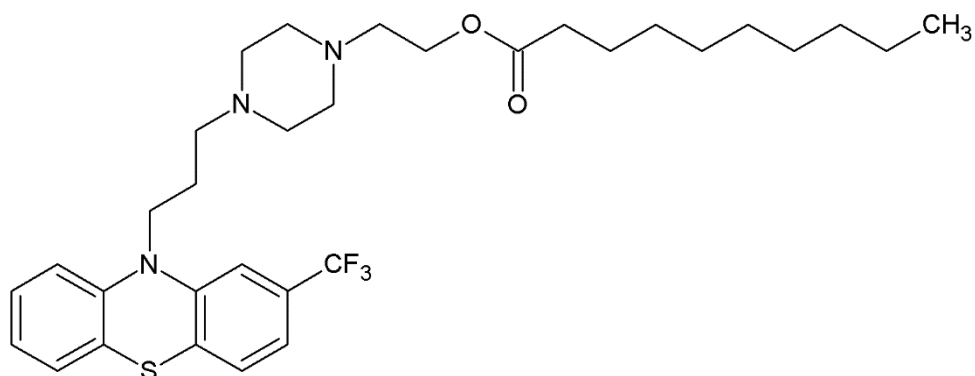
1.1.2.5 Předávkování

Při překročení dávky dochází ke zvýraznění nežádoucích účinků. Detoxikace probíhá výplachem žaludku a podpůrnou léčbou nežádoucích projevů, tj. podáváním kyslíku, intravenózním podáním tekutin, podáním vazopresorických látek (noradrenalinu). Tyto reakce nastávají při koncentraci acetaldehydu vyšší než 5 mg/l. V kombinaci s vysokou koncentrací acetaldehydu může nastat smrt, v důsledku simultánně se zvyšující koncentrace diethyldithiokarbamátu sodného. Ve statistické studii byla zjištěna incidence úmrtí v souvislosti ethanol-disulfiram 1 člověk z 25 000 pacientů za rok (2017). Terapeutická hladina: 50-400 µg/l, toxická hladina: > 500 µg/l. [9; 10; 13]

1.1.2.6 Analýza v biologickém materiálu

Stanovení disulfiramu a jeho metabolitů (DDC, methyl-DDC) v biologickém materiálu provedl Jensen a Faiman pomocí kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Disulfiram a DDC byly získány jako komerční standardy, methyl-DDC byl laboratorně připraven. Interní standard byl ethyl-p-nitrobenzoát rozpuštěn v ethanolu a následně smíchán s chloroformem. Kalibrační řady byly připraveny spikováním plazmy a moči. Extrakce byla provedena 0,01 M EDTA. Analýza proběhla na kapalinovém chromatografu Perkin-Elmer Series 2. Analyty byly detekovány spektrofotometrickým detektorem Model 440 při vlnové délce 254 nm. Retenční čas disulfiramu byl 7,4 minut. [15]

1.1.3 Flufenazin



Obrázek 6 Flufenazin; 4-[3-(2-trifluoromethyl-10-fenothiazin)-propyl]-1piperazinethanol [zdroj: vlastní]

Flufenazin (Aflutiden, Moditen), je lék užívaný k léčbě psychotických stavů a schizofrenie. Patří mezi nejúčinnější fenothiazinová neuroleptika. [16]

1.1.3.1 Chemické vlastnosti

Flufenazin, 4-[3-(2-trifluoromethyl-10-fenothiazin)-propyl]-1piperazinethanol, je derivát tricyklický alifatický fenothiazinu. V léčivech se může vyskytovat ve třech různých formách, a to jako dekanoát, enantát a hydrochlorid. Dekanoát je světle žlutá viskózní kapalina, může ale mít formu i žluté krystalické olejovité pevné látky. Je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v alkoholu, chloroformu, cyklohexanu a etheru. Enantát je žluto-oranžová čirá až lehce zakalená tekutina nebo žlutá krystalická pevná látka. Je rozpustný v ethanolu nebo v etheru. Hydrochlorid se vyskytuje ve formě bílého krystalického prášku. Je rozpustný v ethanolu, acetonu a chloroformu, ale nerozpustný ve vodě. [10; 17]

1.1.3.2 Farmakodynamika

Flufenazin způsobuje postsynaptickou inhibici dopamin-2 receptorů v mezolimbické dráze, což má pozitivní vliv na příznaky schizofrenie, jako jsou halucinace, bludy a dezorientovaná řeč. Dále působí na CNS a periferní nervovou soustavu tím, že je antagonistou α -adrenergických receptorů, a tak blokuje účinky zprostředkované histaminem a serotoninem. Esterifikace flufenazinu prodlužuje účinek působení. [7; 18; 19]

1.1.3.3 Farmakokinetika

Flufenazin se vyznačuje svou interindividualitou farmakokinetických parametrů stejně jako jiná antipsychotická léčiva. Nejlepšího vstřebávání a biologické dostupnosti lze dosáhnout intramuskulárním podáním. Flufenazin je biotransformován játry, následně je vylučován močí a stolicí. V plazmě se z 90 % váže na plazmatické proteiny. V moči se vyskytuje

7-hydroxyflufenazin a flufenazin sulfoxid. Metabolit flufenazin-N-oxid byl nalezen v plazmě. [10; 20]

Orální způsob podání 25 mg flufenazinu dosahuje nejvyšší koncentrace v plazmě po 2 hodinách od podání, a to 2–20 µg/l. Biologický poločas je 5–12 dní pro dekanóat. [2; 7; 10]

1.1.3.4 Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky mohou postihnout prakticky všechny orgánové soustavy. V případě postižení CNS se může objevit neuroleptický maligní syndrom, ospalost, pseudodeprese, hypotenze či kolísání krevního tlaku. Mohou nastat i různé metabolické a endokrinní poruchy, změna tělesné hmotnosti, periferní edém, abnormální laktace, nepravidelnost menstruace či falešný výsledek testu na graviditu. Nejsou vyloučeny ani kožní alergické reakce. Byly zaznamenány i různé hematologické změny, leukopenie, agranulocytóza nebo i eozinofilie. Objeví-li se jakákoliv bolest v ústech, dásních nebo v krku, je nutno nechat prověřit kostní dřeň na podezření z deprese kostní dřeně. Je-li potvrzena, léčba je přerušena. V důsledku vlivu na játra je možný výskyt i cholestatické žloutenky, v tomto případě je léčba taktéž přerušena. [7; 20]

1.1.3.5 Předávkování

Při předávkování dochází ke zvýraznění farmakologických, ale i nežádoucích účinků, jako jsou hypotenze či útlum CNS. Útlum může postoupit až do kómatu. Mírné předávkování se projevuje neklidem a zmateností. Při zjištění předávkování je vhodné přerušit aplikaci dávky a zahájit podpůrnou léčbu symptomů. V případě hypotenze je doporučeno podat antihypotenzivum. Hemodialýza je v tomto případě neúčinná, doporučuje se hemoperfuze⁶. Doposud byly zaznamenány 2 případy smrti z předávkování flufenazinem. Terapeutická hladina: 1–10 µg/l, toxická hladina: < 15 µg/l. [2; 7; 20]

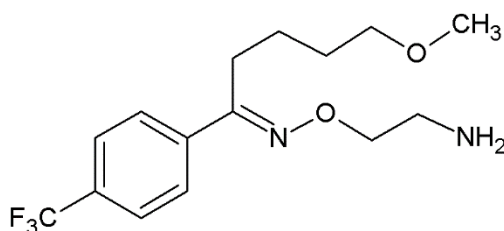
1.1.3.6 Analýza v biologickém materiálu

Saar a kolektiv se podíleli na studii identifikace a kvantifikace 30 antipsychotik v krvi metodou LC-MS/MS. Kalibrační řada byla připravena ze standardů rozpuštěných v ethanolu spikováním plné krve. Extrakce byla provedena Trizma pufrem a 1-chlorbutanem. Analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 HPLC spojeným s lineárním hmotnostním spektrometrem Applied Biosystems 3200 Q-trap® s ionizací elektrosprejem. Mobilní fáze byly dávkovány v gradientu. Sledované MRM přechody flufenazinu byly

⁶ Metoda mimotělního očišťování krve pomocí kolony s aktivním uhlím a syntetické pryskyřice. [68]

m/z 438,1→171, m/z 438,1→100, m/z 438,1→143,1, přičemž přechod m/z 438,1→171 byl použit i jako kvantifikační. [21]

1.1.4 Fluvoxamin



Obrázek 7 Fluvoxamin; 5-methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1-pentanon [zdroj: vlastní]

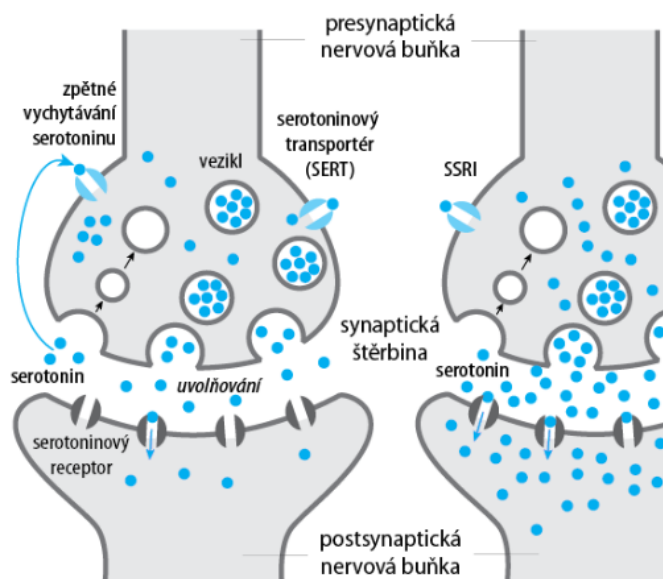
Fluvoxamin (Fevarin) je jedním z nejstarších antidepresiv ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Užívá se k léčbě depresivních epizod nebo obsedantně kompulzivní poruchy. V posledních letech (2019–2021) byly také zkoumány jeho účinky i při léčbě onemocnění COVID-19, spolu s možnými souvislostmi mezi infekcí COVID-19 a vznikem neuropsychiatrických onemocnění. [22; 23]

1.1.4.1 Chemické vlastnosti

Fluvoxamin, 5-methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1-pentanon, je tvořen benzenem substituovaným v polohách 1 a 4, a to N-(2-aminoethoxy)-5-methoxypentanimidoylovou skupinou a trifluormethylem. V léčivech se vyskytuje ve formě maleátu. Jedná se o bílý krystalický prášek, rozpustný v ethanolu, methanolu a chloroformu. [10; 24]

1.1.4.2 Farmakodynamika

Fluvoxamin usnadňuje serotoninergní neurotransmisi prostřednictvím silné a selektivní inhibice presynaptického zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Za normálních podmínek je serotonin uvolňován z presynaptického neuronu ve vezikulách. Vezikuly se dostanou do synaptické štěrbině, kde aktivují serotoninové receptory na druhém postsynaptickém neuronu, a tím dochází k přenosu signálu. Část serotoninu je v synaptické štěrbině odbourána pomocí monoaminoxidáz (MAO) na nefunkční aminokyseliny, nebo je recyklována presynaptickým neuronem a přijata zpět a uložena ve vezikulu. Tento děj zprostředkován přes transportní proteiny, SSRI způsobují inhibici těchto proteinů a serotonin tak zůstává v synaptické štěrbině déle a má větší šanci aktivovat serotoninový receptor na postsynaptické buňce. [1; 25; 26]



Obrázek 8 Mechanismus účinku SSRI [1]

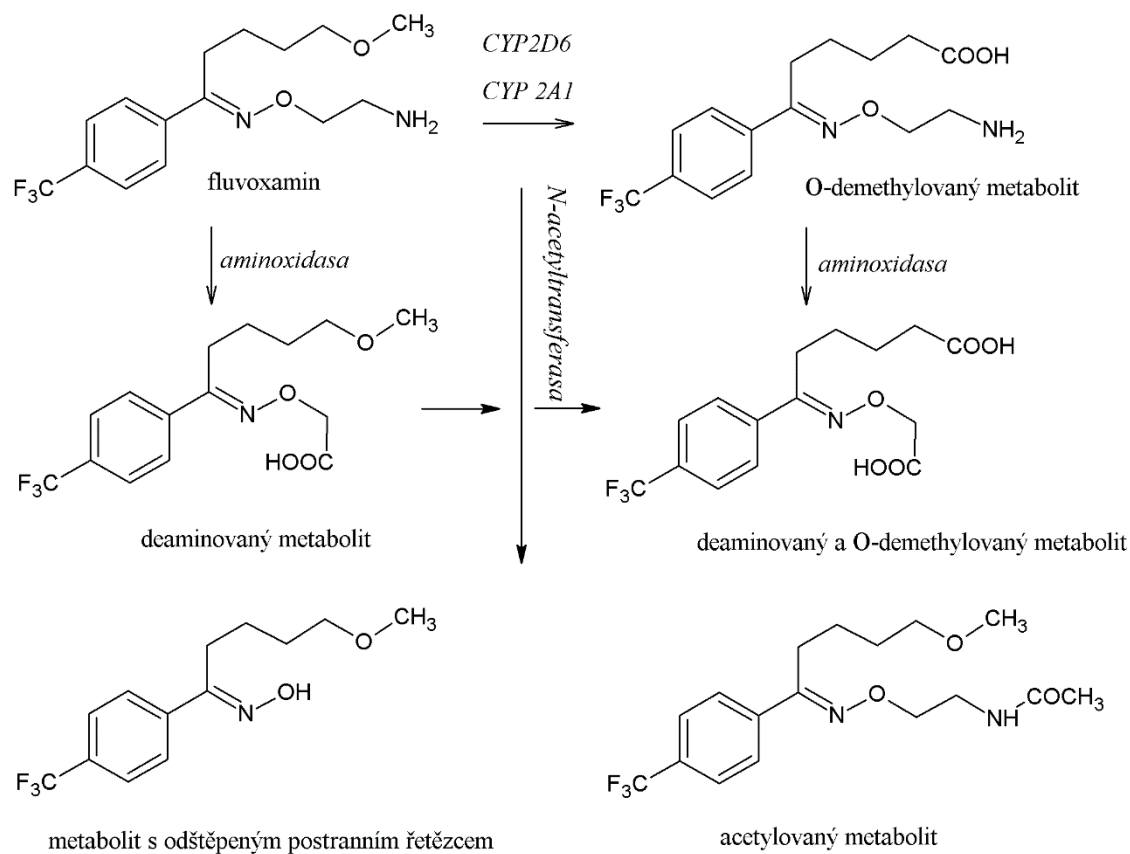
1.1.4.3 Farmakokinetika

Při orálním podání je více než 90 % látky vstřebáno gastrointestinálním traktem. Na vstřebávání, potrava již požitá, nebo požívaná současně, nemá vliv. Distribuční objem je 25 l/kg. Vazba na plazmatické bílkoviny je ze 77 %. [27; 28]

Fluvoxamin podléhá přeměně v játrech, tzv. first-pass efektu, v důsledku toho se ale do oběhu dostává mnohem menší množství nezměněné formy léčiva. Biologická dostupnost je z tohoto důvodu pouhých 53 %. Metabolity vzniklé demethylací, deaminací, štěpením N-O vazby a N-acetylací jsou z 98 % vylučovány ledvinami. [2; 7; 27]

Fluvoxamin je účinným inhibítozem CYP1A2 a CYP2C19. Během *in vivo* studií byla pozorována taktěž inhibice CYP3A4, CYP2C9 a slabě též i CYP2D6. [27]

K maximální plazmatické koncentraci dochází přibližně po 2–8 hodinách, jedná-li se o potahované tablety, může se doba prodloužit na 4–12 hodin. Biologický poločas je 8–28 hodin. U pacientů s onemocněním jater je metabolismus fluvoxaminu narušený. [7; 27]



Obrázek 9 Produkty biotransformace fluvoxaminu [zdroj: vlastní]

1.1.4.4 Nežádoucí účinky

Vedlejší účinky fluvoxaminu jsou podobné jako u jiných SSRI léčiv, nejčastěji to jsou poruchy nervového systému (nervozita, úzkost, nespavost, somnolence), gastrointestinální poruchy (průjem, zvracení, zácpa, bolest břicha), srdeční poruchy (palpitace, tachykardie) či porucha metabolismu (anorexie). Vzácně je možný výskyt glaukomu, poruchy menstruace, močení (nepřiměřená sekrece antidiuretického hormonu) nebo anorgasmie. [7; 29]

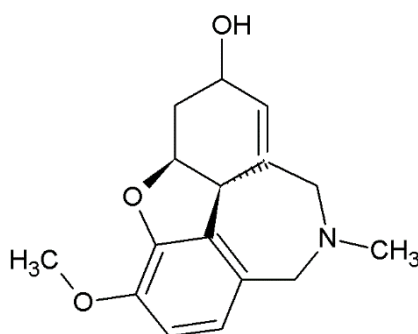
1.1.4.5 Předávkování

Příznaky předávkování jsou především gastrointestinální (zvracení, nauzea, průjem), ale i neurologické jako somnolence a závratě. Zřídka byly hlášeny i srdeční komplikace jako bradykardie, tachykardie či hypotenze. Doposud nejvyšší zaznamenané dávky při předávkování byly často v kombinaci s jinými léky s účelnou toxicací. Nejvyšší zaznamenaná dávka, při které byl pacient zcela zotaven, byla 12 g. Byl zaznamenán i fatální případ, a to při dávce 10 g. Fluvoxamin nemá specifické antidotum. Při předávkování je vhodné vypláchnout žaludek, podávat aktivní uhlí a zahájit případnou symptomatickou léčbu. Terapeutická hladina: 60 – 230 µg/l, toxická hladina: > 500µg/l. [2; 7]

1.1.4.6 Analýza v biologickém materiálu

Tým Shinozuka, Terada a Tanaka provedl v roce 2005 studii zaměřenou na extrakci a analýzu 20 různých antidepresiv v lidské plazmě pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií spolu s ionizací sonickým paprskem (SSI, sonic spray ionization). Vzorky k analýze byly připraveny dávkováním léčiv do lidské plazmy. Extrakce byla provedena SPE kolonkami (Oasis HLB). K analýze byl použit kapalinový chromatograf HITACHI M-8000 LC/3DQMS. Detekce hmotnostním spektrofotometrem proběhla v pozitivním full scan módu. Kvantifikační fragment pro fluvoxamin byl m/z 330 $[M+H]^+$. [30]

1.1.5 Galantamin



Obrázek 10 Galantamin; (4a*S*,6*R*,8a*S*)-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-1-methyl-6*H*-benzofuro[3a,3,2-*e,f*][2]benzazepin-6-ol] [zdroj: vlastní]

Galantamin (Galantamin Mylan, Reminyl) je alkaloid přítomný v cibulkách rostlin *Galanthus woronowii*, neboli sněženky zelené, který se používá k léčbě mírné až středně těžké Alzheimerovy choroby nebo demence s Lewyho tělísky, známé též jako atypická Alzheimerova choroba. [2; 7]

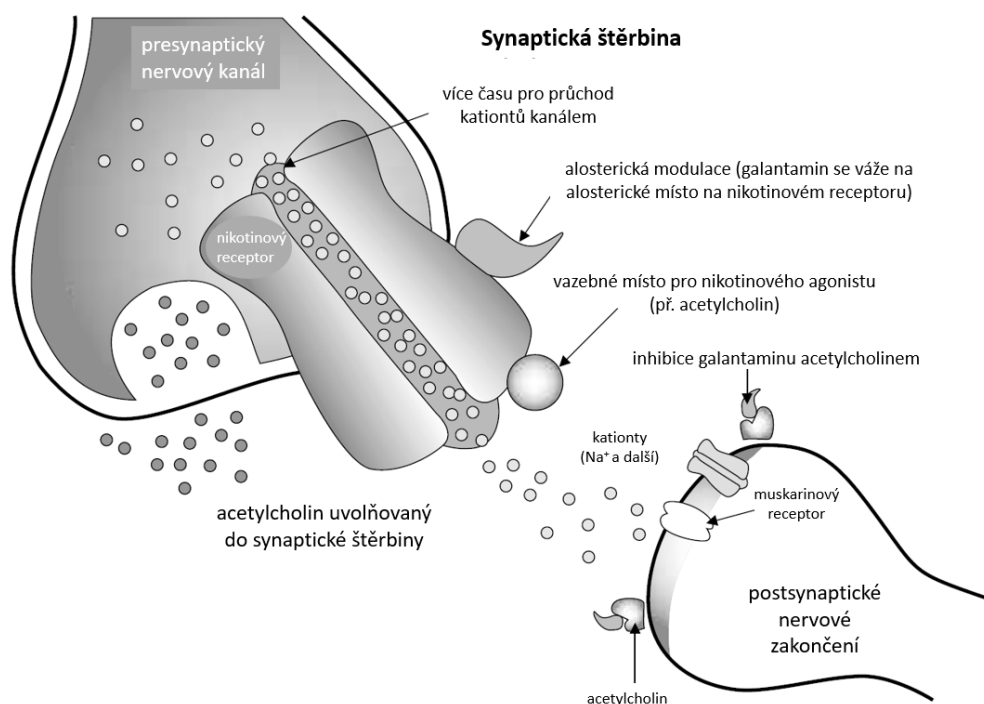
1.1.5.1 Chemické vlastnosti

Galantamin, (4a*S*,6*R*,8a*S*)-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-1-methyl-6*H*-benzofuro [3a,3,2-*e,f*][2]benzazepin-6-ol], je terciární alkaloid. V léčivech se vyskytuje ve formě hydrobromidu, který tvoří bílé krystalky a je rozpustný ve vodě. Další formou je hydrochlorid, který také tvoří bílé krystalky a je rozpustný v teplé vodě. Samotný galantamin je rozpustný v alkoholu, acetonu a chloroformu. [10; 31]

1.1.5.2 Farmakodynamika

Alzheimerova choroba je způsobena atrofií mozkové hmoty v důsledku odumírání neuronů, s nejvýraznějším projevem v mediálním temporálním laloku a hipokampu. V histologickém preparátu jsou pak typickými nálezy senilní plaky (extracelulární ložiska v šedé hmotě mozkové) tvořené beta amyloidem, a neurofibrilární klubka složená z tau

proteinu. Kromě těchto projevů, je v nedostatečné míře vytvářen i neurotransmitter acetylcholin, příčinou je pravděpodobně snížená aktivita enzymu cholinacetyltransferázy. Cholinacetyltransferáza se podílí na tvorbě acetylcholinu z cholinu a acetylkoenzymu A. Vzniklý acetylcholin je uložen ve vezikulách, ze kterých je uvolňován do synaptické štěrby, kde se váže na nikotinové a muskarinové receptory, což způsobuje otevření iontových kanálů a vznik nervového signálu. Acetylcholinesteráza poté hydrolyzuje acetylcholin a vzniklý cholin je transportním proteinem recyklován zpět k reesterifikaci. Inhibice acetylcholinesterázy, kterou galantamin poskytuje, tak zvyšuje postsynaptickou dostupnost acetylcholinu. [1; 32]



Obrázek 11 Mechanismus působení galantaminu (převzato a upraveno z [34])

Dalším mechanismem působení galantaminu je alosterická modulace nikotinových receptorů. Vazba galantaminu na nikotinové receptory způsobuje změnu v jejich konformaci, čímž dochází ke zvýšenému uvolňování nejen acetylcholinu, ale i serotoninu, dopaminu, kyseliny gama-aminomáselné (GABA) a glutaminu. Galantamin vykazuje také neuroprotektivní účinky. [7; 33]

1.1.5.3 Farmakokinetika

Galantamin je absorbován z gastrointestinálního traktu během 2–5 hodin po požití. Biologická dostupnost je 88,5 %. Maximální sérové koncentrace je dosaženo 4,4 hodiny po požití. Distribuční objem činí 127 l/kg. Vazba na plazmatické bílkoviny je z pouhých 18 %. Galantamin je ze 75 % biotransformován v játrech CYP450, konkrétně izoenzymy 2D6 a 3A4.

CYP2D6 zajišťuje N-oxidaci, ale také N- a O-demethylaci. Galantamin podléhá glukuronidaci a konjugaci se sulfátem. Pomalí metabolizéři eliminují 39% dávky v nezměněné formě. Všechny tyto metabolity jsou vyloučeny močí. Biologický poločas je 5–10 hodin. [2; 7; 33]

1.1.5.4 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří poruchy gastrointestinálního traktu, jako jsou nauzea, zvracení, průjem, plynatost, případně i úbytek hmotnosti spojený s anorexií. Velmi často se objevují také bolesti hlavy, somnolence, halucinace, ale i deprese. Inhibitory acetylcholinesterázy mají vagotonický účinek na srdeční frekvenci, může docházet k bradykardii. [7; 34]

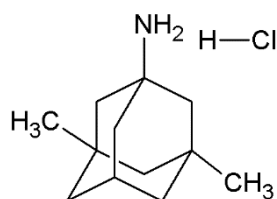
1.1.5.5 Předávkování

Projevy předávkování jsou obdobné jako nežádoucí účinky. Obvykle je postižen centrální nervový systém, parasymptický nervový systém a neuromuskulární přenos, v podobě svalové slabosti, cholinergní krize či fascikulace (samovolné záškuby svalů). Také dochází ke zvracení, pocení, křečím v břišní oblasti, slzení, defekaci až kolapsu. V některých případech může být ohroženo i dýchání. Z případů neúmyslného předávkování galantaminem byl hlášen výskyt torsade de pointes, při požití 32 mg galantaminu. Další případy předávkování při dávkách 32 mg a 40 mg s příznaky nevolnosti, zvracení a bolesti pod sternem. V případě, kdy pacient užíval po dobu 34 dní 2× denně 24 mg došlo k rozvinutí již zaznamenaných halucinací. U dalšího případu předávkování při požití dávky 160 mg došlo u pacienta ke zvracení, bradykardii a následně k mdlobám. Všichni tyto pacienti byli hospitalizováni a příznaky odezněly. Jako antidotum je doporučeno použít anticholinergika (atropin). Terapeutická hladina: 10–40 µg/l; toxická hladina: > 90 µg/l. [2; 7; 34]

1.1.5.6 Analýza v biologickém materiálu

O validaci metody na simultánní stanovení více léčiv proti demenci v plazmě se pokusil tým vědců Noetzli, Choong, Ansermot a Eap v roce 2011. Metodou kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrií stanovovali 4 léčiva a 1 metabolit; donepezil, galantamin, memantin, rivastigmin a metabolit rivastigminu. Kalibrační řada byla připravena dávkováním standardů rozpuštěných v methanolu do lidské plazmy. Extrakce proběhla metodou SPE (Oasis MCX). Analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent Series 1100 a hmotnostním kvadrupólovém spektrometru Agilent Series 110 MSD, který umožňoval ionizaci elektrospřem v pozitivním módu. Detekce probíhala v SIM (selected ion monitoring) módu pro jednomocně nabitě ionty, pro galantamin m/z 288,1 $[M+H]^+$. [35]

1.1.6 Memantin



Obrázek 12 Memantin; 3,5-dimethyldamantan-1-amin [zdroj: vlastní]

Memantin (Cognomem, Ebixa, Memantin Mylan) je účinná látka patřící do skupiny psychoanaleptik, užívaná k léčbě Alzheimerovy, ale i Parkinsonovy nebo Huntingtonovy choroby. V léčivech se vyskytuje ve formě hydrochloridu. [36; 37]

1.1.6.1 Chemické vlastnosti

Memantin, 3,5-dimethyldamantan-1-amin, je derivát 1-aminoadamantanu. V léčích se vyskytuje ve formě hydrochloridu. Je bezbarvý, ale může mít i bělavou voskovitou strukturu. Je rozpustný v chloroformu a dimethylsulfoxidu. [38]

1.1.6.2 Farmakodynamika

Alzheimerova choroba je zapříčiněna nebo smrtí nervových buněk v důsledku excitotoxicity. Excitotoxicita může nastat při nadměrné aktivaci glutamátových receptorů typu NDMA (N-methyl-D-aspartát), což způsobuje nadměrný přítok Ca^{2+} iontů přes iontový kanál asociovaný s receptorem. To má za následek zvýšení intracelulárního Ca^{2+} a následnou produkci volných radikálů, přispívajících k buněčné smrti. Memantin působí v mozku jako nekompetitivní antagonist NDMA receptorů, inhibuje NDMA receptor vazbou přímo na Mg^{2+} iontový kanál nebo v jeho blízkosti. K inhibici dochází u receptorů, které jsou trvale aktivované zvýšenou koncentrací glutamátu. Díky vysoké rychlostní konstantě má memantin minimální vliv na synapticky aktivované NDMA receptor, inhibuje tedy patologickou činnost receptorů, ale dovoluje fyziologickou aktivitu. Zároveň má i neuroprotektivní účinky. Mimoto memantin blokuje serotoninové 5-HT₃ receptory, čímž usnadňuje paměť a učení. [7; 39]

1.1.6.3 Farmakokinetika

Orálně podaná dávka memantinu je rychle a zcela úplně vstřebávána, biologická dostupnost je téměř rovna 100 %. Potrava nemá na absorpci memantinu vliv. Nejvyšší plazmatická koncentrace nastává 3–7 hodin po požití. Vazba na plazmatické bílkoviny je 45 %. Biologický poločas je 60–100 hodin. Distribuční objem je 9–11 l/kg. [7]

Léčivo je vylučováno převážně močí, částečně ale i tubulární sekrecí, v nezměněné, mateřské podobě (asi z 50 %) a jako N-glukuronid vzniklý konjugací s kyselinou

glukuronovou. Zbytek memantinu je přeměněn na polární metabolity; 6-hydroxy-memantin a 1-nitrosodeaminovaný memantin, které mají minimální antagonistickou aktivitu na NDMA receptory. [2; 7]

Studie *in vitro* ukázaly, že memantin nepůsobí žádnou nebo jen minimální inhibici izoenzymů cytochromu P450, jako jsou CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4. [7; 40]

1.1.6.4 Nežádoucí účinky

V klinických studiích pacientů s demencí se vyskytovaly nežádoucí účinky v podobě závratí, bolestí hlavy, zácpy, somnolence a hypertenze. Mezi méně časté patřily mykotické infekce. [7; 37]

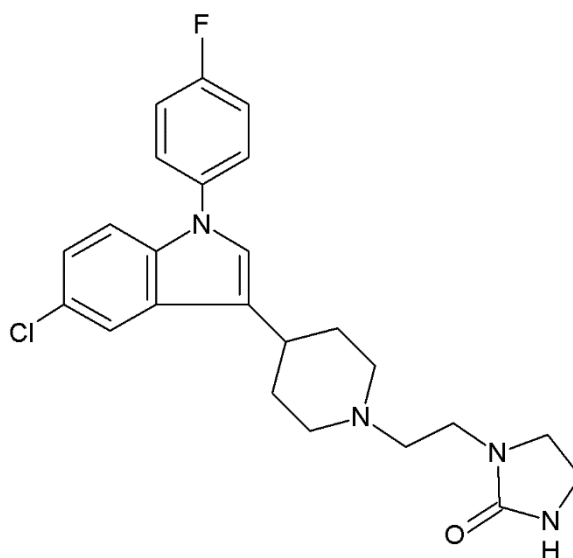
1.1.6.5 Předávkování

Klinické studie a individuální případy předávkování memantinem po jeho uvedení na trh přinesly doposud pouze minimum informací. Při předávkování 140 mg docházelo k ovlivnění CNS (zmatenost, somnolence, agresivita, halucinace) nebo trávicího traktu (zvracení, diarea). Při požití vyšší dávky, 200 mg, byly projevy obdobné, pacient byl unaven, slabý a trpěl trávicími potížemi. Nejvyšší zaznamenaná dávka při předávkování memantinem byla 400 mg a došlo k trávicím potížím a ovlivnění funkce CNS, neklidu, psychóze, zrakovým halucinacím až bezvědomí. Terapeutická hladina: 90–150 µg/l, toxická hladina: >300 µg/l. [7; 12; 37]

1.1.6.6 Analýza v biologickém materiálu

Studie o stanovení memantinu v plazmě pomocí LC-MS/MS byla provedena v roce 2008 vědci Pan, Chian a jeho kolektivem. Kalibrační řada byla připravena rozpuštěním standardů v 50% methanolu a následným nadávkováním do lidské plazmy. Extrakce byla provedena diethyletherem. Analýza proběhla na kapalinovém chromatografu Waters 717 a k detekci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem Quattro Ultima s možností ionizace elektrosprejem (ESI). Detekce byla v pozitivním MRM módu. Pozorovaný přechod memantinu byl m/z 180→107. [41]

1.1.7 Sertindol



Obrázek 13 Sertindol; 1-[2-[4-[5-chloro-1-(4-fluorofenyl)-1H-indol-3-yl]-1-piperidinyl]ethyl]-2-imidazolidinon [zdroj: vlastní]

Sertindol (Serdolect) je antipsychotikum užívané k léčbě schizofrenie. V letech 1998-2005 byl v Evropě zakázán z důvodu možné kardiotoxicity, nyní je ale opět dostupný. [2; 7]

1.1.7.1 Chemické vlastnosti

Sertindol, 1-[2-[4-[5-chloro-1-(4-fluorofenyl)-1H-indol-3-yl]-1-piperidinyl]ethyl]-2-imidazolidinon, je 1H-indol, jenž je substituován na dusíku p-chlorfenylem, na pozici 5 je substituován chlorem, a na pozici 3 je substituován piperidin-4-ylovou skupinou, která má další substituenty na dusíku. Jedná se o bílý jemný prášek rozpustný v methanolu a dimethylsulfoxidu. [10; 42]

1.1.7.2 Farmakodynamika

In vitro studie ukázaly, že sertindol působí jako antagonist dopaminových D_2 , serotoninových $5-HT_{2A}$ i $5-HT_{2C}$ a α_1 -adrenergních receptorů. K α_2 -adrenergním a histaminovým H_1 a H_2 receptorům má ale nízkou afinitu. Kombinovaný antagonismus D_2 a $5-HT_{2A}$ je jedním ze základních mechanismů antipsychotických léčiv. Další farmakologické studie *in vivo* na zvířatech ukázaly, že sertindol spontánně inhibuje dopaminové neurony v mezolimbické ventrální tegmentální oblasti⁷ se 100x vyšší selektivitou než při inhibici dopaminových neuronů v substantia nigra pars compacta⁸. [7; 43]

⁷ Skupina neuronů ve spodní části středního mozku. [65]

⁸ Malá část mozku nacházející se v mezimozku (mesencephalon). [66]

Při užívání sertindolu dochází také k prodlužování QTc intervalu⁹ (korigovaný QT interval) v závislosti na dávce. To je zapříčiněno inhibicí rychlé složky zpožděného usměrňovače draslíku v buněčné membráně myokardu, čímž dochází ke zpomalení propouštění draslíku z buněk a prodlužuje se tak i srdeční repolarizace. [43]

1.1.7.3 Farmakokinetika

Sertindol se při perorálním podání vstřebává přes gastrointestinální trakt a dosahuje maximální plazmatické hladiny přibližně 10 hodin po podání. Na rychlost vstřebávání nemá vliv potrava, ani antacida s obsahem hořčnatých a hlinitých solí. Biologická dostupnost je okolo 80 %. Poměrně snadno proniká přes hematoencefalickou bariéru. Sertindol se váže na plazmatické bílkoviny z 99 %, převážně tvoří vazbu s α_1 -kyselým glykoproteinem a albuminem. Distribuční objem činí 20–40 l/kg. [2; 7; 43]

Sertindol je velké míře metabolizován v játrech isoenzymy CYP2D6 a CYP3A4 na dva hlavní metabolity dehydrosertindol, který vzniká oxidací, a norsertindol, vznikající N-dealkylací. Dehydrosertindol podobný receptorový profil jako původní látka, a tak se může podílet na klinických účincích, zatímco norsertindol má mnohem menší farmakologickou aktivitu. Metabolity jsou primárně vylučovány stolicí, v malé míře (0,3 %) jsou pak vylučovány močí. Vylučování trvá přibližně 2–3 týdny. Biologický poločas je 55–90 hodin. [7; 43; 44]

Farmakokinetické parametry sertindolu nejsou ovlivněny věkem ani pohlavím. Může se ale vyskytovat mírná interindividuální variabilita způsobená polymorfismem CYP2D6. Pomalí metabolizéři mají clearance sertindolu sniženou až o 67 %. Clearance sertindolu může být také snížena u pacientů s mírnou až středně těžkou poruchou jater. U pacientů se středně těžkou poruchou funkce ledvin je clearance stejná jako u zdravých jedinců. [7; 43; 45]

1.1.7.4 Nežádoucí účinky

Během klinických studií byly vyzorovány nežádoucí účinky v podobě posturální hypotenze, závratě, otoky periferních částí končetin, zvýšení tělesné hmotnosti či abnormální ejakulace, kdy byl objem ejakulátu snížen. V ojedinělých případech docházelo i k hyperprolaktinémii, tedy ke zvýšení hladiny prolaktinu. [7; 44]

1.1.7.5 Předávkování

Doposud bylo zaznamenáno pouze pár případů předávkování, některé byly i smrtelné. Nejvyšší detekovaná požitá dávka, při které se pacient zotavil bez následků, byla 840 mg.

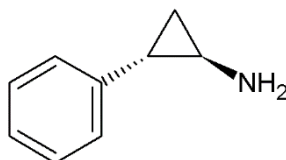
⁹ Při EKG měření, interval se počítá od počátku vlny Q až po konec vlny T. [67]

Symptomy předávkování zpravidla bývají somnolence, tachykardie, hypotenze, přechodné prodloužení QTc intervalu či výskyt torsade de pointes. Dojde-li k předávkování je nutné zajistit dostatečný přísun kyslíku a podporu dýchání. Kvůli možným kardiovaskulárním změnám, je doporučeno sledovat i EKG a vitální funkce. Intravenózně je možné podávat aktivní uhlí a laxativa. Sertindol ale nelze odstranit dialýzou. Při podání sympatomimetik (adrenalin, dopamin) je nutné dbát opatrnosti na možné prohloubení hypotenze, v důsledku stimulace β -receptorů sympatomimetiky v kombinaci s inhibicí α_1 -receptorů způsobenou sertindolem. Terapeutická hladina: 50–100 $\mu\text{g/l}$, toxická hladina: > 200 $\mu\text{g/l}$. [7; 44]

1.1.7.6 Analýza v biologickém materiálu

Vědecký tým Patteet a kol. se zaměřil na stanovení 16 antipsychotik a jejich 8 hlavních metabolitů pomocí UHPLC-MS/MS a mezi stanovovanými léčivy byl i sertindol. Kalibrační řada byla připravena spikováním lidského séra standardy, které byly rozpuštěné v methanolu. Analyty byly extrahovány extrakčním činidlem methyl-terc-butyletherem. Analýza proběhla na chromatografu Agilent 1290 Infinity LC systém, který byl spojen s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem (ESI). Analýza byla provedena na obrácených fázích metodou gradientové eluce. Sledované přechody v MRM módu pro sertindol byly: m/z 441,2 \rightarrow 113,1 a m/z 441,2 \rightarrow 71,2. [46]

1.1.8 Tranlycypromin



Obrázek 14 Tranlycypromin; *trans*-2-fenylcyclopropylamin [zdroj: vlastní]

Tranlycypromin (Parnate, Jatrosom) je strukturální analog návykové látky amfetaminu, který je využíván k léčbě deprese již od roku 1961. Lék je v ČR registrován, ale není dostupný. [2; 7]

1.1.8.1 Chemické vlastnosti

Tranlycypromin, *trans*-2-fenylcyclopropylamin, je propylamin vznikající cyklizací bočního řetězce amfetaminu. Tranlycypromin samotný je kapalina, v léčivech se ale vyskytuje ve formě sulfátu, který má podobu bílého krystalického prášku. Sulfát je rozpustný ve vodě a etheru, nerozpustný v chloroformu. [10; 47]

1.1.8.2 Farmakodynamika

Tranlycypromin patří do skupiny antidepresiv působících jako inhibitory monoaminoxidáz (MAO). Je neselektivní, inhibuje ireversibilně MAO-A i MAO-B¹⁰. Monoaminoxidázy jsou enzymy, vyskytující se na povrchu intracelulárních mitochondrií a odbourávající řadu monoaminů, v tomto případě neurotransmitery jako jsou noradrenalin, serotonin, dopamin či histamin. Tranlycypromin má 2 stereoisomery, (+) je silný inhibitor monoaminoxidáz a (-) ovlivňuje vychytávání a uvolňování monoaminů. Obecně tedy tranlycypromin zvyšuje hladinu serotoninu, dopaminu a noradrenalinu v krvi. [7; 48]

1.1.8.3 Farmakokinetika

Při orálním způsobu podání je tranlycypromin rychle vstřebáván z gastrointestinálního traktu a má krátký biologický poločas, okolo 2,5 hodin. Rychlost vstřebávání se liší dle enantiomerů, je možné pozorovat 2 píky maximální sérové koncentrace, a to za 1 hodinu, druhý za 2–3 hodiny. Tranlycypromin je distribuován do mozku, jater, plic, sleziny, srdce a ledvin. Distribuční objem činí 1,1–5,7 l/kg a není známo, zda se váže na bílkoviny. Během biotransformace v játrech podléhá tranlycypromin N-acetylaci a hydroxylaci. Téměř všechen tranlycypromin je metabolizován, v moči se vyskytují pouze 2 % původního léčiva, zbytek jsou metabolity. Tranlycypromin je mimo jiné neselektivní kompetitivní inhibitor CYP2C19, 2D6, a inhibitor CYP2C9. [2; 7; 48; 49]

1.1.8.4 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří posturální hypotenze, závratě, ospalost či naopak poruchy spánku (nespavost), sucho v ústech, bolest hlavy, průjem, nauzea a zvracení. Vzácně je možný výskyt poškození jater a žloutenky. V kombinaci s potravinami obsahujícími tyramin (zrající sýry, jogurty, sušené, nakládané či fermentované maso, ryby, sójové výrobky) byla pozorována hypertenze, která může být i fatální. Příznaky interakce tyraminu a tranlycyprominu jsou bolest a ztuhlost v krku, bolest pod sternem, pocení, bledost či zarudnutí a fotofobie. Varovným příznakem hypertenzní krize může být i pulsující bolest hlavy. Na tranlycypromin je možné si vytvořit závislost. [7; 50]

1.1.8.5 Předávkování

Příznaky předávkování bývají podobné nežádoucím účinkům, ale jsou zpravidla intenzivnější. Typické projevy jsou nespavost, neklid a úzkost, hypotenze, motání hlavy,

¹⁰ MAO-A odbourává primárně serotonin a noradrenalin, významné pro psychiatrii, MAO-B odbourává dopamin a histamin, využití v neurologii. [7]

extrémní závratě až šok. Kromě hypotenze může nastat i hypertenze doprovázená bolestmi hlavy, vzácně byly pozorovány křeče, záškuby až celková rigidita. Hypertenzní krizi lze řešit betablokátry. Doposud zaznamenané případy předávkování byly i fatální. Žena (26 let) při pravidelném užívání terapeutické dávky byla intoxikována z důvodu požití sýru a vína, což jsou potraviny obsahující tyramin, a zemřela. Další reportované případy předávkování byly u pacientů ve věkovém rozmezí 15–42 let a množství požitých dávek 200–400 mg, ale terapie beta-blokátory, chlorpromazinem nebo hemodialýza, byly úspěšné. Terapeutická hladina: $\leq 50 \mu\text{g/l}$, toxická hladina: $> 100 \mu\text{g/l}$. [7]

1.1.8.6 Analýza v biologickém materiálu

Analýzu tranlycyprominu ve své studii na validaci 88 psychoaktivních látek a jejich metabolitů v krvi metodou kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrií zahrnuje vědkyně Sempio a její kolektiv. Jednalo se o analýzu vzorků *postmortem*. Kalibrační řada byla připravena ze standardů rozpuštěných v methanolu, jenž byly nadávkovány do plné *postmortem* krve. Deproteinizace a extrakce byly provedeny pomocí methanolu. K analýze byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1100-1200 Series s programem gradientové eluce, který byl propojen s hmotnostním spektrometrem 4000 Q-TRAP (AB-SCIEX) s ionizačním zdrojem ESI. Hmotnostní spektrometr pracoval v módu MRM, přechody pro tranlycypromin byly $m/z 134,2 \rightarrow 117,1$ a $m/z 134,2 \rightarrow 91,1$. [51]

Tabulka 1 Přehled farmakologických vlastností léčiv [2; 7]

léčivo	terapeutická hladina [μg/l]	toxická hladina [μg/l]	biologický poločas [h]	biologická dostupnost [%]	distribuční objem [l/kg]	vazba na bílkoviny [%]
asenapin	1–5	> 10	17–31	35	20–30	95–97
disulfiram	50–400	> 500	7,3	75–85	1,3	96
flufenazin	1–10	> 15	5–12	2,7	220	99
fluvoxamin	60–230	> 500	8–28	53	25	77
galantamin	10–40	> 90	5–10	88,5±5,4	127	18
memantin	90–150	> 300	60–100	100	9–11	45
sertindol	50–100	> 200	55–90	80–90	20–40	99
tranylecypromin	≤ 50	> 100	1,5–3,5	50	1,1–5,7	-

Tabulka 2 Přehled chemických vlastností léčiv [10]

léčivo	CAS¹¹	sumární vzorec	molekulová hmotnost	rozpustnost
asenapin	65576-45-6	C ₁₇ H ₁₆ ClNO	285,77	chloroform, methanol
disulfiram	99-77-8	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ S ₄	296,54	aceton, benzen, CS ₂
flufenazin	69-23-8	C ₂₂ H ₂₆ F ₃ N ₃ OS	437,52	ethanol, methanol
fluvoxamin	54739-18-3	C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	318,33	chloroform, methanol, ethanol
galantamin	357-70-0	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,35	horká voda, alkohol, aceton, chloroform
memantin	19982-08-2	C ₁₂ H ₂₁ N	215,76	chloroform, DMSO
sertindol	106516-24-9	C ₂₄ H ₂₆ ClFN ₄ O	440,94	methanol, DMSO
tranylcypromin	155-09-9	C ₉ H ₁₁ N	133,19	voda, ether

¹¹ Chemical Abstract Service Registry Number, identifikační číslo, pod nímž jsou chemické látky registrovány.

1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační technika založená na rovnovážném dělení složek mezi dvěma fázemi, mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Mobilní fázi u kapalinové chromatografie bývá kapalina, stacionární fázi může být pevná látka, ale i kapalina nanesená na tuhých částicích sorbentu, jenž je umístěn v koloně anebo rozprostřen plošně ve vrstvě. Rychlost separace závisí na afinitě ke stacionární fázi, látky s větší afinitou ke stacionární fázi prochází chromatografickým ložem pomaleji než látky, které jsou méně zadržované. [52; 53]

Kapalinovou chromatografii lze tedy dělit dle technického uspořádání na chromatografii plošnou (planární) a kolonovou (sloupcová). Plošná chromatografie má využití pro orientační preparativní analýzu, která je, díky možnosti paralelní analýzy mnoha vzorků najednou a poměrně velké rychlosti, využívána i v dnešních analytických laboratořích. Pro výzkumné, ale i pro toxikologické potřeby, kdy je nutná vysoce přesná kvantitativní analýza, se dnes již využívá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC). [52]

1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Ačkoliv klasická kolonová kapalinová chromatografie byla objevena na počátku 20. století, k její modernizaci a zlepšení účinnosti separace došlo až koncem šedesátých let. Vysoké účinnosti a rychlosti u této metody bylo dosaženo použitím náplňových kolon s jemnými částicemi a vyšších průtoků mobilní fáze s pomocí vysokotlakých čerpadel. Automatizace a větší spolehlivost byla zajištěna i připojením integrátorů a vyhodnocovacích počítačových zařízení. K velkému rozvoji došlo i na poli detektorů, které již umožnily přímou identifikaci rozdělených složek, pomocí nových spektrofotometrických metod. [52]

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se využívá metody izokratické nebo gradientové eluce. Izokratická eluce má po celou dobu analýzy konstantní složení mobilní fáze. Gradientová eluce své složení v průběhu analýzy lineárně či nelineárně mění, čímž dochází ke změně eluční síly a selektivity mobilní fáze. [52; 53]

Kapalinovou chromatografii můžeme rozlišovat na základě fázových systémů, a to na chromatografii v systémech s normálními fázemi (NP LC), obrácenými fázemi (RP LC). [52]

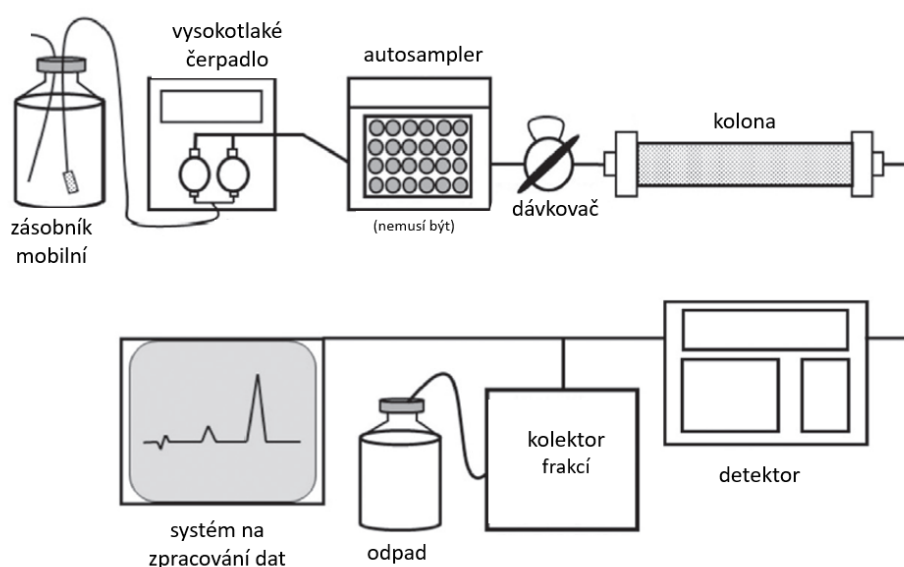
U vysokoúčinné kapalinové chromatografie s normálními fázemi je stacionární fáze polární a mobilní méně polární než stacionární. Stacionární fáze může být tvořena

anorganickým polárním adsorbentem (silikagel, oxid hlinitý) nebo polárními fázemi chemicky vázanými na povrch adsorbentu (aminové, diolové, nitrilové skupiny). Adsorpce na polárních centrech narůstá se specifickým povrchem polárních anorganických adsorbentů. Retence může být ovlivněna volbou mobilní fáze, která může být dvousložková, ale méně polárnější než fáze stacionární (př. propanol a n-hexan). Za přítomnosti vody jsou adsorpční centra deaktivována a retence klesá, naopak při použití vysušených rozpouštědel retence roste. Separace na normálních fázích se využívá pro látky středně a málo polární. [53]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi využívá nepolární stacionární fáze, které jsou tvořeny nepolárními skupinami vázanými na silikagelu (např. oktadecylové, oktylové). Retence látek se zvyšuje například s rostoucím obsahem uhlíku. Mobilní fáze se skládá většinou z vody a dalších polárních rozpouštědel, nejčastěji methanolu a acetonitrilu. Eluce látek je zrychlena s klesající polaritou a rostoucí koncentrací mobilní fáze, organického rozpouštědla. [52]

1.2.1.1 Instrumentace v HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je eluční technika. Čerpadlo dávkuje mobilní fázi při stálém či gradientovém průtoku kolonou. K rychlému a silnému průtoku mobilní fáze je potřeba pracovat za vysokého tlaku. Vzorek je dávkován přímo do protékající mobilní fáze na vstupu do kolony. Eluent z kolony putuje do detektoru, který podává signál úměrný koncentraci nebo hmotnosti separovaných látek. Signál je poté zpracován počítačem s příslušným softwarem. [53]



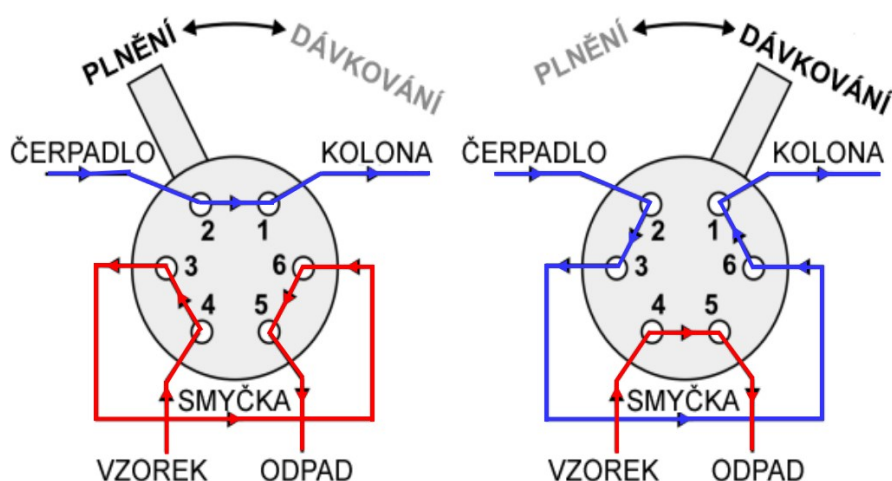
Obrázek 15 Schéma kapalinového chromatografu (převzato a upraveno z [55])

1.2.1.1.1 Čerpadla

Čerpadla mobilní fáze zajišťují přenos mobilní fáze za vysokého tlaku, u HPLC při 40 MPa. Jsou konstruovány z materiálů odolných vůči korozi i při použití agresivních mobilních fází (slabě kyselé nebo bazické roztoky, rozpouštědla), jako jsou nerezová ocel nebo titan. Průtok mobilní fáze závisí na typu separace, množství separovaného vzorku, rozměru kolony a detektoru. Čerpadla mohou být pneumatická, pracující za konstantního tlaku, nebo pístová, pracující s konstantním objemovým průtokem mobilní fáze. Pístová čerpadla konstrukčně vychází z principu injekční stříkačky, jež je spojená se zásobníkem mobilní fáze a s vysokotlakou částí přístroje přes ventily, které se střídavě otevírají a zavírají pohybem pístu vpřed a zpět. Většina čerpadel pracuje se 2 komorami s písty, zatímco v jedné komoře dochází k nasávání mobilní fáze, v druhé je mobilní fáze vytlačována na kolonu. [52; 53]

1.2.1.1.2 Dávkování

Dávkování vzorku na kolonu musí být přesné a bez chyb tak, aby nedocházelo k rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. Vzorky jsou na kolonu chromatografu zaváděny dávkovacími ventily se smyčkou tak, že nedochází k přerušení toku mobilní fáze. Smyčkové dávkovače jsou dvoupolohové, viz *Obrázek 16*. Plnění dávkovače může být ruční nebo automatizované, řízené počítačem. U automatizovaného dávkování (pomocí autosampleru) je možno dávkovat řadu vzorků za sebou bez potřeby obsluhy přístroje, což je výhodné pro sériové rutinní analýzy, například v klinických laboratořích. [52; 53]



Obrázek 16 Schéma smyčkového dávkovače (převzato z <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/kapalinova-chromatografie.pdf>, staženo 28. 3. 2023)

U klasické chromatografie je dávkováno 2–10 μl vzorku, při použití kolon s průměrem menším než 1 mm jsou to setiny mikrolitrů vzorku a u kolon o průměru 0,1 – 0,5 mm se jedná o jednotky až desítky nanolitrů. Velmi malé objemy jsou dávkovány mikroventily s vnitřní smyčkou. Vzorky by měly být v rozpouštědlech dokonale rozpuštěny a použité rozpouštědlo by mělo mít stejnou nebo podobnou eluční sílu jako mobilní fáze, aby nedošlo k deformaci píků separovaných látek. [52; 53]

1.2.1.1.3 Kolony

Volba kolon u HPLC je zásadním krokem v přípravě analýzy, protože výsledek je dán kvalitou kolony a její náplní. Jedná se o rovné trubice zhotovené z hladkého materiálu a s leštěným vnitřním povrchem z titanu, nerezové oceli nebo i pevného plastu. Materiál musí být odolný vůči mobilní fázi a pracovnímu tlaku. Kolony jsou plněny částicemi sorbentu nebo nosiči se stacionární fází. Rozměry kolony jsou voleny dle účelu použití. Pro analytické separace jsou užívány kolony o délce 10–25 cm o průměru 3–4,6 mm, s částicemi o velikosti 3 nebo 5 μm . Pro urychlení separace jednodušších látek lze použít kratší kolony (3–6 cm) s malým průměrem částic (3 μm). Kolony s vnitřním průměrem 1–2 mm se nazývají mikrokolony a umožňují analýzu malého množství vzorků s vysokou hmotnostní citlivostí stanovení. [52; 53]

U náplně kolony je třeba, aby částice byly mechanicky i chemicky stabilní, odolávaly vysokým pracovním tlakům a teplotám, nekladly odpor toku mobilní fáze, a vykazovaly vysokou chromatografickou účinnost (n ; počet teoretických pater). Účinnost se zpravidla zvyšuje u částic s malým průměrem a při současném použití vyššího průtoku mobilní fáze. Pórovitost materiálů závisí na velikosti molekul analytu. Běžné organické látky je možné separovat částicemi o velikosti pórů 5–10 nm s menším sférickým povrchem, než mají například částice pro separaci polymerů, o velikosti pórů 15–100 nm. Čím větší molekula, tím menší odpor musí částice klást, pro rychlou separaci lze použít i nepórovité částice. [53]

Vedle částicových náplní lze mít i náplně monolitické. Monolitické kolony jsou tvořeny kontinuálním separačním médiem, který vzniká zesítním polymerní směsi přímo na koloně. Oproti částicovým kolonám umožňují práci při vyšším průtoku mobilní fáze. [53]

1.2.1.1.4 Detektory

Pro HPLC jsou nejčastěji využívány spektrofotometrické detektory pracující v UV-Vis oblasti elektromagnetického záření. Určení koncentrace vychází z Lambert-Beerova zákona, kdy je absorbance látky přímo úměrná koncentraci analytu. Mezi spektrofotometrické detektory

patří UV-Vis a fluorescenční detektory. Další detektory mohou pracovat na elektrochemickém principu, jedná se tedy o amperometrické, vodivostní a coulometrické detektory. Trendem posledních let se stále více stává spojení HPLC-MS, které umožňuje nejen detekci, ale i identifikaci látky. [52; 53]

1.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda využívající převedení molekul na ionty a jejich následné rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) na základě intenzity jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru, detektoru, vakuového systému a zařízení sloužícího pro sběr dat. [53]

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul na ionty. Mezi ionizační techniky patří elektronová ionizace (EI), ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace a fotoionizace za atmosférického tlaku (APCI, APPI), desorpce (ionizace) laserem za účasti matrice (MALDI). Dále se využívají i iontové zdroje umožňující přímou analýzu vzorku, jako například desorpční elektrosprej (DESI) nebo metoda DART (Direct Analysis in Real Time). [53]

Analyzátoři využívají k rozdělení iontů dle poměru hmotnosti a náboje m/z základní fyzikální principy. Zaznamenávají vychýlení trajektorie v elektrickém nebo magnetickém poli, oscilaci v elektrickém poli, jež je vytvářeno kombinací stejnosměrného a střídavého napětí, dobu letu a absorpci energie při cyklickém pohybu v elektrickém nebo magnetickém poli. [52]

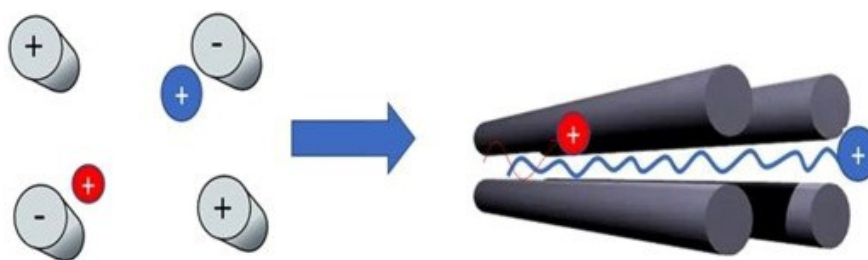
Detekce v hmotnostní spektrometrii využívá tvorby měřitelného elektrického signálu. Ionty po rozdělení dopadají na detektor iontů a dochází ke generování signálu tvorbou sekundárních iontů nebo indukci proudu. K detekci jsou využívány elektronové násobiče s dynodami, scintilační fotonásobičové detektory nebo Faradayův pohár. [53]

Jednotlivé části hmotnostního spektrometru mohou využívat různých pracovních tlaků, proto je součástí spektrometru i vakuová technika. K získání vysokých hodnot tlaku se využívají rotační olejové, spirálové a membránové pumpy spolu s turbomolekulárními nebo difuzními pumpami. [53; 54]

1.3.1 Kvadrupól

Kvadrupólový analyzátor je tvořen 4 kovovými tyčemi kruhového průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na další dvě tyče působí záporné stejnosměrné napětí, ale zároveň je na všechny 4 tyče superponováno vysokofrekvenční

střídavé napětí. Toto rozložení způsobí, že iont, který je přiveden do středu osy kvadrupólu začne oscilovat. Určitá hodnota poměru stejnosměrného a střídavého napětí (U/V) způsobí, že tyto podmínky jsou vhodné pouze pro danou hodnotu m/z , a tak nám v daný moment osciluje pouze 1 iont, který se dostane i na detektor, zatímco ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou poměru U/V dochází k postupnému propuštění všech iontů na detektor. [54]



Obrázek 17 Kvadrupól [55]

1.3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Princip tandemové hmotností spektrometrie (MS/MS) spočívá v možnosti izolovat vybraný iont (prekurzor) a vyvolat jeho fragmentaci dodáním energie, čímž se získá produkt a je analyzováno jeho spektrum. [55]

V MS/MS se využívají 4 základní experimenty a to: sken produktů (product scan), sken prekurzorů (precursor scan), sken neutrální ztráty (neutral loss scan) a sledování vybraných fragmentací (multiple reaction monitoring, MRM). Při skenu produktů je první analyzátor nastaven na zvolený prekurzor, který je následně fragmentován, a jsou zaznamenány jeho produkty. Při skenu prekurzorů je druhý analyzátor nastaven na zvolený produkt fragmentace a první analyzátor je ve full scan módu a vyhledá prekurzor. V případě skenu neutrálních ztrát zaznamenávají oba analyzátory, ale s konstantním rozdílem a umožňují tak nalézt nastavenou neutrální ztrátu hmotnosti. Nejcitlivější je zřejmě mód MRM, kdy jsou oba analyzátory nastaveny na určitý prekurzor a produkt. [55]

1.3.2.1 Trojitý kvadrupól

Příkladem tandemového spektrometru je využití řazení 3 kvadrupólů za sebou, tedy trojitý kvadrupól (QqQ, QQQ). První kvadrupól slouží k výběru prekurzoru, tedy iontu, který bude analyzován, prostřední kvadrupól poté slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem, čím způsobuje excitaci vybraných iontů z prvního kvadrupólu a jejich následnou fragmentaci. Fragmety jsou poté analyzovány ve třetím kvadrupólu. [53; 54]

1.3.2.2 Q-TOF

Další variantou tandemové spektrometrie je spojení principu trojitého kvadrupólu, kde je ale třetí kvadrupól nahrazen analyzátozem doby letu (Time of Flight, TOF), tzv. Q-TOF. První kvadrupól vybírá určitý prekurzor, druhý jej fragmentuje a následně jsou ionty pulsní elektrodou vystřelovány kolmo do průletového analyzátoru. Tento způsob analýzy poskytuje vyšší rozlišení.

Své využití nachází tandemová hmotnostní spektrometrie v metabolomice, proteomice, farmaceutickém průmyslu, ale i v toxikologii a kriminalistice. [53; 54]

1.4 Validace

Dříve než je metoda rutinně zavedena, je nutné provést kontrolu, zda je metoda vhodná pro podmínky, za kterých má být používána a zda jsou výkonnostní charakteristiky pochopeny. Vývoj a validace nových analytických metod je v klinické a forenzní toxikologii nesmírně důležitý. Správné analytické výsledky jsou předpokladem pro správnou interpretaci nálezů ve vzorku jak při každodenní rutinní analýze, tak vědeckém výzkumu. Validace metody souvisí také s řízením kvality laboratoře. U validace kvantitativních analytických postupů se zpravidla vyhodnocuje selektivita, linearita, limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ), správnost a rozptyl opakovaných výsledků (preciznost, reprodukovatelnost, opakovatelnost). [56]

1.4.1 Selektivita

Selektivita je schopnost měřicího systému určit přesně a správně daný analyt v přítomnosti interferujících látek. Selektivita je kontrolována analýzou tzv. blanku, tedy slepého vzorku, který neobsahuje žádný analyt. Může být také testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí. Interference matrice se projevuje tak, že signál neodpovídá analytu, ale je superponován o signál rušivé složky. [56; 57; 58; 59]

1.4.2 Linearita

Kalibrační model tvoří závislost analytického signálu na koncentraci analytu. Přímka, která tuto závislost tvoří, se nazývá kalibrační. Kalibrační přímka je zpravidla přímka určená rovnicí $y = ax + b$, kde y je analytický signál a x je proměnná koncentrace. Přímka nám také udává korelační koeficient R , který by se měl limitovat k číslu 1. [57]

1.4.3 Limit detekce (LOD)

Limit detekce (limit of determination, LOD) je nejnižší možná koncentrace, která vyvolá odezvu měřicího systému a nejedná se o šum. [57; 58]

Rovnice 1 Výpočet limitu detekce, s je šum základní linie

$$LOD = 3s$$

1.4.4 Limit kvantifikace (LOQ)

Limit kvantifikace (limit of quantification, LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze kvantitativně stanovit s přijatelnou úrovní nejistoty a může být tak nastavena i jako dolní mez pracovního rozsahu metody. Typicky se jedná o nejnižší bod kalibrační řady, který vyhovuje validaci. [57; 58; 60]

Rovnice 2 Výpočet limitu kvantifikace, s je šum základní linie

$$LOQ = 10s$$

1.4.5 Správnost výsledků

Správnost (bias) je definována jako odchylka naměřených výsledků od správné/referenční hodnoty. Vyjadřuje se jako procentuální odchylka a představuje kvantifikaci systematické chyby měření. Tato odchylka by neměla překročit 15 % (20 % pro body v blízkosti LOQ). [57]

Rovnice 3 Výpočet bias [%], \bar{x} je aritmetický průměr získaných dat, x_{ref} je správná/referenční hodnota

$$bias = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100$$

1.4.6 Rozptyl výsledků

Jednou ze základních charakteristik měřicího postupu je rozptyl opakovaných výsledků. Je charakterizován precizností, která představuje těsnost shody mezi naměřenými hodnotami získanými opakovanými měřeními na stejném objektu za specifikovaných podmínek. Preciznost se dá vyjádřit mírami nepřeciznosti, jako je například směrodatná odchylka (σ) nebo relativní směrodatná odchylka (RSD), vyjádřená v procentech. V rámci validační studie se preciznost vyhodnocuje jako jedna ze základních charakteristik měřicího postupu, a to jako vyhodnocení série opakovaných měření. Obecně preciznost závisí na koncentraci analytu a je vhodné ji stanovovat pro několik koncentrací v rozmezí pracovního rozsahu metody. Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření představují hraniční míry preciznosti za specifikovaných podmínek. Mezi těmito mírami se nachází mezilehlá preciznost, která charakterizuje rozptýlení výsledků v jedné laboratoři, za podmínek volnějších, než jsou u opakovatelnosti (např. provádění analýz různými analytiky na odlišných přístrojích). [61]

Rovnice 4 Výpočet směrodatné odchylky z naměřené hodnoty (x_i), aritmetického průměru (\bar{x}) a počtu dat (n).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Rovnice 5 Výpočet relativní směrodatné odchylky RSD [%] ze směrodatné odchylky (σ) a aritmetického průměru hodnot (\bar{x})

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

1.4.6.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost představuje preciznost měření za podmínek opakovatelnosti. Udává míru variability výsledků, jsou-li měření provedena na stejném materiálu jedním analytikem, stejnou metodou a v krátkém časovém intervalu. Zpravidla se očekává, že mezi výsledky budou co nejmenší rozdíly. [60]

1.4.6.2 Reprodukovatelnost metody

Reprodukovatelnost metody představuje preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti měření. Reprodukovatelnost odráží variabilitu výsledků získaných v různých laboratořích a její vyhodnocení vyžaduje mezilaboratorní experiment. [60]

1.4.7 Horwitzova rovnice

V roce 1977 byly na analytické konferenci ve Wisconsinu prezentovány poznatky analytických chemiků o kontrole kvality, přičemž došli k závěru, že odchylka instrumentálních metod je funkcí koncentrace, nikoli analytického systému. Dnes je tato funkce známá jako Horwitzova rovnice. V roce 2006 Horwitz a Albert uvedli, že Horwitzova rovnice je používána jako referenční metoda pro mezilaboratorní přesnost. Dnes ji používají světoznámé organizace jako např. Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) nebo Evropský výbor pro normalizaci (CEN). [62]

Rovnice 6 Horwitzova rovnice dle Jung-Keun Lee, kde c je koncentrace vyjádřená bezrozměrným hmotnostním zlomkem, RSD_R [%] je variační koeficient

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log c)}$$

Tabulka 3 Hodnoty RSD_R při různých koncentracích [62]

koncentrace analytu	RSD_R [%]
10 %	2,8
1 %	4,0
0,1 %	5,7
0,01 %	8,0
1 ppm	16
1 ppb	45
0,1 ppb	64

1.4.7.1 Horwitzův poměr

Horwitzův poměr *HorRat* je poměr RSD vypočtených z hodnot naměřených laboratořemi (RSD_R) a RSD předpovězené z Horwitzovy rovnice ($PRSD_R$). Pro podmínky reprodukovatelnosti by hodnoty neměly být větší než 2. [59; 62]

Rovnice 7 Predikované RSD_R ($PRSD_R$) [%] pro reprodukovatelnost [62]

$$PRSD_R = 2^{(1-0,5 \log c)}$$

Rovnice 8 Horwitzův poměr pro reprodukovatelnost [62]

$$HorRat_R = \frac{RSD_R}{PRSD_R}$$

Pro opakovatelnost se užívá také Horwitzův poměr, ale mírně pozměněný. $HorRat$ (r) je odchylka, která se používá při validačních studiích v jedné laboratoři. Je dána poměrem RSD vypočtené z údajů za podmínek opakovatelnosti (RSD_r), a RSD předpovězené z Horwitzovy rovnice ($PRSD_r$). Pro podmínky opakovatelnosti by hodnoty neměly být větší než 1,3. [62]

Rovnice 9 Predikované RSD_r ($PRSD_r$) [%] pro opakovatelnost [59]

$$PRSD_r = \frac{2}{3} \cdot 2^{(1-0,5 \log c)}$$

Rovnice 10 Horwitzův poměr pro opakovatelnost [62]

$$HorRat (r) = \frac{RSD_r}{\left(\frac{PRSD_r}{2}\right)}$$

Pro parametr mezilehlé preciznosti lze také využít Horwitzova poměru, přičemž interval pro přijetí hodnot není oficiálně tabelován a leží mezi intervaly pro opakovatelnost a reprodukovatelnost. Interval si laboratoř zvolí tak, aby vyhovoval podmínkám metody. [62]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení vybraných psychofarmak, a aplikovat ji na reálné vzorky. Metoda bude využívána i v praxi na Ústavu soudního lékařství ve Fakultní nemocnici v Ostravě.

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Příprava standardů

- methanol (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- destilovaná voda
- čisté sérum
- vnitřní standard propiverin hydrochlorid (Merck, Darmstadt, Německo)
- komerční standard asenapin (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- komerční standard disulfiram (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- komerční standard flufenazin (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- komerční standard fluvoxamin maleát (LGC, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Německo)
- komerční standard galantamin hydrobromid (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- komerční standard memantin hydrochlorid (HPC Standards GmbH, Cunnorsdorf, Německo)
- komerční standard sertindol (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)
- komerční standard tranylcypromin sulfát (LGC GmbH, Luckenwalde, Německo)
- reálné vzorky pacientů

2.2.2 Analýza HPLC-MS

- methanol (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- acetonitril (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)
- mravenčan amonný
- demi voda
- kyselina mravenčí

2.3 Přístrojové vybavení

- centrifuga Hettich EBA 200 (Tuttlingen, Německo)
- kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II

- hmotnostní spektrometr Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS (Santa Clara, California, USA)
- kolona Phenomenex Kinetex; C18 TMS endcapping; 50 × 3 mm; velikost částic 2,6 µm (Torrance, California, USA)

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Příprava zásobních roztoků

Ze standardů daných léčivých látek byly připraveny zásobní roztoky sloužící ke kvalitativní analýze a následné optimalizaci metody. Většina látek byla v pevném skupenství, pouze disulfiram měl již podobu roztoku. Látky byly rozpuštěny v methanolu či kombinaci methanolu a vody. Rozpouštědla byla zvolena na základě informací o jednotlivých lécích. Typ rozpouštědla a výsledná koncentrace je v *Tabulce 4*. Zásobní roztoky byly dále naředěny na koncentraci 0,025 mg/ml, pro asenapin, flufenazin, galantamin a tranlycypromin byly připraveny další zásobní roztoky, o koncentraci 0,2 µg/ml, pro pokrytí nízkých terapeutických hladin.

Tabulka 4 Příprava zásobních roztoků

léčivo	rozpouštědlo	koncentrace [mg/ml]
asenapin	MeOH	1
disulfiram	-	1
flufenazin	MeOH	2
fluvoxamin	voda + MeOH	1
galantamin	voda + MeOH	1
memantin	MeOH	1
sertindol	MeOH	2
tranlycypromin	voda + MeOH	1

2.4.2 Příprava směšného roztoku pro kvalitativní analýzu

Ze všech zásobních roztoků léčiv o koncentraci 0,025 mg/ml bylo do vialky odpipetováno 200 µl do vialky, která byla uzavřena krimpovacími kleštěmi (Obrázek 23).

2.4.3 Příprava kalibrační řady

Kalibrační řada byla připravena pipetováním 1 ml lidského séra a příslušných objemů léčiv o koncentraci 0,025 mg/ml nebo 0,2 µg/ml, viz *Tabulka 5* a *Tabulka 6*. Poté byla provedena deproteinizace. Z jednotlivých zkumavek bylo odpipetováno 200 µl séra, přidáno 2 µl interního standardu propiverinu, 500 µl acetonitrilu a 200 µl vody. Takto připravené

zkumavky byly stočeny po dobu 2 minut na 3500 RPM. Supernatant byl přefiltrován přes stříkačkový filtr (Příloha 1: *Obrázek 24, Obrázek 25*) a převeden do vialek (Příloha 1: *Obrázek 26*). Vialky byly následně uzavřeny krimpovacími kleštěmi (Příloha 1: *Obrázek 23*).

Tabulka 5 Kalibrační řada pro asenapin, flufenazin, galantamin, tranlycypromin

zkumavka č.	V _{sérum} [ml]	V _{léčivo} [μl]	c [μg/l]
1	1	5*	1
2	1	1	25
3	1	2	50
4	1	5	125
5	1	10	250
6	1	20	500

Tabulka 6 Kalibrační řada disulfiram, fluvoxamin, memantin, sertindol,

zkumavka č.	V _{sérum} [ml]	V _{léčivo} [μl]	c [μg/l]
1	1	1	25
2	1	2	50
3	1	5	125
4	1	10	250
5	1	15	375
6	1	20	500

2.4.4 Reálné vzorky

Vzorky pacientů byly upraveny dle výše uvedeného postupu. Bylo odpipetováno 200 μl moči/krve a doplněno 2 μl propiverinu, 200 μl vody a 500 μl acetonitrilu. Následně byly vzorky stočeny po dobu 2 minut na 3500 RPM. Supernatant byl přefiltrován přes stříkačkový filtr a převeden do vialek pro následné měření.

2.4.5 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

K analýze byl použit kapalinový chromatograf s hmotnostní detekcí; Agilent 1290 Infinity II a Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS s iontovým zdrojem ESI Agilent Jet Stream (Santa Clara, United States). Dále byla použita kolona Phenomenex Kinetex C18, o rozměru 50×3 mm a velikostí částic 2,6 μm. Mobilní fáze A: 989 ml demi voda, 10 ml směsi acetonitril + methanol v poměru 1:1, 1 ml kyseliny mravenčí, 126 mg mravenčanu amonného; mobilní fáze B: acetonitril. Separace probíhala na obrácených fázích pomocí gradientové eluce,

* Objem 5 μl ze zásobního roztoku o koncentraci 0,2 μg/ml, další přidávané objemy ze zásobních roztoků o koncentraci 0,025 mg/ml.

viz *Tabulka 7*. Gradient byl již přednastaven z rutinního provozu laboratoře a lehce modifikován na základě dříve zjištěných informací z článků a praxe. Dávkovaný objem vzorku byl 4 μ l. Podmínky separace a analýzy byly upraveny v softwaru Agilent MassHunter, který má funkci MassHunter Source Optimizer. Optimalizována byla hodnota napětí fragmentoru a kolizní energie, ale také byly získány přesnější retenční časy a vybrány kvantifikační ionty jednotlivých léčiv na základě velikosti odezvy (abundance).

Tabulka 7 Gradientová eluce

čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	95	5
1,5	70	30
8	5	95
13	5	95
13,1	95	5
14	95	5

Prvně proběhla kvalitativní analýza, viz *Tabulka 8*. Zde byla hodnota napětí fragmentoru konstantní, 150 V. Dwell, tedy doba, po kterou analyzátor sbírá data konkrétního MRM přechodu, byla 30 ms. Kolizní energie byla přednastavena dle informací z dostupných databází. Pro kvantitativní analýzu byly tyto hodnoty optimalizovány, viz *Tabulka 9*.

2.5 Výsledky a vyhodnocení

2.5.1 Kvalitativní analýza

Během kvalitativní analýzy byly zjištěny fragmentační přechody a retenční časy jednotlivých léčiv. Na základě výsledků kvalitativní analýzy byly upraveny parametry analýzy, výstup viz *Tabulka 8*, a určeny kvantifikační ionty, viz *Tabulka 9*. Interní standard propiverin již byl optimalizován dříve, jelikož se jedná o rutinně používaný standard v této laboratoři.

Tabulka 8 Kvalitativní analýza směšného roztoku léčiv

léčivo	prekurzor	produktový iont	kolizní energie [V]	fragmentor [V]	t _R [min]
asenapin	286,1	166 229 215	34 18 30	150	3,557
disulfiram	297,1	116,1 148 88 60	10 10 20 40	150	6,363
flufenazin	438,2	143 171 70,1	40 20 40	150	4,268
fluvoxamin	319,2	71 41,2 45,2 87,1	12 44 36 8	150	3,767
galantamin	288,2	213,1 198,1 231,1 270,1	20 40 20 10	150	1,798
memantin	180,2	163,1 91,1 107,1 105,1	10 40 20 40	150	2,909
sertindol	141,2	113,1 70,1 71,1	40 40 40	150	4,34
tranylecypromin	134,1	117,1 115,1 91,1	10 20 20	150	2,08

Tabulka 9 Přehled fragmentačních přechodů léčiv, kolizní energie, retenčního času, výstup z MassHunter Source Optimizer

léčivo	prekurzor	produktový iont	kolizní energie [V]	fragmentor [V]	t_R [min]
asenapin	286,1	44,2 165 222,9 171,9	30 60 30 30	138	3,58
disulfiram	297,1	116 88 60,1 147,9 44,2	10 30 54 14 46	66	6,363
flufenazin	438,2	143,1 45,1 171,1 70,1 89	34 60 30 54 34	135	4,27
fluvoxamin	319,2	71,1 41,2 45,2 44,5 200	18 58 46 60 22	99	3,78
galantamin	288,2	212,9 44,2 164,9 168,9	26 34 60 60	114	1,798
memantin	180,21	163,1 107 91 39,2 65,1	18 30 46 94 66	110	2,909
sertindol	141,2	113,1 70,2 71,1	38 60 58	135	4,35
tranylcypromin	134,1	117 91 115 85,9	10 30 22 58	57	2,07

Tabulka 10 Ionty zvolené jako kvantifikační, včetně interního standardu propiverinu

léčivo	kvantifikační iont	t_R [min]
asenapin	44,2	3,58
disulfiram	116,1	6,363
flufenazin	171,1	4,27
fluvoxamin	71,1	3,78
galantamin	212,9	1,798
memantin	163,1	2,909
sertindol	113,1	4,35
tranylcypromin	117	2,07
propiverin	105	4,48

2.5.2 Kalibrace

Bylo měřeno 6 bodů kalibrační křivky, každý bod byl přeměřen šestkrát a vztažen k vnitřnímu standardu. Z naměřených hodnot byla dopočítána reálná koncentrace vzorku pomocí rovnice přímky získané z grafu pro stanovení parametrů opakovatelnosti. Měření bylo v druhém týdnu opakováno na čtyřech koncentračních hladinách (nejnižší a nejvyšší bod kalibrační závislosti a dva body uprostřed) pro stanovení parametrů preciznosti.

2.5.3 Validační parametry

V rámci validace byly hodnoceny následující parametry: linearita, rozsah kalibrace, LOQ, správnost (bias), opakovatelnost a preciznost. Podmínky pro preciznost byly zvoleny tak, aby se co nejvíce blížily podmínkám pro stanovení reprodukovatelnosti, tzn. opakovaná měření byla provedena po týdnu na stejném přístroji. Mezilaboratorní test nebylo možné provést.

2.5.4 Vyhodnocení

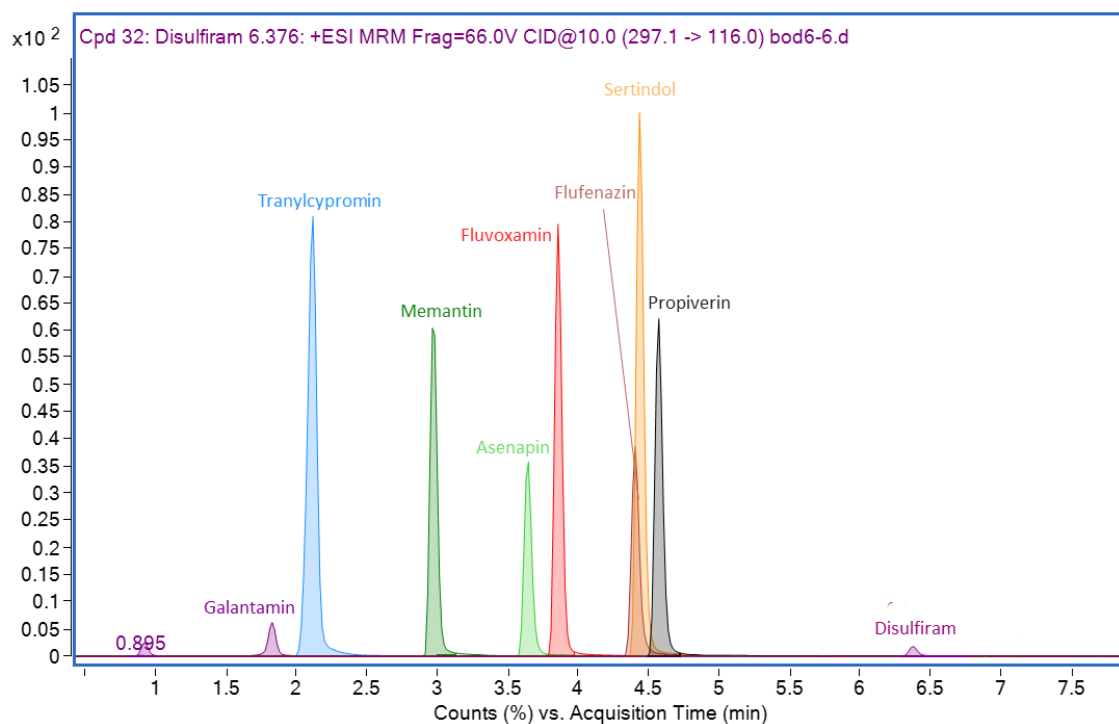
Získaná data byla zpracována v programu Excel (viz Příloha 2: Naměřená data, výpočty). *Tabulka 11* shrnuje základní parametry validovaných metod. Odchylka naměřených dat od teoretické hodnoty (bias) je ve všech případech menší než 15 %. Míra variability výsledků, vyjádřena jako hodnota HorRat, byla pro všechny látky ve zvolených koncentracích menší než 1,3 (viz výpočty v Příloze 2). Parametr opakovatelnosti byl tedy splněn. Hodnoty parametru preciznosti při opakovaném měření v dalším týdnu jsou u všech látek také vyhovující. Pro tento parametr byly hodnoceny 4 body kalibrační přímky; pro asenapin, flufenazin, galantamin a tranylcypromin: 1; 50; 125 a 500 µg/l, pro další léky 25; 125; 250 a 500 µg/l. Metoda je validována pro asenapin, flufenazin, galantamin a tranylcypromin v rozsahu koncentrací 1–500 µg/l, limit kvantifikace je roven prvnímu bodu kalibrační přímky,

LOQ=1 µg/l. Pro disulfiram, fluvoxamin, memantin a sertindol je metoda validována v rozsahu koncentrací 25–500 µg/l, limit kvantifikace pro tato léčiva je roven prvnímu bodu kalibrační přímky, LOQ=25 µg/l.

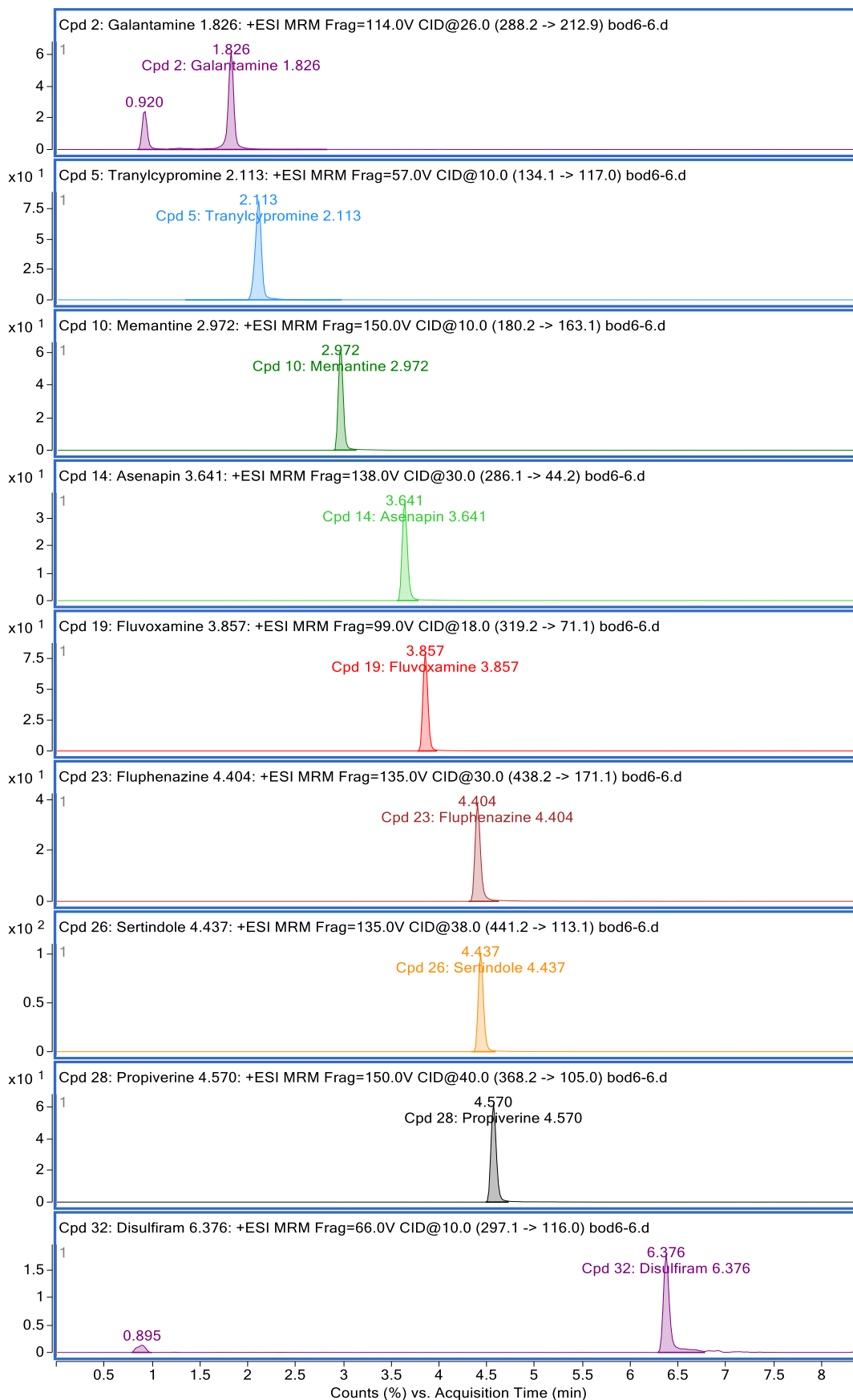
Tabulka 11 Souhrn validovaných parametrů

léčivo	kvantifikační iont	kolizní energie [V]	kalibrační rovnice	rozsah kalibrace [µg/l]	LOQ [µg/l]
asenapin	44,2	30	$y = 0,0034 + 0,0011x$	1–500	1
disulfiram	116,1	10	$y = 4 \cdot 10^{-5}x - 0,0011$	25–500	25
flufenazin	171,1	34	$y = 0,0017x - 0,0016$	1–500	1
fluvoxamin	71,1	18	$y = 0,0059x - 0,1549$	25–500	25
galantamin	212,9	26	$y = 0,009x - 0,0009$	1–500	1
memantin	163,1	18	$y = 0,006x - 0,0029$	25–500	25
sertindol	113,1	38	$y = 0,004x - 0,0895$	25–500	25
tranylcypromin	117,0	30	$y = 0,0075x - 0,0004$	1–500	1

Výstupy měření v podobě chromatogramů pro jednotlivé kvantifikační ionty jsou graficky znázorněny na *Obrázcích 18 a 19*.



Obrázek 18 Souhrnný chromatogram léčiv a vnitřního standardu propiverinu [zdroj:vlastní]



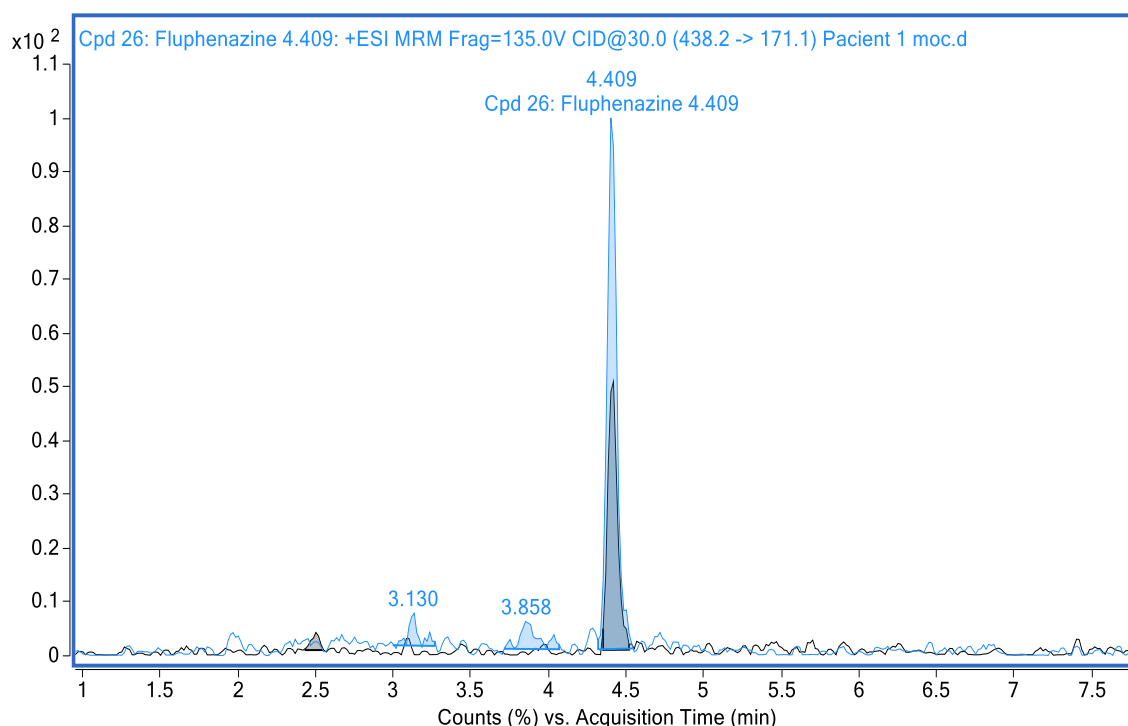
Obrázek 19 Chromatogramy zvolených kvantifikačních iontů [zdroj: vlastní]

2.5.5 Reálné vzorky

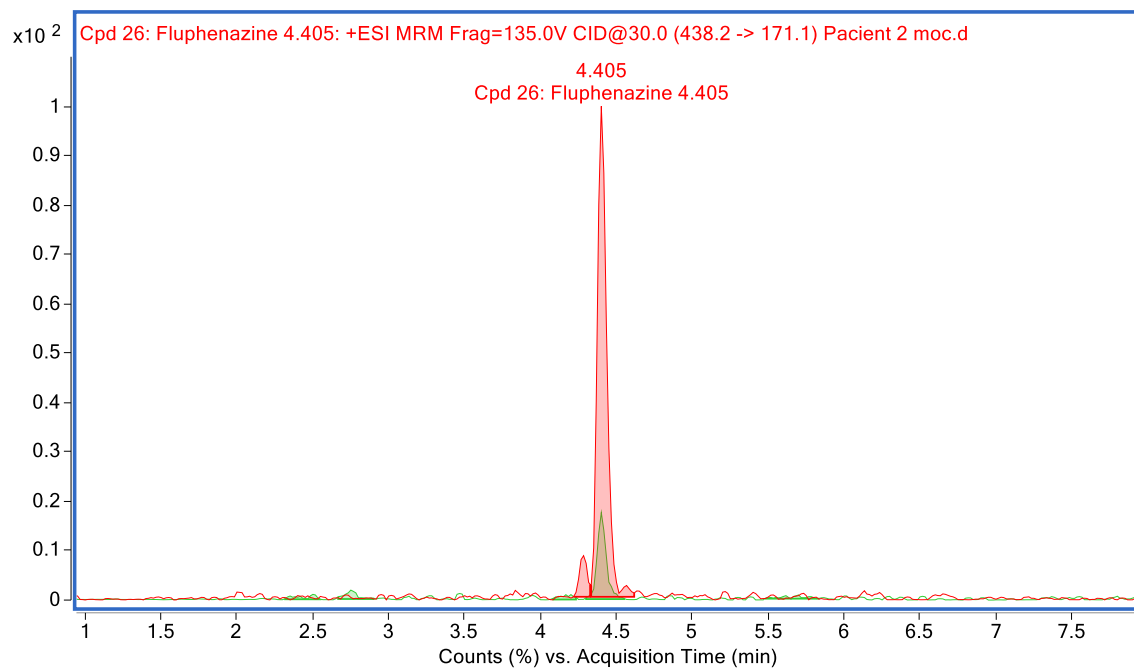
Ústavu soudního lékařství se podařilo získat vzorky moči a krve dvou pacientů, kteří z výše uvedených léků užívali lék Afluditen, obsahující léčivou látku flufenazin. Vzorky byly zpracovány podle výše uvedených postupů a byla provedena analýza. Každý vzorek byl měřen třikrát. Koncentrace flufenazinu byly vypočítány z rovnice validované kalibrace. U prvního pacienta bylo v krvi přítomno průměrně 1,61 $\mu\text{g/l}$ flufenazinu, v moči 2,02 $\mu\text{g/l}$. Druhý pacient měl v krvi průměrně 1,38 $\mu\text{g/l}$ flufenazinu, v moči 2,85 $\mu\text{g/l}$. Všechny hodnoty spadají do terapeutického rozmezí 1–10 $\mu\text{g/l}$. Ilustrační chromatogramy z analýz jednotlivých vzorků jsou na *Obrázku 20* a *Obrázku 21*.

Tabulka 12 Vzorky pacientů

	materiál	c [$\mu\text{g/l}$]			průměr c [$\mu\text{g/l}$]
		M1	M2	M3	
pacient 1	krv	1,57	1,66	1,60	1,61
	moč	1,98	2,07	2,01	2,02
pacient 2	krv	1,31	1,48	1,36	1,38
	moč	2,79	3,06	2,69	2,85



Obrázek 20 Chromatogram pacienta 1, biologický materiál moč [zdroj: vlastní]



Obrázek 21 Chromatogram pacienta 2, biologický materiál moč [zdroj: vlastní]

3 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyvinout a validovat metodu pro kvantifikaci vybraných psychofarmak v biologickém materiálu a aplikovat ji na reálný vzorek. Bylo vybráno 8 léčiv, a to asenapin, disulfiram, flufenazin, fluvoxamin, galantamin, memantin, sertindol a tranylcypromin, pro které byly vypracována rešerše popisující chemické vlastnosti, mechanismy účinku na organismus, farmakokinetika, možné nežádoucí účinky, příznaky předávkování a možnosti stanovení ve vzorku biologického původu. Dále byla v teoretické části popsána analytická metoda, jež byla použita v experimentální části, a nezbytné parametry validace. V experimentální části byla navržena, optimalizována a validována metoda kapalinové chromatografie s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií se specifickými podmínkami pro každou stanovovanou látku.

Analytická metoda byla validována pomocí kalibrační přímky. Mezi hodnocené parametry validace patřila správnost, opakovatelnost, preciznost a limit kvantifikace (LOQ). Preciznost a opakovatelnost byly hodnoceny dle poměru HorRat. Pro každou látku získána rovnice kalibrace, která slouží pro kvantifikaci reálných vzorků. Validace byla provedena v koncentračním rozsahu 25–500 µg/l pro disulfiram, fluvoxamin, memantin a sertindol. Nejnižší bod kalibrační přímky odpovídá limitu kvantifikace, LOQ=25 µg/l. Pro asenapin, flufenazin, galantamin a tranylcypromin byla metoda validována v rozsahu koncentrací 1 - 500 µg/l a první bod kalibrace odpovídá limitu kvantifikace, LOQ=1 µg/l. Širší koncentrační rozmezí bylo zvoleno z důvodu nízkých hodnot koncentrací terapeutických hladin. Metody jsou validovány pro stanovení terapeutické, ale i toxické hladiny léku.

Metoda byla aplikována na reálné vzorky pacientů, kteří užívali lék Aflutiden, obsahující léčivou látku flufenazin. Koncentrace flufenazinu ve vzorcích krve i moči odpovídaly terapeutické hladině léku.

Práce se uskutečnila na Ústavu soudního lékařství v Ostravě, který se mimo jiné zabývá stanovením léčiv a jiných toxikologicky významných látek v biologickém materiálu.

4 Použitá literatura

- [1] DREHER, Jan. *Psychofarmakoterapie: stručně, jasně, přehledně*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0133-7.
- [2] BASELT, Randall C. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Eleventh edition. Seal Beach, California: Biomedical Publications, 2017, xxxviii, 2371 s. ISBN 978-0-692-77499-1.
- [3] CHWIEDUK, Claudine a Lesley SCOTT. Asenapine. *CNS Drugs*. 2011, **25**(3), 251-267. ISSN 1172-7047. Dostupné z: doi:10.2165/11206700-000000000-00000
- [4] *National Center for Biotechnology Information: ubChem Compound Summary for CID 163091, Asenapine* [online]. 2023 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Asenapine>.
- [5] WEBER, Juliane a Paul MCCORMACK. Asenapine. *CNS Drugs*. 2009, **23**(9), 781-792. ISSN 1172-7047. Dostupné z: doi:10.2165/11200860-000000000-00000
- [6] *SYCREST 10MG: Sublingvální tableta* [online]. [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/UEXFCMJowPPSgIkDniOi4MYJmb4/sycrest-10mg-sublingvalni-tableta>
- [7] MOHR, Pavel, Miloslav KOPEČEK, Martin BRUNOVSKÝ a Tomáš PÁLENÍČEK. *Klinická psychofarmakologie*. 1. Praha: Maxdorf, 2017. Jessenius. ISBN 978-80-7345-546-0.
- [8] BOER, Theo, Erik MEULMAN, Henri MEIJERING, Jaap WIELING, Peter DOGTEROM a Holger LASS. Quantification of asenapine and three metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with automated solid-phase extraction: application to a phase I clinical trial with asenapine in healthy male subjects. *Biomedical Chromatography*. 2012, **26**(2), 156-165. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1640

- [9] DE SOUSA, Avinash. *Disulfiram: Its Use in Alcohol Dependence and Other Disorders* [online]. 1. Springer Singapore, 2019 [cit. 2023-03-07]. ISBN 978-981-32-9876-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9876-7>
- [10] COVERLEY, Clarke a Brian WIDDOP, Eustace COVERLEY CLARKE, Anthony OSSELTON. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3. Pharmaceutical Press, 2004. ISBN 9780853695622.
- [11] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 3117, Disulfiram* [online]. [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Disulfiram>
- [12] SUCHOPÁR, Josef. *Compendium - Léčiva používaná v podmínkách ČR*. 5. vydání. Praha: Panax, 2018. ISBN 978-80-902806-7-0.
- [13] *ANTABUS 400MG Šumivá tableta* [online]. [cit. 2023-03-07]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/JTjhXVixDAIkrN3WcLhD5vIBqzK/antabus-400mg-sumiva-tableta>
- [14] JOHANSSON, B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 1992, **86**(369), 15-26. ISSN 0001-690X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0447.1992.tb03310.x
- [15] JENSEN, J.Chris a Morris FAIMAN. Determination of disulfiram and metabolites from biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1980, **181**(3-4), 407-416. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(00)81143-3
- [16] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie: Díl 3 Látky ovlivňující CNS*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-718-4205-2.
- [17] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 3372, Fluphenazine* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluphenazine>

- [18] *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury: Fluphenazine* [online]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548610/>
- [19] SIRAGUSA, Steven, Karlyle BISTAS a Abdolrea SAADABADI. *Fluphenazine* [online]. In: . Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023 [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459194/>
- [20] *AFLUDITEN 25MG/ML: Injekční roztok* [online]. [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/IWonzdL9bb7ksVC85X3MgVEN4Vq/afluditen-25mg-ml-injekcni-roztok>
- [21] SAAR, Eva, Dimitri GEROSTAMOULOS, Olaf DRUMMER a Jochen BEYER. Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*. 2010, **45**(8), 915-925. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1783
- [22] OMORI, IM, N WATANABE, A NAKAGAWA et al. Efficacy, tolerability and side-effect profile of fluvoxamine for major depression: meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*. 2009, **23**(5), 539-550. ISSN 0269-8811. Dostupné z: doi:10.1177/0269881108089876
- [23] HASHIMOTO, Yaeko, Takuji SUZUKI a Kenji HASHIMOTO. Mechanisms of action of fluvoxamine for COVID-19: a historical review. *Molecular Psychiatry*. 2022, **27**(4), 1898-1907. ISSN 1359-4184. Dostupné z: doi:10.1038/s41380-021-01432-3
- [24] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 5324346, Fluvoxamine* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluvoxamine>
- [25] RABOCH, Jiří, Roman JIRÁK a Ivo PACLT. *Psychofarmakologie pro praxi*. 2. vyd. V Praze: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-041-6.
- [26] BENFIELD, Paul a Alan WARD. Fluvoxamine. *Drugs*. 1986, **32**(4), 313-334. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-198632040-00002

- [27] HIEMKE, Christoph a Sebastian HÄRTTER. *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. 2000, **85**(1), 11-28. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/S0163-7258(99)00048-0
- [28] PERUCCA, Emilio, Giuliana GATTI a Edoardo SPINA. Clinical Pharmacokinetics of Fluvoxamine. *Clinical Pharmacokinetics*. 1994, **27**(3), 175-190. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-199427030-00002
- [29] *FEVARIN 50MG Potahovaná tableta* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/9Q3XjW2OYULttcVjp6NhlMC6jqH/fevarin-50mg-potahovana-tableta>
- [30] SHINOZUKA, Tatsuo, Masaru TERADA a Einosuke TANAKA. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Science International*. 2006, **162**(1-3), 108-112. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2006.03.038
- [31] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 9651, Galantamine* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galantamine>
- [32] JANSSEN, Bernd a Bernd SCHÄFER. Galantamine. *ChemTexts*. 2017, **3**(2). ISSN 2199-3793. Dostupné z: doi:10.1007/s40828-017-0043-y
- [33] FARLOW, Martin R. Clinical Pharmacokinetics of Galantamine. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003, **42**(15), 1383-1392. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200342150-00005
- [34] *GALANTAMIN MYLAN 8MG Tvrdá tobolka s prodlouženým uvolňováním* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/EY3r9KXjvilSn3D6a6wjbARWsLm/galantamin-mylan-8mg-tvrda-tobolka-s-prodlouzenym-uvolnovanim>
- [35] NOETZLI, Muriel, Eva CHOONG, Nicolas ANSERMOT a Chin EAP. Simultaneous Determination of Antidementia Drugs in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2011, **33**(2), 227-238. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0b013e31821126cf

- [36] JOHNSON, J a S KOTERMANSKI. Mechanism of action of memantine. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006, **6**(1), 61-67. ISSN 14714892. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2005.09.007
- [37] *EBIXA 10MG Potahovaná tableta* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/7iVyPydtstd1V6CKKxT2IR2fb2d/ebixa-10mg-potahovana-tableta>
- [38] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 181458, Memantine hydrochloride* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Memantine-hydrochloride>
- [39] LIPTON, Stuart. Pathologically-Activated Therapeutics for Neuroprotection: Mechanism of NMDA Receptor Block by Memantine and S-Nitrosylation. *Current Drug Targets*. 2007, **8**(5), 621-632. ISSN 13894501. Dostupné z: doi:10.2174/138945007780618472
- [40] PERICLOU, A, D VENTURA, N RAO a W ABRAMOWITZ. Pharmacokinetic study of memantine in healthy and renally impaired subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2006, **79**(1), 134-143. ISSN 00099236. Dostupné z: doi:10.1016/j.clpt.2005.10.005
- [41] PAN, Ryh-Nan, Ting-Yi CHIAN, Benjamin KUO a Li-Heng PAO. Determination of Memantine in Human Plasma by LC–MS–MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*. 2009, **70**(5-6), 783-788. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-009-1231-8
- [42] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 60149, Sertindole* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sertindole>
- [43] SPINA, Edoardo a Rocco ZOCCALI. Sertindole: pharmacological and clinical profile and role in the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008, **4**(5), 629-638. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1517/17425255.4.5.629
- [44] *SERDOLECT 12MG: Potahovaná tableta* [online]. [cit. 2023-03-08]. Dostupné z: <https://mediately.co/cz/drugs/Ld1n9wy9bYGjNl5Mqs0okyTMmtA/serdolect-12mg-potahovana-tableta>

- [45] LINDSTRÖM, Eva a Sten LEVANDER. Sertindole: efficacy and safety in schizophrenia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006, **7**(13), 1825-1834. ISSN 1465-6566. Dostupné z: doi:10.1517/14656566.7.13.1825
- [46] PATTEET, Lisbeth, Kristof MAUDENS, Bernard SABBE, Manuel MORRENS, Mireille DE DONCKER a Hugo NEELS. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2014, **429**, 51-58. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2013.11.024
- [47] *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 19493, Parnate* [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Parnate>.
- [48] FRIELING, Helge a Stefan BLEICH. Tranylcypromine. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2006, **256**(5), 268-273. ISSN 0940-1334. Dostupné z: doi:10.1007/s00406-006-0660-8
- [49] ULRICH, Sven, Roland RICKEN a Mazda ADLI. Tranylcypromine in mind (Part I): Review of pharmacology. *European Neuropsychopharmacology*. 2017, **27**(8), 697-713. ISSN 0924977X. Dostupné z: doi:10.1016/j.euroneuro.2017.05.007
- [50] RICKEN, Roland, Sven ULRICH, Peter SCHLATTMANN a Mazda ADLI. Tranylcypromine in mind (Part II). *European Neuropsychopharmacology*. 2017, **27**(8), 714-731. ISSN 0924977X. Dostupné z: doi:10.1016/j.euroneuro.2017.04.003
- [51] SEMPIO, Cristina, Luca MORINI, Claudia VIGNALI a Angelo GROPPi. Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC–MS/MS: Application on postmortem samples. *Journal of Chromatography B*. 2014, **970**, 1-7. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2014.08.039
- [52] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1.vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.

- [53] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří ŠEVČÍK. *Organická analýza*. 1.vydání. Český Těšín: 2 Theta, 2022. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [54] HOLČAPEK, Michal. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného 5.-7.11. 2001 v Kongresové hale Univerzity Pardubice*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [55] AMORESANO, Angela a Piero PUCCI. Mass spectrometry in metabolomics. *Metabolomics Perspectives*. Elsevier, 2022, 109-147. ISBN 9780323850629. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-85062-9.00004-0
- [56] PETERS, Frank, Olaf DRUMMER a Frank MUSSHOF. Validation of new methods. *Forensic Science International*. 2007, **165**(2-3), 216-224. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.021
- [57] DOUŠA, Michal. Definice: Konfirmace - Kvalifikace - Validace. In: *HPLC; High Performance Liquid Chromatography* [online]. [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#
- [58] *Terminologie* [online]. SEKK spol. s r.o. [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: <http://sekk.cz/terminologie/index.php?akce=terminologie>
- [59] RAO, Tentu Nageswara. Validation of Analytical Methods. *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. InTech, 2018. ISBN 978-1-78923-084-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72087
- [60] BARWICK, ed. *Průvodce kvalitou v analytické chemii: Pomůcka k akreditaci*. Třetí vydání. 2016. ISBN 978-80-86322-10-0.
- [61] SYNEK, V., Z. PLZÁK, ed. Metodický list 15: Odhad směrodatné odchylky preciznosti z duplicitních výsledků. In: *Eurachem-ČR z.s* [online]. Eurachem-ČR [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <http://www.eurachem.cz/wp-content/uploads/2022/07/metodicky-list-15-2018.pdf>
- [62] RIVERA, Carlos a Rosario RODRÍGUEZ. Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory. *Private communication*. 2014.

- [63] AMBLER, Zdeněk. *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]*. 6., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2433-4.
- [64] *Institut klinické a experimentální medicíny: Synkopa* [online]. 2015 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/synkopa/a-450/>
- [65] PHILLIPSON, O. T. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 1979, **187**(1), 117-143. ISSN 0021-9967. Dostupné z: doi:10.1002/cne.901870108
- [66] SMITH, Y. a J.G. MASILAMONI. Substantia Nigra. *Encyclopedia of Movement Disorders*. Elsevier, 2010, 189-192. ISBN 9780123741059. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374105-9.00288-4
- [67] PROKEŠ, Michal a Josef SUCHOPÁR. Prodloužení intervalu QT způsobené léky. *Medicína pro praxi*. Solen, s. r. o., 2014, **14**(1), 36-39. ISSN 1803-5310.
- [68] HIRT, Miroslav, František VOREL a Petr HEJNA. *Velký výkladový slovník soudnělékařské terminologie*. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-247-1979-5.
- [69] DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.

5 PŘÍLOHY

Příloha 1: Příprava zásobních roztoků, aparatura



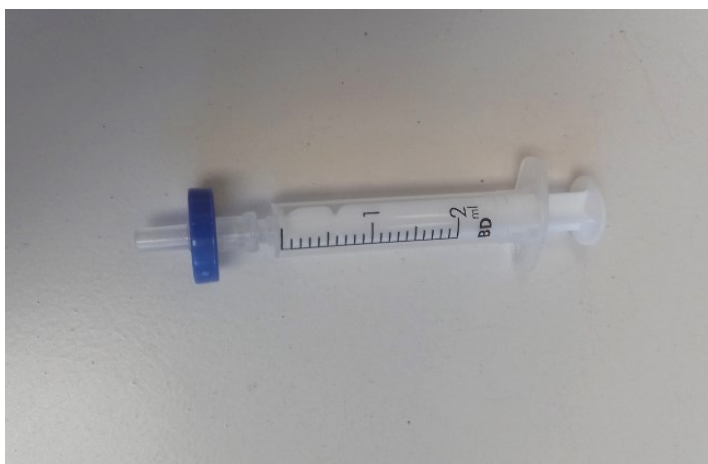
Obrázek 22 Zásobní roztoky [zdroj: vlastní]



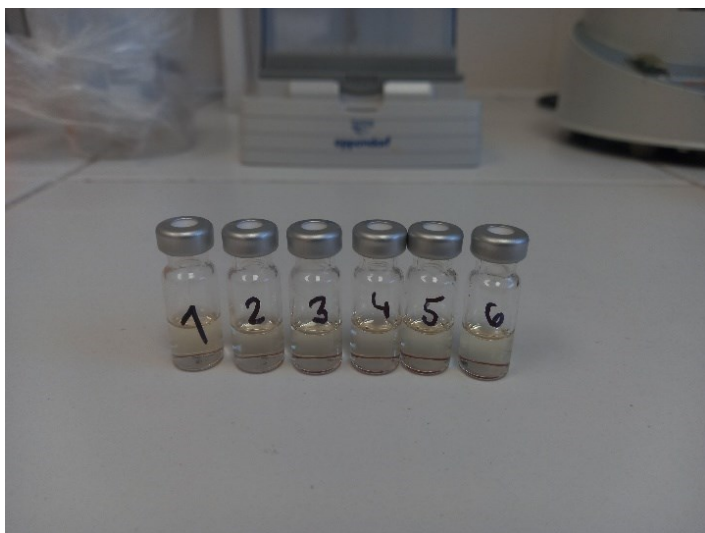
Obrázek 23 Krimpovací kleště, vialka [zdroj: vlastní]



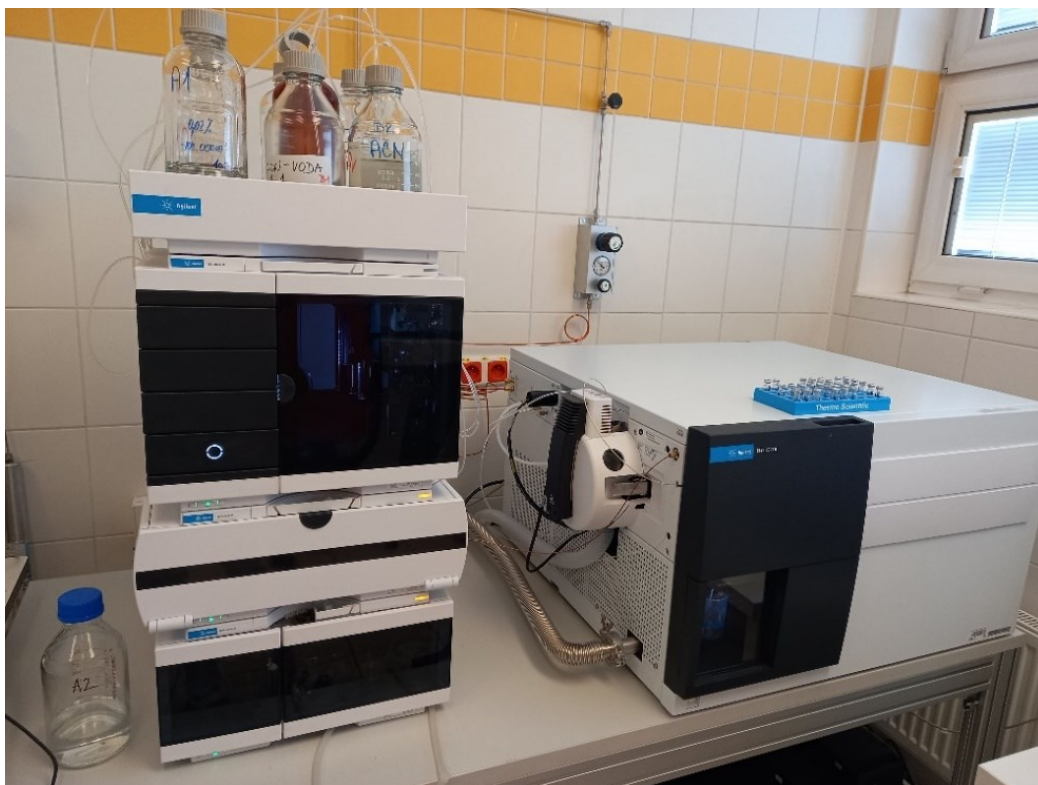
Obrázek 24 Injekční stříkačka [zdroj: vlastní]



Obrázek 25 Injekční stříkačka se stříkačkovým filtrem [zdroj: vlastní]



Obrázek 26 Kalibrační řada ve vialkách [zdroj: vlastní]



Obrázek 27 Kapalinový chromatograf Agilent 1290 II a hmotnostní spektrometr Agilent 6470
[zdroj:vlastní]

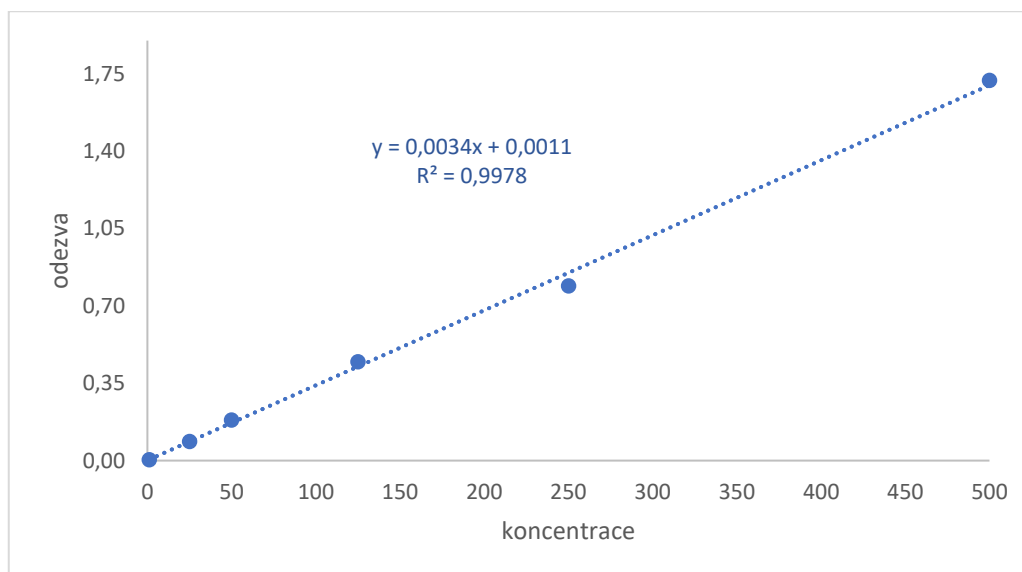
Příloha 2: Naměřená data, výpočty

5.1 Asenapin

Tabulka 13 Výsledky měření pro asenapin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0046	0,0843	0,1861	0,4432	0,8001	1,5898
	0,0045	0,0893	0,1793	0,4431	0,7906	1,6091
	0,0048	0,0869	0,1818	0,4433	0,7865	1,6323
	0,0051	0,0884	0,1850	0,4541	0,7804	1,7525
	0,0048	0,0853	0,1841	0,4512	0,7961	1,8438
	0,0047	0,0853	0,1862	0,4518	0,7906	1,8944
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0041		0,1395	0,4759		1,4773
	0,0037		0,1363	0,4614		1,4810
	0,0039		0,1333	0,4746		1,3960
	0,0034		0,1328	0,4625		1,3589
	0,0039		0,1328	0,4657		1,3699
	0,0037		0,1313	0,4261		1,4340

Graf 1 Kalibrační přímka asenapinu



Tabulka 14 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro asenapin

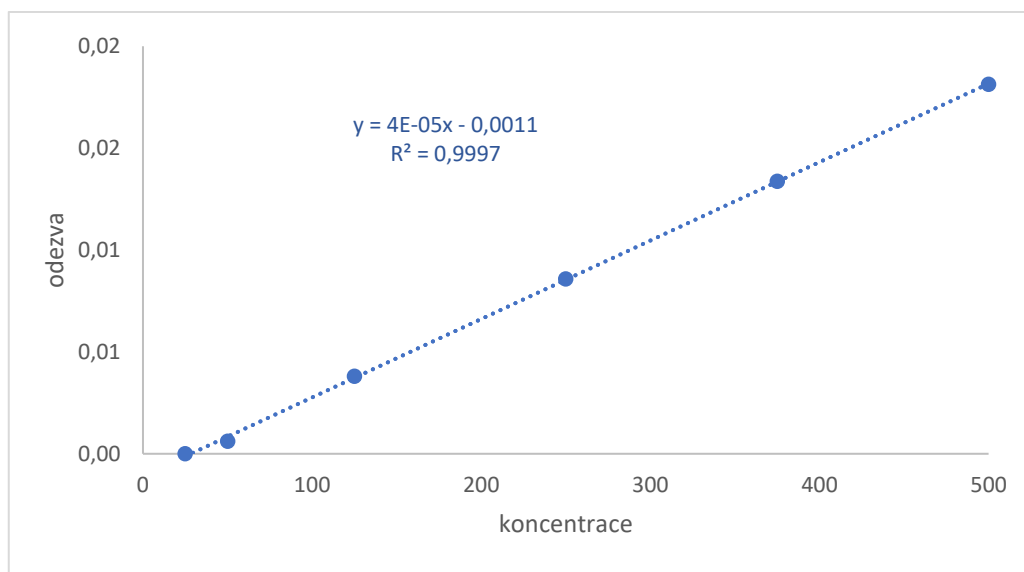
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
1. týden (kalibrace)	1,03	24,53	54,52	130,27	235,45	468,16
	1,00	26,00	52,51	130,26	232,66	473,84
	1,09	25,27	53,25	130,29	231,43	480,68
	1,18	25,73	54,18	133,49	229,62	516,10
	1,08	24,81	53,94	132,64	234,27	542,98
	1,06	24,82	54,53	132,82	232,65	557,91
2. týden (ověření)	0,88		40,78	139,92		435,00
	0,76		39,83	135,65		436,08
	0,82		38,95	139,52		411,03
	0,67		38,80	135,95		400,11
	0,82		38,80	136,90		403,33
	0,76		38,35	125,23		422,22
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	1,07	25,19	53,82	131,63	232,68	506,61
bias [%]	7,22	0,76	7,64	5,30	-6,93	1,32
směrodatná odchylka	0,061	0,578	0,797	1,511	2,053	38,130
RSD _r [%]	5,67	2,29	1,48	1,15	0,88	7,53
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	30,17	18,59	16,74	14,59	13,14	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	0,93		46,54	133,58		462,29
bias [%]	-7,02		-6,93	6,86		-7,54
směrodatná odchylka	0,161		7,651	4,269		53,990
RSD _R [%]	17,37		16,44	3,20		11,68
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	45,25		25,12	21,88		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,38	0,25	0,18	0,16	0,13	1,27
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR, R})	0,38		0,65	0,15		0,66

5.2 Disulfiram

Tabulka 15 Výsledky měření pro disulfiram, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
A_x/A_{ISTD} (1. týden)	6,14E-06	0,0005	0,0038	0,0084	0,0143	0,0174
	5,14E-06	0,0007	0,0040	0,0087	0,0126	0,0182
	3,15E-06	0,0007	0,0038	0,0088	0,0128	0,0172
	4,13E-06	0,0004	0,0039	0,0084	0,0134	0,0184
	4,13E-06	0,0008	0,0036	0,0084	0,0138	0,0185
	5,13E-06	0,0006	0,0036	0,0088	0,0134	0,0191
A_x/A_{ISTD} (2. týden)	1,27E-05		0,0042	0,0101		0,0253
	1,47E-05		0,0037	0,0104		0,0253
	1,46E-05		0,0040	0,0106		0,0250
	1,42E-05		0,0040	0,0115		0,0250
	1,43E-05		0,0040	0,0103		0,0182
	1,23E-05		0,0037	0,0105		0,0192

Graf 2 Kalibrační přímka disulfiramu



Tabulka 16 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro disulfiram

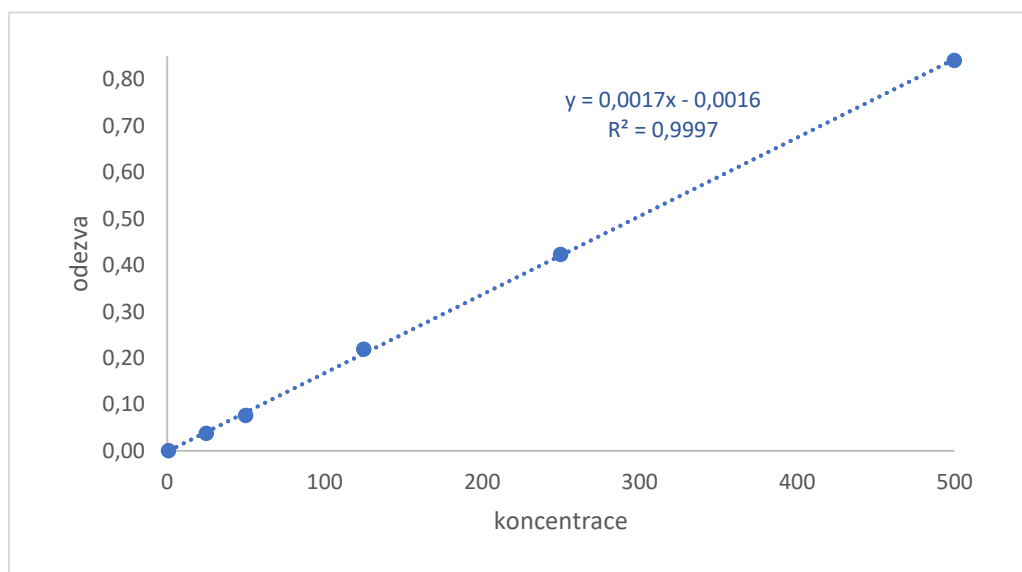
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
1. týden (kalibrace)	28,42	42,39	127,64	246,97	399,07	481,14
	28,39	47,34	131,71	253,58	356,08	500,42
	28,34	46,06	128,13	255,76	359,42	475,44
	28,37	38,41	128,68	246,84	375,27	504,89
	28,37	47,95	122,46	247,17	386,61	509,99
	28,39	43,31	122,52	255,67	375,50	523,33
2. týden (ověření)	28,59		136,28	290,29		686,39
	28,64		124,44	299,12		685,11
	28,64		131,27	303,27		678,30
	28,63		130,91	326,04		677,79
	28,63		132,52	297,00		502,06
	28,58		125,62	300,07		527,86
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	28,38	44,24	126,86	250,99	375,32	499,20
bias [%]	13,51	-11,51	1,49	0,40	0,09	-0,16
směrodatná odchylka	0,027	3,604	3,667	4,457	16,214	18,016
RSD _r [%]	0,10	8,15	2,89	1,78	4,32	3,61
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	18,59	16,74	14,59	13,14	12,36	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	28,50		128,52	276,81		562,73
bias [%]	13,99		2,81	10,73		12,55
směrodatná odchylka	0,13		4,25	28,363		89,24
RSD _R [%]	0,45		3,30	10,25		15,86
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	27,88		21,88	19,71		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,01	0,97	0,40	0,27	0,70	0,61
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR, R})	0,02		0,15	0,52		0,89

5.3 Flufenazin

Tabulka 17 Výsledky měření pro flufenazin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0003	0,0375	0,0819	0,2206	0,4143	0,8452
	0,0004	0,0383	0,0816	0,2237	0,4222	0,8384
	0,0003	0,0382	0,0706	0,2178	0,4237	0,8355
	0,0003	0,0380	0,0818	0,2202	0,4307	0,8336
	0,0003	0,0372	0,0724	0,2202	0,4265	0,8480
	0,0002	0,0378	0,0714	0,2128	0,4213	0,8438
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0002		0,0918	0,2535		0,7890
	0,0003		0,1078	0,2650		0,7885
	0,0004		0,0912	0,2697		0,8908
	0,0002		0,0891	0,2487		0,7894
	0,0003		0,1002	0,2390		0,7899
	0,0004		0,1002	0,2510		0,7869

Graf 3 Kalibrační přímka flufenazinu



Tabulka 18 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro flufenazin

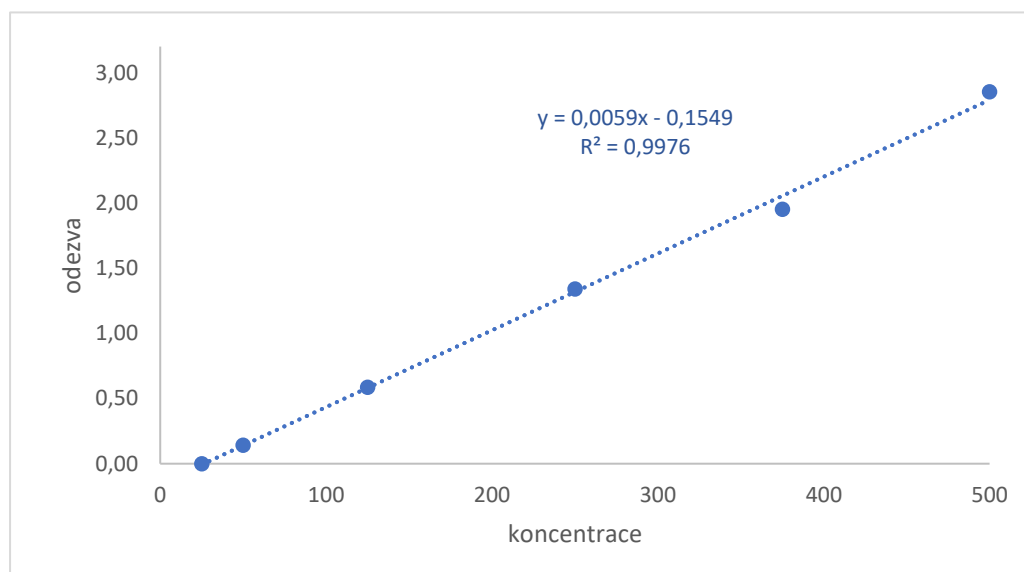
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
1. týden (kalibrace)	1,12	23,08	49,38	131,45	246,07	501,06
	1,17	23,59	49,19	133,26	250,74	497,02
	1,11	23,54	42,71	129,80	251,65	495,30
	1,11	23,40	49,31	131,20	255,75	494,15
	1,11	22,96	43,75	131,24	253,28	502,70
	1,06	23,29	43,17	126,86	250,20	500,22
2. týden (ověření)	1,05		55,23	150,90		467,80
	1,11		64,71	157,72		467,50
	1,17		54,87	160,49		528,01
	1,05		53,65	148,07		468,01
	1,10		60,19	142,31		468,33
	1,17		60,20	149,45		466,58
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	1,11	23,31	46,25	130,64	251,28	498,41
bias [%]	11,13	-6,76	-7,50	4,51	0,51	-0,32
směrodatná odchylka	0,04	0,25	3,35	2,15	3,25	3,42
RSD _r [%]	3,21	1,08	7,24	1,65	1,29	0,69
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	30,17	18,59	16,74	14,59	13,14	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	1,11		52,20	141,06		488,06
bias [%]	10,94		4,39	12,85		-2,39
směrodatná odchylka	0,04		7,206	11,863		19,96
RSD _R [%]	3,91		13,81	8,41		4,09
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	45,25		25,12	21,88		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,21	0,12	0,87	0,23	0,20	0,12
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR,R})	0,09		0,55	0,38		0,23

5.4 Fluvoxamin

Tabulka 19 Výsledky měření pro fluvoxamin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0005	0,1400	0,6426	1,3693	1,9041	2,7557
	0,0005	0,1409	0,6426	1,3625	1,9895	2,7795
	0,0004	0,1443	0,5415	1,3214	1,9728	2,7781
	0,0006	0,1420	0,5427	1,3175	1,9397	2,8152
	0,0005	0,1405	0,6426	1,3389	1,9618	3,0029
	0,0004	0,1404	0,5144	1,3349	1,9462	2,9879
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0226		0,4539	1,2822		2,2905
	0,0201		0,4565	1,2813		2,2896
	0,0217		0,4537	1,2680		2,2796
	0,0217		0,4385	1,2580		2,1957
	0,0228		0,4412	1,2781		2,2696
	0,0219		0,4586	1,2878		2,2944

Graf 4 Kalibrační přímka fluvoxaminu



Tabulka 20 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro fluvoxamin

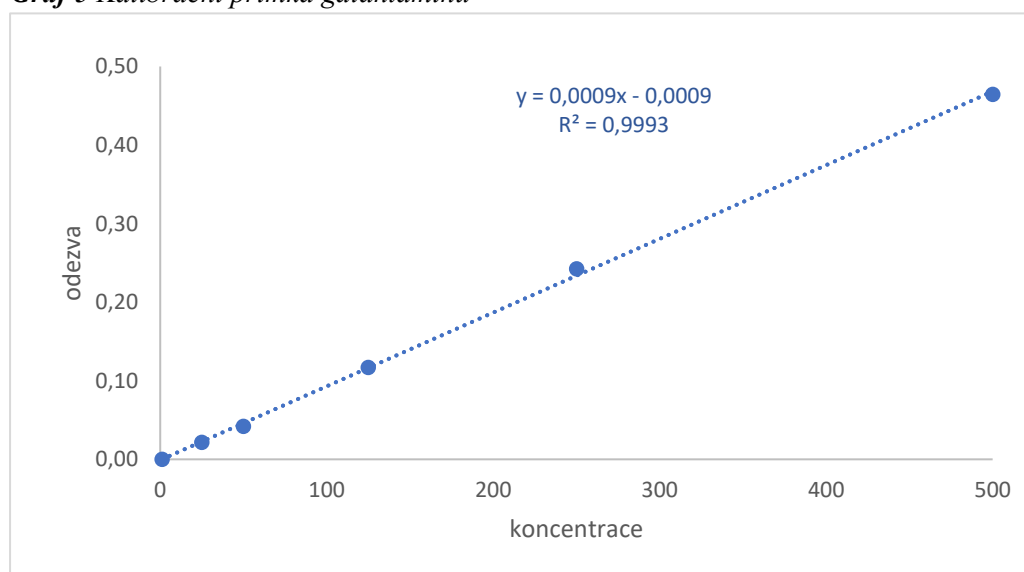
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
1. týden (kalibrace)	26,38	50,07	135,39	258,75	349,53	494,10
	26,38	50,21	135,38	257,59	364,03	498,13
	26,36	50,79	118,22	250,61	361,19	497,89
	26,40	50,40	118,43	249,95	355,57	504,20
	26,38	50,15	135,39	253,58	359,32	536,06
	26,36	50,13	113,62	252,91	356,67	533,51
2. týden (ověření)	30,13		103,36	243,96		415,13
	29,71		103,79	243,81		414,97
	29,98		103,32	241,55		413,27
	29,98		100,74	239,85		399,04
	30,16		101,20	243,26		411,57
	30,01		104,15	244,91		415,78
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	26,38	50,29	126,07	253,90	357,72	510,65
bias [%]	5,50	0,58	0,86	1,56	-4,61	2,13
směrodatná odchylka	0,01	0,27	10,35	3,60	5,05	18,99
RSD _r [%]	0,05	0,54	8,21	1,42	1,41	3,72
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	18,59	16,74	14,59	13,14	12,36	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	28,19		114,41	248,39		461,14
bias [%]	12,74		-8,47	-0,64		-7,77
směrodatná odchylka	1,894		14,064	6,363		53,445
RSD _R [%]	6,72		12,29	2,56		11,59
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	27,88		21,88	19,71		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,01	0,06	1,13	0,22	0,23	0,63
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR,R})	0,24		0,56	0,13		0,65

5.5 Galantamin

Tabulka 21 Výsledky měření pro galantamin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0002	0,0217	0,0423	0,1228	0,2275	0,4429
	0,0002	0,0207	0,0430	0,1179	0,2394	0,4544
	0,0001	0,0208	0,0410	0,1108	0,2438	0,4495
	0,0001	0,0216	0,0401	0,1118	0,2385	0,4930
	0,0002	0,0226	0,0425	0,1184	0,2408	0,4641
	0,0001	0,0208	0,0433	0,1198	0,2638	0,4817
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0001		0,0547	0,1425		0,5268
	0,0001		0,0464	0,1436		0,5265
	0,0001		0,0549	0,1414		0,5412
	0,0002		0,0571	0,1481		0,5268
	0,0002		0,0563	0,1419		0,5182
	0,0004		0,0555	0,1393		0,5063

Graf 5 Kalibrační přímka galantaminu



Tabulka 22 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro galantamin

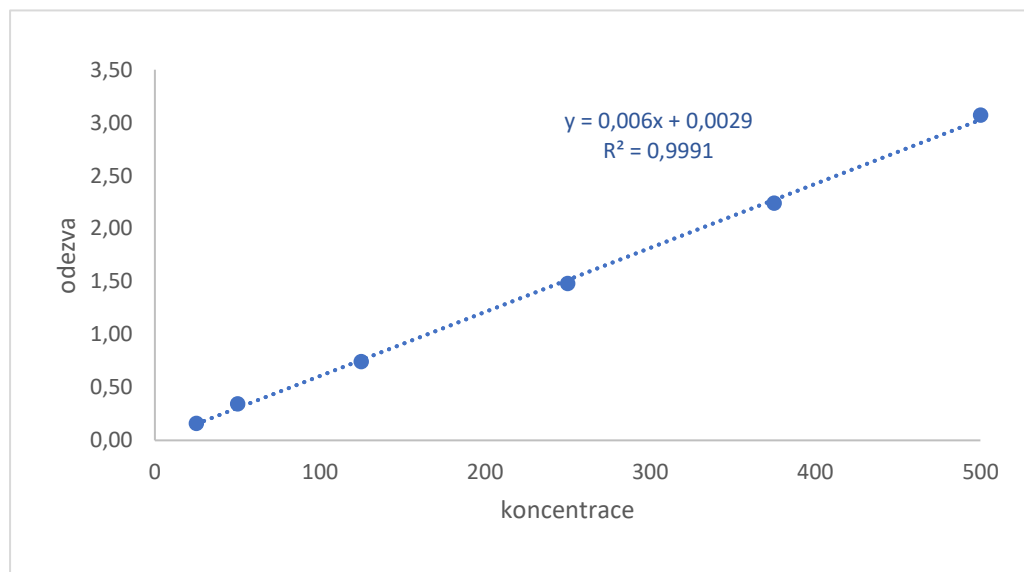
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
1. týden (kalibrace)	1,09	24,08	46,04	131,85	243,40	473,01
	1,09	23,02	46,79	126,60	256,04	485,25
	1,06	23,14	44,62	119,01	260,76	480,05
	1,05	23,98	43,64	120,08	255,12	526,40
	1,09	25,05	46,17	127,11	257,55	495,58
	1,05	23,13	47,09	128,57	282,06	514,37
2. týden (ověření)	1,05		59,17	152,75		562,42
	1,02		50,41	154,01		562,05
	1,05		59,48	151,67		577,79
	1,17		61,74	158,76		562,40
	1,18		60,94	152,20		553,20
	1,37		60,08	149,34		540,54
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	1,07	23,73	45,72	125,54	259,16	495,78
bias [%]	7,27	-5,07	-8,55	0,43	3,66	-0,84
směrodatná odchylka	0,017	0,793	1,334	5,000	12,679	20,783
RSD _r [%]	1,57	3,34	2,92	3,98	4,89	4,19
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	30,17	18,59	16,74	14,59	13,14	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	1,11		52,18	139,33		527,76
bias [%]	10,68		4,36	11,46		5,55
směrodatná odchylka	0,096		7,355	14,947		37,157
RSD _R [%]	8,67		14,10	10,73		7,04
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	45,25		25,12	21,88		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,10	0,36	0,35	0,55	0,74	0,71
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR,R})	0,19		0,56	0,49		0,40

5.6 Memantin

Tabulka 23 Výsledky měření pro memantin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,1594	0,3418	0,7431	1,4709	2,2130	2,8300
	0,1418	0,3332	0,7272	1,3414	2,2295	2,8706
	0,1514	0,3388	0,7691	1,4900	2,2790	2,9245
	0,1625	0,3419	0,7645	1,5161	2,2162	3,1850
	0,1611	0,3504	0,7558	1,5207	2,2965	3,2512
	0,1711	0,3538	0,6916	1,5469	2,1934	3,3499
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,1098		0,6973	1,2368		2,4552
	0,1098		0,6877	1,2918		2,4619
	0,1099		0,6895	1,2877		2,5966
	0,1090		0,7482	1,2171		2,5141
	0,1090		0,6479	1,3171		2,4528
	0,1090		0,7049	1,2870		2,6520

Graf 6 Kalibrační přímka memantinu



Tabulka 24 Zpětně vypočítané koncentrac, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro memantin

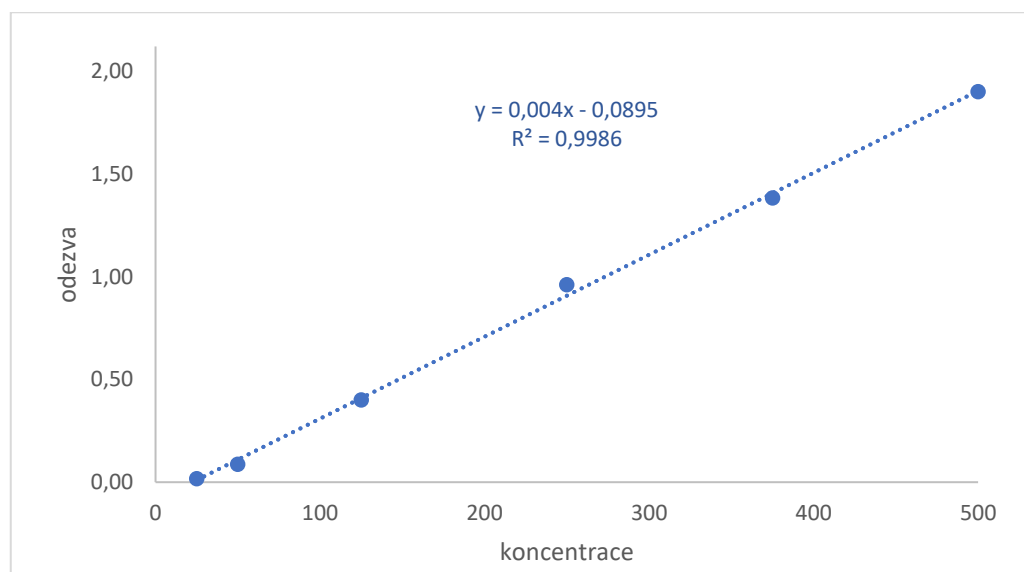
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
1. týden (kalibrace)	25,87	56,03	122,39	242,74	365,44	467,47
	22,97	54,61	119,76	221,32	368,18	474,17
	24,56	55,54	126,70	245,90	376,37	483,10
	26,40	56,06	125,93	250,21	365,98	526,17
	26,17	57,46	124,50	250,97	379,26	537,11
	27,81	58,03	113,88	255,30	362,21	553,43
2. týden (ověření)	17,67		114,83	204,03		405,49
	17,68		113,23	213,12		406,61
	17,69		113,53	212,45		428,87
	17,55		123,24	200,77		415,24
	17,55		106,66	217,31		405,10
	17,55		116,08	212,33		438,04
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	25,63	56,29	122,19	244,41	369,57	506,91
bias [%]	2,52	12,58	-2,25	-2,24	-1,45	1,38
směrodatná odchylka	1,668	1,257	4,789	12,110	6,724	36,446
RSD _r [%]	6,51	2,23	3,92	4,95	1,82	7,19
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	18,59	16,74	14,59	13,14	12,36	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	21,62		118,39	227,20		461,73
bias [%]	-13,51		-5,29	-9,12		-7,65
směrodatná odchylka	4,335		6,259	20,181		54,019
RSD _R [%]	20,05		5,29	8,88		11,70
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	27,88		21,88	19,71		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,70	0,27	0,54	0,75	0,29	1,21
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR,R})	0,72		0,24	0,45		0,66

5.7 Sertindol

Tabulka 25 Výsledky měření pro sertindol, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0173	0,0966	0,4176	0,9636	1,3804	1,9546
	0,0171	0,0726	0,4173	0,9847	1,3507	1,9789
	0,0168	0,0863	0,4247	0,9421	1,4109	1,9861
	0,0171	0,0864	0,3932	0,9415	1,3935	1,9006
	0,0158	0,0936	0,4232	0,9595	1,3675	1,7936
	0,0164	0,0863	0,3246	0,9738	1,3871	1,7810
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0218		0,4827	0,9373		2,1091
	0,0229		0,4753	0,9222		2,0804
	0,0269		0,4652	0,9458		2,0969
	0,0240		0,4854	0,9319		2,0505
	0,0219		0,4754	0,9394		2,0881
	0,0227		0,4654	0,9159		2,1130

Graf 7 Kalibrační přímka sertindolu



Tabulka 26 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro sertindol

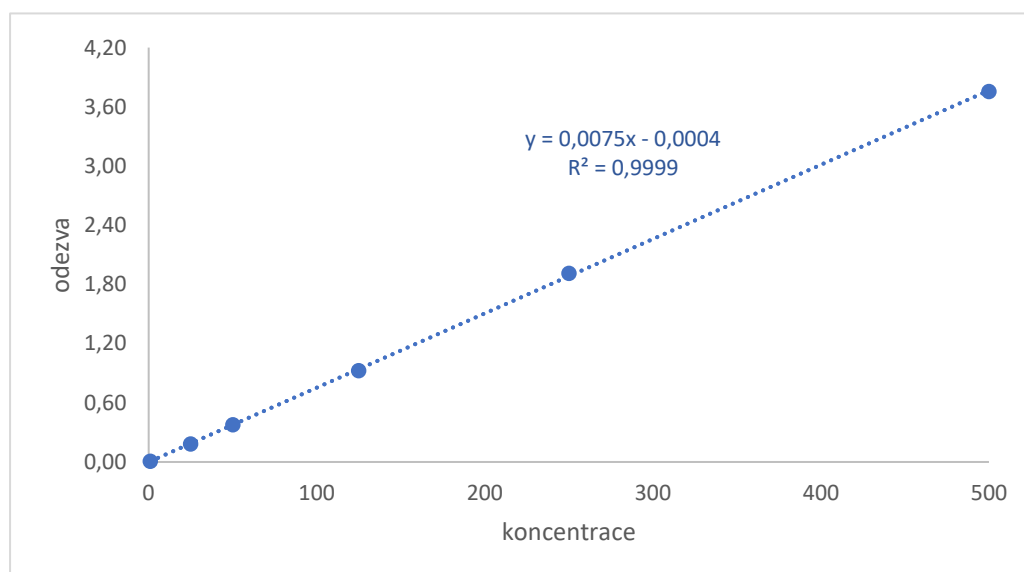
	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	25	50	125	250	375	500
1. týden (kalibrace)	26,78	46,67	127,19	264,15	368,68	512,71
	26,75	40,66	127,13	269,45	361,24	518,81
	26,65	44,10	128,98	258,75	376,35	520,62
	26,73	44,13	121,09	258,59	371,98	499,17
	26,42	45,94	128,59	263,12	365,44	472,34
	26,57	44,11	103,88	266,70	370,38	469,16
2. týden (ověření)	27,92		143,52	257,55		551,47
	28,19		141,68	253,77		544,27
	29,19		139,14	259,67		548,41
	28,47		144,20	256,20		536,77
	27,96		141,68	258,07		546,19
	28,16		139,19	252,19		552,45
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	26,65	44,27	122,81	263,46	369,01	498,80
bias [%]	6,60	-11,46	-1,75	5,38	-1,60	-0,24
směrodatná odchylka	0,14	2,08	9,70	4,31	5,25	23,02
RSD _r [%]	0,51	4,70	7,90	1,64	1,42	4,61
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	18,59	16,74	14,59	13,14	12,36	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	27,48		132,19	259,85		522,70
bias [%]	9,93		5,75	3,94		4,54
směrodatná odchylka	0,930		11,866	5,121		29,643
RSD _R [%]	3,38		8,98	1,97		5,67
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	27,88		21,88	19,71		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,05	0,56	1,08	0,25	0,23	0,78
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR,R})	0,12		0,41	0,10		0,32

5.8 Tranylcypromin

Tabulka 27 Výsledky měření pro tranylcypromin, poměr odezvy ku vnitřnímu standardu

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
A_X/A_{ISTD} (1. týden)	0,0072	0,1764	0,3783	0,9421	1,9191	3,4623
	0,0083	0,1854	0,3697	0,9292	1,8016	3,5684
	0,0069	0,1844	0,3858	0,9188	1,9144	3,5348
	0,0071	0,1833	0,3827	0,8878	1,9477	3,9253
	0,0055	0,1799	0,3693	0,9484	1,9563	3,9637
	0,0070	0,1840	0,3837	0,9283	1,9418	4,0716
A_X/A_{ISTD} (2. týden)	0,0058		0,3018	0,7546		3,1786
	0,0068		0,3013	0,7647		3,1662
	0,0065		0,3293	0,7659		3,1696
	0,0056		0,3283	0,7765		3,1973
	0,0061		0,3288	0,8679		3,1782
	0,0060		0,3129	0,7669		3,1999

Graf 8 Kalibrační přímka tranylcyprominu



Tabulka 28 Zpětně vypočítané koncentrace, výpočty pro správnost (bias), opakovatelnost a preciznost pro tranilcypromin

	koncentrace [$\mu\text{g/l}$]					
	1	25	50	125	250	500
1. týden (kalibrace)	1,00	23,46	50,27	125,12	254,82	459,71
	1,15	24,66	49,12	123,41	239,23	473,80
	0,97	24,52	51,27	122,03	254,21	469,33
	0,99	24,38	50,86	117,91	258,63	521,18
	0,78	23,93	49,08	125,96	259,76	526,27
	0,97	24,47	50,98	123,29	257,85	540,60
2. týden (ověření)	0,82		40,12	100,24		422,04
	0,96		40,05	101,58		420,39
	0,92		43,76	101,73		420,85
	0,79		43,63	103,14		424,52
	0,86		43,70	115,27		421,99
	0,84		41,59	101,86		424,87
výpočty pro opakovatelnost, r						
průměr	0,98	24,24	50,27	122,95	254,08	498,48
bias [%]	-2,20	-3,05	0,53	-1,64	1,63	-0,30
směrodatná odchylka	0,12	0,45	0,96	2,84	7,59	34,71
RSD _r [%]	12,19	1,88	1,91	2,31	2,99	6,96
2/3rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(r)} [%]	30,17	18,59	16,74	14,59	13,14	11,84
výpočty pro preciznost, R						
průměr	0,92		46,20	113,46		460,46
bias [%]	-7,84		-7,59	-9,23		-7,91
směrodatná odchylka	0,108		4,457	10,785		46,108
RSD _R [%]	11,68		9,65	9,51		10,01
rsd _{max} (Horwitz) = RSD _{HOR,(R)} [%]	45,25		25,12	21,88		17,76
opakovatelnost (HorRat <1,3)						
HorRat (RSD _r /RSD _{HOR})	0,81	0,20	0,23	0,32	0,45	1,18
preciznost (HorRat <2)						
HorRat (RSD _R /RSD _{HOR, R})	0,26		0,38	0,43		0,56