

Stanovení psychofarmak pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Uřinová R., Brozmanová H., Kacířová I.

Význam terapeutického monitorování (TDM) psychofarmak v poslední době roste. Prevalence psychických onemocnění dle epidemiologických studií stoupá, a s tím je spojena i zvyšující se preskripce psychofarmak. Zahrnují velkou skupinu léků, které se liší mechanismem účinku i klinickými indikacemi.

Antidepresiva jsou používána primárně k léčbě deprese, mezi další indikace patří léčba chronické bolesti, nespavosti a poruch příjmu potravy. I. generace léků se začala používat již ve 40. letech minulého století. Užívání této generace bylo spojeno s významnými nežádoucími účinky. V současné době jsou preferována antidepresiva III. a IV. generace. Antidepresiva III. generace prezentují látky selektivně inhibující zpětné vychytávání serotoninu (SSRI). Oproti předchozím generacím antidepresiv mají příznivější bezpečnostní profil, nepůsobí sedativně a nepotencují účinek alkoholu. Protože mají výhodnější farmakokinetické vlastnosti, mohou se užívat pouze v jedné denní dávce. Do této generace patří citalopram a escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin a sertralin. Antidepresiva IV. generace a další nová antidepresiva zastupují látky různých mechanismů účinku, např. SNRI (duální inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu - duloxetin, venlafaxin, milnacipran), NDRI (duální inhibitory zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu - bupropion), NASSA (noradrenergní a specifická serotonergní antidepresiva - mirtazapin) a SARI (duální antagonisté/inhibitory zpětného vychytávání serotoninu - trazodon) a další.

Antipsychotika a/nebo neuroleptika zahrnují heterogenní skupinu léčiv, která se běžně dělí na antipsychotika I. generace, tzv. klasická nebo konvenční, a antipsychotika II. generace, tzv. atypická. Mezi antipsychotika I. generace patří např. chlorpromazin, levomepromazin, flufenazin, haloperidol, zuklopentixol a další, k atypickým antipsychotikům

řadíme např. risperidon, paliperidon, klozapin, olanzapin, quetiapin a další. Antipsychotika mají příznivý vliv na psychické integrace a mezi hlavní indikace patří léčba psychóz nebo léčba rezistentních depresí.

V roce 2011 byly expertní skupinou TDM při AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie) vypracovány guidelines pro psychiatry, klinické farmakology, analytiku a další odborníky k optimalizaci využití TDM u psychofarmak. Tato guidelines rozdělují psychofarmaka do čtyř skupin podle významnosti pro TDM. Námi zvolená psychofarmaka jsou zařazena do prvního („strongly recommended“) a druhého („recommended“) stupně doporučení (viz tab. č. 1).

Psychofarmaka se podávají jak v monoterapii, tak v polyterapii. Z tohoto důvodu je vhodné volit metody umožňující stanovení několika léčiv současně, včetně stanovení jejich farmakologicky aktivních metabolitů, tak i neaktivních metabolitů k objektivizaci compliance pacienta.

Obecně se ke stanovení léčiv v biologickém materiálu, což je především sérum nebo plazma, používají imunochemické a chromatografické metody. Výhodou chromatografických metod je současně stanovení několika látek včetně jejich metabolitů. V posledních letech se pro stanovení hladin psychofarmak volí nejčastěji kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí a jako způsob ionizace elektrosprej (ESI), popřípadě chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) pro méně polární látky. U námi stanovovaných látek byly testovány oba způsoby ionizace a výrazně lepších výsledků bylo dosaženo při použití ESI v pozitivním módu. Pouze u olanzapinu jsme naměřili vyšší odezvu u APCI.

Příprava vzorku před vlastní analýzou zahrnuje precipitaci proteinů, extrakci na tuhé fázi (SPE) nebo extrakci kapalina-kapalina (LLE). Nejjednodušší je precipitace, ke které se používají běžná organická rozpouštědla, jako je acetonitril nebo methanol, popř. jejich kombinace, která v určitém poměru zajistí až 98 % precipitaci proteinů při minimálním matricovém efektu.

Metoda stanovení psychofarmak

Na našem pracovišti byla zavedena metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí umožňující stanovení vybraných antidepresiv s metabolity (sertralin, desmethylsertralin, fluoxetin, norfluoxetin, citalopram, didemethyl- citalopram, demethylcitalopram, paroxetin, venlafaxin, O-desmethylvenlafaxin, N-desmethylvenlafaxin, trazodon a mirtazapin) a antipsychotik s metabolity (klozapin, N-desmethyl

klozapin, risperidon, 9-hydroxyrisperidon, olanzapin, 2-hydroxymethylolanzapin, N-desmethylolanzapin, quetiapin).

Analýza se provádí na kapalinovém chromatografu Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford Ma, USA) ve spojení s hmotnostním detektorem Quattro Micro API triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK). Separace látek probíhá na koloně RP column BEH C18, 2,1x50 mm, 1,7 µm za použití gradientu mobilní fáze (voda:acetonitril:octan amonný) s dobou analýzy 5 minut. Přechody použité pro kvantifikaci a kolizní energie jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 2. Příprava vzorku séra spočívá v precipitaci proteinů směsí metanol/acetonitril (40:60, v/v) s 0,05% síranem zinečnatým.

Metoda byla validována podle FDA pravidel. Korelační koeficienty kalibračních křivek a koncentrační rozsah jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 3. Výtěžnost metody se nachází v rozmezí 70 – 114,3 %.

Matricový efekt

Při zavádění metody byl testován i matricový efekt, který je jedním z mnoha důležitých zdrojů chyb v LC/MS/MS. Příčin vzniku matricových efektů je mnoho a ne všechny jsou zcela objasněny, důsledkem je pak potlačení nebo naopak zvýšení ionizace, což může v konečném důsledku ovlivnit správnost analýzy. Matricové efekty mohou způsobit jednak látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou, dále se mohou na vzniku podílet některé složky mobilní fáze, ale také exogenní materiály (např.

polymery obsažené v odběrových plastických nádobách, některá antikoagulantia např. heparin litný apod.). Nejdůležitější je samotná příprava vzorku. Precipitace proteinů pouze acetonitrem vykazuje největší matricový efekt s mohutnou supresí zejména na začátku a na konci chromatogramu, protože se tímto způsobem dostatečně neodstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Na hodnocení matricového efektu se používají dvě metody, infuze standardu analyzované látky za kolonou nebo standardní přírůdek po extrakci. K matricovým efektům je citlivější ESI než APCI.

Analýza patientských vzorků

Ve spolupráci se Oddělením psychiatrie FN Ostrava byli odebíráni pacienti v den přijetí k hospitalizaci a následně 3-4. den hospitalizace před podáním léku a 2 nebo 6 hodin po podání na základě jejich farmakokinetiky. U pacientů užívajících citalopram, venlafaxin, klozapin, quetiapin a risperidon byl odběr proveden za 2 hodiny po podání, u pacientů užívajících fluoxetin, paroxetin, sertralín a olanzapin za 6 hodin po užití. Trazodon a mirtazapin je podáván jedenkrát denně večer, proto byl odběr prováděn až 12 hodin po podání. Celkem bylo provedeno 904 stanovení hladin, přičemž u některých pacientů byl odběr vzorku proveden opakovaně.

Závěr

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je velmi citlivou metodou umožňující stanovení velké skupiny psychofarmak a jejich metabolitů ve velmi krátkém čase.

Tabulka č.1: Stupeň doporučení pro TDM a terapeutická rozmezí

léčivo	stupeň doporučení pro TDM	terapeutické rozmezí (ng/ml)
citalopram	2	50-110
escitalopram	2	15-80
fluoxetine	2	120-500
mirtazapine	2	30-80
paroxetine	3	30-120
sertraline	2	10-150
trazodone	2	700-1000
venlafaxine+O-desmethylvenlafaxin	2	100-400
klozapin	1	350-600
olanzapin	1	20-80
quetiapin	2	100-500
risperidon+9-hydroxyrisperidon	2	20-60

(1= strongly recommended, 2 = recommended)

Tabulka č. 2: Přejchody a kolizní energie stanovovaných psychofarmak

léčivo	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE	léčivo	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE
risperidon	411,3	191,1	30	klozapin	327	269,6	25
9-hydroxyrisperidon	427,2	206,9	30	N-desmethylklozapin	313,2	270,2	24
sertralin	306	158,6	24	venlafaxin	278,6	57,6	17
N-desmethylsertralin	292,2	158,9	24	O-desmethylvenlafaxin	264,3	57,7	18
fluoxetin	310,2	43,6	11	N-desmethylvenlafaxin	264,2	120,8	29
norfluoxetin	296,2	133,7	7	olanzapin	313,3	212,8	30
citalopram	325,2	109,2	27	N-desmethylolanzapin	2992	197,8	40
desmethylcitalopram	311,2	108,8	25	2-hydroxyolanzapin	329,2	271,9	23
didesmethylcitalopram	297,2	108,9	25	trazodon	370,4	241,9	26
paroxetin	330	191,7	30	mirtazapin	265,8	194,9	22
quetiapin	384,2	252,8	20	alprenolol (IS)	250,2	91	34

Tabulka č. 3: Korelační koeficienty a koncentrační rozmezí

léčivo	korelační koeficient	koncentrační rozmezí (ug/l)
risperidon	0.998	0,5-100
9-hydroxyrisperidon	0.998	0,5-100
sertralin	0.998	5-500
N-desmethylsertralin	0.999	5-500
fluoxetin	0.999	5-1000
norfluoxetin	1.0	5-1000
desmethylcitalopram	0.999	5-500
didesmethylcitalopram	0.999	5-500
paroxetin	0.995	5-500
quetiapin	0.999	5-1000
klozapin	0.997	5-2000
N-desmethylklozapin	0.998	5-1000
venlafaxine	0.998	5-1000
O-desmethylvenlafaxin	0.998	5-1000
N-desmethylvenlafaxin	0.998	5-1000
olanzapin	0.999	2,5-500
N-desmethylolanzapin	0.996	2,5-500
2-hydroxyolanzapin	0.998	2,5-500
trazodon	0,999	5-2000
mirtazapin	0,995	2,5-500

Literatura

1. Fujáková M, Kopeček M. Antidepressiva-od terapie ke klinické praxi. *Klin. Farmakol. Farm.* 2012; 29-37.
2. Bouček J, Pidrman V. *Psychofarmak v medicíně* 1.vyd. Praha, Grada Publishing. 2005: 9-162.
3. Kopeček M. Aktualizované klinické a teoretické aspekty podání antipsychotik. *Klin. Farmakol. Farm.* 2012; 26(1): 18-28.
4. Uřinová R, Brozmanová H., Šišťák P, Šilhán P, Kacířová I., Lemr K., Grundmann M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *J. Chromatogr. B*, 907 (2012) 101-107,
5. Uřinová R., Turjap M., Brozmanová H., Grundmann M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak, *Čes. Slov. Farm.*, 2010; 59, 103-111
6. Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. of Chromatography B*, 2009, 887, p. 2198–2207.
7. Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., Murphy, C. M. Matrix Effect in Bio-Analysis of Illicit Drugs with LC-MS/MS: Influence of Ionization Type, Sample Preparation, and Biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14, p. 1290–1294.
8. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry*. 2011; 44(6): 195-235.
9. Grundmann M., Kacířová I., Uřinová R. Therapeutic drug monitoring of psychoactive drugs – antidepressant drugs, *Biomed Pap Med Fac Univ Olomouc Czech Republic*, 2013, 157