STANOVENÍ VYBRANÝCH NOVÝCH ANTIPSYCHOTIK V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU

Michaela Kantorová
Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, mkantorova@centrum.cz.

Abstrakt

Antipsychotika jsou často používaná psychofarmaka. Cílem příspěvku byla optimalizace LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) metody pro získání výsledků významných pro posouzení dopadu léčby na pacienty. Analýza antipsychotik se provádí u živých pacientů v séru a u zemřelých osob z důvodu hemolýzy v krvi. Interpretace naměřených výsledků u zemřelých osob není jednoduchá, neboť koncentrace analytu v krvi se po smrti může z různých důvodů změnit. Dalším problémem je srovnatelnost výsledků koncentrace v krvi a v séru. Byly získány převodní koeficienty jednotlivých antipsychotik, které mohou sloužit k přepočtu koncentrací z krve na sérum. Po přepočtu lze hodnoty koncentrace porovnat s tabelovanými hodnotami, které jsou uváděny ve vztahu k séru, případně k plazmě. Tyto zjištěné informace jsou významné pro klinickou praxi.

Klíčová slova: *antipsychotika; analýza antipsychotik; kapalinová chromatografie.*

Úvod

Antipsychotika (AP) jsou farmaka, která zmírňují psychotické symptomy, zejména bludy a halucinace. Jde o chemicky různorodou skupinu látek s nestejnými farmakologickými vlastnostmi, s odlišnou intenzitou účinku i s různým chemickým složením. Užívají se k terapii schizofrenie, schizoafektivních psychóz a manické fáze maniodepresivní psychózy. [1, 2]

Hlavní antipsychotický účinek spočívá v blokaci dopaminových receptorů v různých oblastech centrálního nervového systému. Terapie antipsychotiky přináší řadu vedlejších účinků, proto je vždy nutné posoudit poměr léčebného a nežádoucího působení při jejich podávání. [3]

Jednorázové užití AP vyvolává u člověka stav uklidnění, člověk může být po aplikaci ospalý a mít snížené odpovědi na externí podněty, avšak vyšší myšlenkové pochody zůstávají zachovány. Vlastní antipsychotický účinek se projeví jen u psychicky nemocných pacientů, a to s určitou latencí a při dlouhodobém užívání. U psychicky zdravých lidí nemá antipsychotické působení svůj ekvivalent, projeví se zklidněním a psychomotorickým zpomalením. [2, 4]

Potřebné dávky antipsychotik vyplývají z účinností jednotlivých farmak a z léčebného cíle, který je u každého pacienta odlišný. Dávkování musí být zcela individuální pro každého pacienta i pro každé léčivo. Je velmi důležité validovat metody stanovení antipsychotik v biologickém materiálu a zjistit, zda koncentrace léčiv v krvi pacientů je v daném terapeutickém rozpětí. [4]

Toxikologická analýza patří mezi důležitou součást léčebně-diagnostických postupů potřebných k získání informace o akutní či chronické expozici vyšetřované osoby toxikologicky významné látce (TVL) [5]. K získání validních výsledků toxikologického vyšetření je nutné zvolit vhodný biologický materiál. Antipsychotika se u živých pacientů analyzují především v séru, v analýzách postmortem se z důvodu hemolýzy používá plná krev. Interpretace výsledků měření koncentrací psychoaktivních či jiných léků ve vzorcích krve zemřelých pacientů je složitá. Problémem je srovnatelnost výsledků koncentrace v séru a v plné krvi a také možnost změny koncentrace analytu v krvi po smrti z důvodu nestability léčiva a vlivem posmrtné redistribuce (PMR). [6, 7]

Jako základní technika pro stanovení koncentrací psychofarmak se používá kapalinová chromatografie. Důležitá je preanalytická úprava biologického vzorku, která zahrnuje extrakci z kapaliny do kapaliny či extrakci tuhou fází. [8]

Práce je zaměřena na stanovení vybraných antipsychotik (paliperidon = PAL, risperidon = RIS, quetiapin = QUE) kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí včetně výtěžnosti extrakce sledovaných látek z biologického materiálu. Byly stanoveny limity detekce a limity kvantifikace, dále linearita kalibračních závislostí. Také byl studován vztah koncentrací antipsychotik naměřené v séru a v plné krvi.

Materiál a metody

K analýzám byly odebrány vzorky krve pacientů užívající antipsychotika. Odběr krve byl proveden tak, aby vždy od jednoho pacienta byla k dispozici plná krev i sérum. U vzorků od zemřelých osob byla z důvodu hemolýzy prováděna analýza pouze v plné krvi. Vzorky byly před analýzou upraveny precipitační deproteinizací acetonitrilem, neboť před použitím izolačních postupů je nutné biologický materiál s obsahem proteinů upravit deproteinizací.

Pro účely analýzy byla antipsychotika izolována extrakcí na tuhé fázi (SPE). Tato extrakce byla provedena s použitím extrakčních kolonek SPEC-DAU, 3 ml, 30 mg, Varian, USA. Kromě toho byla antipsychotika izolována také extrakcí z kapaliny do kapaliny. Během optimalizace extrakce se postupně měnila extrakční činidla, kdy byl zkoušen dichlormethan, směs dichlormethan-isopropylalkohol (9:1) a směs ether-ethylacetát-dichlormethan (20:20:5).

Analýzy byly provedeny na přístroji LC-MS 2010A (Shimadzu, Japonsko) s použitím ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. K separaci byla použita kolona Gemini 5u C18 110A (50 x 2,0 mm, 5µm; Phenomenex, USA), která byla termostatována na 35°C. Mobilní fázi A tvořil 0,01 M octan amonný s 0,1 % kyselinou mravenčí, mobilní fázi B acetonitril. Gradientová eluce: 15% MFB na 90% v průběhu 17 minut, pak zpět na 15% MFB, ve 20. minutě konec analýzy. Průtoková rychlost MF: 0,2 $ml \cdot min^{-1}$.

Výsledky a diskuse

V této práci bylo zjištěno, že pro zpracování biologického materiálu ke stanovení antipsychotik se jeví jako nejvhodnější metoda extrakce na tuhé fázi. Byla určena výtěžnost extrakce, která se u paliperidonu i risperidonu pohybovala nad 75 %. U quetiapinu byla výtěžnost nižší (49 %), což lze vysvětlit podstatně rozdílnou strukturou quetiapinu od předchozích dvou léků. V další práci je možné se zaměřit na výběr jiné, vhodnější fáze či extrakčního postupu pro quetiapin.

Lineární odezva metody se ověřovala na standardních roztocích antipsychotik. K výpočtu směrnice regresní křivky, úseku na ose y i korelačního koeficientu R^2 byla použita metoda lineární regrese. Směrnice regresních křivek u vzorků s deproteinizačním krokem jsou 4x až 8x nižší než u vzorků bez této úpravy. Kalibrační křivky nedeproteinizovaných vzorků jsou strmější, a tak je zde výrazná závislost na změně koncentrace (x). Z toho vyplývá, že deproteinizace je důležitým a nutným krokem před vlastní analýzou antipsychotik. Korelační koeficienty u všech analyzovaných léků byly vyšší než 0,99, což splňuje požadavky na linearitu. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 1. Na základě měření lze konstatovat, že závislost signálu na koncentraci je ve zvoleném koncentračním rozmezí lineární.

Rovněž byly u vybraných antipsychotik stanoveny limity detekce a limity kvantifikace (viz Tabulka 2). Z výsledků vyplývá, že pro všechna sledovaná antipsychotika je použitá metoda dostatečně citlivá, protože limity kvantifikace jsou výrazně nižší než v literatuře [9] uváděné nejnižší terapeutické hladiny.

Tabulka 1 - Regresní rovnice a korelační koeficienty kalibračních křivek antipsychotik

	Stanovení bez deproteinace		Stanovení s deproteinací	
	Regresní rovnice[a]	R^2	Regresní rovnice[a]	R^2
Paliperidon	y = 196,47x + 0,0357	0,9936	y = 23,668x - 0,0014	0,9954
Risperidon	y = 375,74x + 0,0315	0,9953	y = 94,353x + 0,005	0,9948
Quetiapin	y = 31,297x + 0,262	0,9966	y = 5,0568x + 0,0161	0,9949

[a] Koncentrační interval: 0,04 - 0,8 $mg \cdot l^{-1}$ pro quetiapin, 0,0004 - 0,004 $mg \cdot l^{-1}$ pro risperidon, 0,0005 - 0,005 $mg \cdot l^{-1}$ pro paliperidon

Tabulka 2 - Meze kvantifikace (LOQ), meze detekce (LOD), terapeutické rozpětí

	RIS	PAL	QUE
LOQ [$mg \cdot l^{-1}$]	0,0004	0,001	0,0054
LOD [$mg \cdot l^{-1}$]	0,00014	0,0003	0,0019
Terapeutické rozpětí [$mg \cdot l^{-1}$]	do 0,006	do 0,006	do 1,0

Dalšími parametry byly opakovatelnost v sérii (získána z většího počtu měření provedených během 1 dne) a opakovatelnost mezi dny (získána z měření provedených během 4 po sobě jdoucích dní). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3. Maximální hodnota opakovatelnosti v sérii byla 5,35 % u paliperidonu a opakovatelnosti mezi dny 6,0 % u quetiapinu. Z výpočtů vyplývá, že používaná metoda poskytuje výsledky s přesností nad 94 %.

Tabulka 3 - Opakovatelnost v sérii a opakovatelnost mezi dny získaná pro jednotlivá antipsychotika (vyjádřeno jako relativní směrodatná odchylka)

	PAL	RIS	QUE
Opakovatelnost v sérii [%]	5,35	5,14	4,94
Opakovatelnost mezi dny [%]	5,78	5,54	6,00

Také byla zkoumána odlišnost ve stanovení antipsychotik v séru a v plné krvi. Byly získány převodní koeficienty, které mohou sloužit k přepočtu koncentrací z krve na sérum (Tabulka 4). Koncentrace stanovených antipsychotik v plné krvi byla vždy nižší než koncentrace naměřená v séru. Příčinou je hemolýza erytrocytů, při které se obsah erytrocytů uvolní do séra, čímž dojde k naředění této tekutiny. Výsledky předkládaných experimentů jsou významné také proto, že dokazují, že testovaná antipsychotika se nevážou na krevní buňky.

Tabulka 4 - Koeficienty udávající podíl koncentrací léčiv naměřenou v plné krvi a v séru

	PAL	RIS	QUE
Koeficienty	0,808	0,806	0,664

Závěr

Tento příspěvek se zabýval stanovením antipsychotik (paliperidonu, risperidonu, quetiapinu) v plné krvi a v séru pomocí kapalinové chromatografie. Byly optimalizovány podmínky pro stanovení těchto antipsychotik pomocí LCMS metody. Statistické zhodnocení analýz reálných vzorků zřetelně prokázaly vhodnost extrakčních postupů i analýzy metodou LCMS pro použití v klinické praxi. Byl získán koeficient k přepočtu koncentrací z krve na sérum. Po tomto přepočtu lze hodnoty koncentrace porovnat s tabelovanými hodnotami. Tyto informace jsou velmi významné pro klinickou praxi (určení stupně intoxikace, správná volba detoxikační

metody). Zjištěné výsledky jsou významným příspěvkem pro další studium týkající se řešení možností přepočtu hodnot koncentrací získaných z plné krve u postmortem analýz na hodnoty koncentrací v séru. Při přepočtu musíme zohlednit i další posmrtné vlivy a procesy, mezi které patří např. posmrtná redistribuce léčiv, buněčná smrt, hypoxie, intracelulární acidifikace, autolýza tkání a nestabilita léčiv. Spolehlivá interpretace výsledků je možná po zvážení všech výše uvedených vlivů.

Poděkování

Děkuji RNDr. Marii Staňkové, Ph.D. za odborné konzultace, cenné rady a čas, který mi věnovala, doc. RNDr. Kateřině Malachové, CSc. za rady, podněty a připomínky, prim. MUDr. Svatopluku Sedláčkovi z Psychiatrické léčebny v Opavě za dodání pacientských vzorků. Poděkování patří i Ústavu soudního lékařství FNO za umožnění provedení experimentální části práce na tomto pracovišti a za vytvoření příjemných podmínek během prováděných měřeních.

Literatura

[1] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie.* Praha: Galén, 2007. xxiv, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.

[2] HYNIE, S.: *Speciální farmakologie (Díl 3): Látky ovlivňující CNS*. Praha: Karolinum, 2000. 299 s. ISBN 80-246-0122-2.

[3] JAFARI, S., FERNANDEZ-ENRIGHT, F. a HUANG, X. F. Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects. *Journal of Neurochemistry*. 2012, roč. 120, č. 3, s. 371-384.

[4] LÜLLMAN, H., MOHR, K., WEHLING, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada, 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.

[5] BALÍKOVÁ, M.: *Forenzní a klinická toxikologie: Laboratorní toxikologická vyšetření*. Praha: Galén, 2004. 140 s.

[6] SKOPP, G. Postmortem toxicology. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 2010, roč. 6, č. 4, s. 314-325.

[7] FLANAGAN, R. J., AMIN, A., SEINEN, W. Effect of post-mortem changes on peripheral and central whole blood and tissue clozapine and norclozapine concentrations in the domestic pig (Sus scrofa). *Forensic Science International*. 2003, roč. 132, č. 1, s. 9-17.

[8] UŘINOVSKÁ, R., TURJAP, M., BROZMANOVÁ, H., GRUNDMANN, M. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak. *Česká a slovenská farmacie.* 2010, roč. 59, s. 103-111.

[9] MOFFAT, A. C., WIDDOP, B., OSSELTON, M. D.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Londýn: The Pharmaceutical Press, 2004. xxi, 564, llxxxiv s.

Abstract

The antipsychotics can be considered as a widely used type of psychofarmac drugs. The main aim of this paper was the optimalisation of LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) methods and obtaining the relevant results necessary for evaluation of the patient treatment impact. The analysis is based on the serum among the living people, on the other hand, blood hemolysis is used among the dead ones. The interpretation of the analysis-results among the dead people might be challenging for the two following reasons: mostly because the analyte blood-concentration can change after the death and also for the difficult comparison between the results of analyte-concentration in blood and serum. The obtained antipsychotic ratios can be used to convert the blood-to-serum concentration values. After this conversion, the results can be compared with the chart-values that are related to serum basis (or blood plasma). Outcome of the analysis can be applicable in the clinical practice.