

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: doktorský

Studijní obor: farmakologie a toxikologie



Ing. Lukáš Chytil

Chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii

Applications of chiral and achiral chromatography in pharmacology
and toxicology

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Slanař, PhD.

PRAHA, 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14. prosince 2010

Ing. Lukáš Chytil

Podpis:

Identifikační záznam:

CHYTIL, Lukáš. *Chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii. [Applications of chiral and achiral chromatography in pharmacology and toxicology]*. Praha, 2010. 70 s., 7 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Slanař, Ondřej.

Klíčová slova:

chromatografie, metabolismus, tramadol, CYP2D6, hypertenze, compliance, benzodiazepiny, toxikologická analýza

SOUHRN

Předkládaná dizertační práce popisuje formou komentáře k vlastním originálním publikacím vývoj analytických postupů pro analýzu léčiv popř. metabolitů z různých terapeutických skupin. Vedle optimalizace preanalytické a analytické fáze, je věnován velký prostor validaci a interpretaci získaných výsledků. Práce je složena ze tří tématických okruhů: chirální stanovení tramadolu a jeho metabolitu, stanovení antihypertenziv a kvalitativní analýza benzodiazepinů.

V prvním okruhu je popsán vývoj metodik pro chirální analýzu tramadolu a jeho demetylovaného metabolitu *O*-desmetyltramadol (ODT) v moči a v plazmě. Tramadol je centrálně působící analgetikum, jež se užívá v terapii jako racemát. Chování každého enantiomeru se liší: (+)-tramadol inhibuje především zpětné vychytávání serotoninu a (-)-tramadol inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, (+)-tramadol je desetkrát terapeuticky účinnější než druhý enantiomer. *O*-demetylací katalyzovanou enzymem CYP2D6 v játrech vzniká neaktivnější metabolit (ODT), který je zodpovědný za vznik lékově navozené opioidní analgezie. (-)-ODT vykazuje schopnost inhibice zpětného vychytávání monoaminů zatímco (+)-ODT vykazuje 200 krát vyšší afinitu k opioidním receptorům než mateřská látka. Také metabolická přeměna tramadolu vykazuje stereoselektivní selektivitu. Z toho důvodu je pro fenotypizaci polymorfního cytochromu P450 2D6 výhodné detekovat enantiomery ODT i tramadolu. Nejprve byla analyzována moč a plazma u zdravých dobrovolníků po požití tramadolu a následně byl porovnán výsledek s konkrétním fenotypem. Výsledky dobře korelovaly s genotypizací: poměr ODT/tramadol u středních a rychlých metabolizátorů byl výrazně posunut ve prospěch metabolitu, u pomalých metabolizátorů naopak. Vyvinuté metody byly dále použity pro analýzu moče a plazmy pacientů hospitalizovaných na dětské jednotce intenzivní péče, jimž byl tramadol podán pro tišení bolesti. Koncentrace analytů dobře korelovaly s účinkem a výskytem nežádoucích účinků.

V další části jsou popsány metody pro kvantifikaci antihypertenziv v séru pomocí LC-MS/MS. Stanovení bylo prováděno u pacientů léčených pro potenciální farmakorezistentní hypertenzi, u kterých bylo vysloveno podezření na nedodržování předepsané terapie. Dodržování farmakoterapie u léčby hypertenze, stejně jako např. u léčby epilepsie nebo depresí, má zásadní význam pro úspěšnost léčby. Neužívání

předepsané medikace nutí lékaře k hledání příčiny selhání zvolené terapie a navíc ohrožuje také samotného pacienta. Dalším, neméně zanedbatelným aspektem, je i ekonomická stránka věci. Vedle nejčastěji stanovovaných preparátů-verapamilu a doxazosinu, bylo sledováno dalších 13 léčiv nebo jejich metabolitů užívaných při léčbě hypertenze. Zkoumaný soubor obsahoval 215 pacientů ve věku od šestnácti do devadesáti let, u kterých bylo provedeno 496 analýz. Zastoupení pohlaví bylo vyvážené: 104 žen a 111 mužů. Interpretace naměřených dat byla prováděna na základě publikovaných doporučených hladin léčiv, což kromě potvrzení non-compliance pomohlo odhalit nedostatečné nebo naopak vysoké dávkování léčiva. Výsledky analýz byly dány do souvislosti s věkem, pohlavím, počtem užívaných léčiv a způsobem léčby pacienta. Všeobecně lepší výsledky ve smyslu dodržování terapie byly pozorovány u mužů, zatímco ženy, především nižšího a středního věku, dodržovaly předepsanou farmakoterapii méně často. Dále se ukázalo, že pacienti užívající více preparátů častěji léčbu neužívali, než ti, kteří měli předepsaný jeden nebo dva léky. Naopak konkrétní typ léčiva na dodržování terapie vliv neměl.

Poslední díl je věnován kvalitativní analýze benzodiazepinů nebo jejich metabolitů v moči pro potřeby toxikologické analýzy. Benzodiazepiny tvoří podstatnou část nálezů v toxikologické praxi. Bohužel jejich intenzivní metabolizace znemožňuje v řadě případů detekci mateřské látky v moči. Z tohoto důvodu bylo nutné vyvinout takové analytické metody, které umožní detekovat jak mateřské látky, tak i metabolity, nebo produkty kyselé hydrolýzy konjugátů. Vzhledem ke zdlouhavým a ne vždy lehce proveditelným současným metodám bylo nutné nalézt takový postup, který vyhovuje dnešním vysokým nárokům na přesnost, citlivost a časovou nenáročnost. Vyvinutá metoda v sobě zahrnuje LC-MS/MS analýzu s předřazenou kyselou hydrolýzou a dvojitou extrakcí z bazického a neutrálního prostředí. Pomocí vyvinuté metody je možné prokázat užití všech běžně se vyskytujících benzodiazepinů. Uvedený postup byl úspěšně implementován do laboratorních postupů, běžně užívaných v rámci systematické toxikologické analýzy.

SUMMARY

Development and validation of methods for analysis of several drugs or their metabolites are described in this thesis. The document is presented as a commentary to the original papers, which were published in peer reviewed journals. Discussion on the optimization of each method is presented and covers also method development and influence of preanalytical aspects. Additionally, examples of the application of the developed methods in clinical pharmacology and toxicology are shown. This dissertation consists of three parts: enantiomeric determination of tramadol and its metabolite, determination of some antihypertensive drugs, and qualitative analysis of benzodiazepines.

Development of a method for chiral analysis of tramadol and its desmethylated metabolite *O*-desmethyltramadol (ODT) in human urine and plasma is described in the first part of the thesis. Tramadol is a centrally acting analgetic drug, which is used as racemate in clinical practise. Each enantiomer displays different binding properties for various receptors: (+)-tramadol preferentially inhibits serotonin reuptake while (-)-tramadol mainly inhibits noradrenalin reuptake. (+)-tramadol is considered 10-times more potent than (-)-tramadol. Major active metabolite (ODT), which is considered to be the main agent responsible for the drug-induced opioid analgesia, is formed in the liver predominantly via CYP2D6 enzyme. (-)-ODT possesses potent monoamine reuptake inhibitory activity while (+)-ODT has approximately 200-times the affinity of the parent drug. The metabolic fate of tramadol is also stereoselective. From this reason it was necessary to determine concentrations of both enantiomers for parent drug and ODT for phenotypization of polymorphic cytochrome P450 2D6. Phenotype results were compared with the results of genotypization. Metabolic ratios ODT/T correlated well with genotypes: extensive metabolizers had higher metabolite concentrations while poor metabolizers had metabolic ratios shifted to tramadol. The developed methods were also used for measurement of enantiomers in tramadol treated patients, who were hospitalised in a paediatrics intensive care unit.

LC-MS/MS methods for determination of several antihypertensive drugs are described in second part of the thesis. These analyses were performed to document non-compliance of patients, who were treated with one or more antihypertensive drugs.

Eleven methods were developed for determination of antihypertensive drugs including verapamil and doxazosin. To apply the methods blood samples were analysed from 215 (104 female and 111 male) patients aged from 16 to 90 years. Interpretation of the obtained results was based on published therapeutic ranges for each drug that served as discriminating values for low, therapeutic or high levels. The results were compared with age, sex, number of prescribed drugs, and institutionalized or out-patient care. Generally better compliance was observed in men, whilst large non-compliance was observed especially in young and middle aged women. Poor compliance was also noted in patients using more than two pills. The therapeutic group of the prescribed drug did not influence compliance.

The last part of this thesis describes development of analytical method for qualitative screening for benzodiazepines in urine. Benzodiazepines belong among the most widely analysed drugs in toxicological praxis. They undergo extensive metabolic conversion that makes difficult to detect parent compounds in urine. It was therefore necessary to develop analytical method suitable for detection of parent compounds, metabolites and glucuronides. Final method consists of LC-MS/MS detection of analytes after acid hydrolysis and consecutive double liquid-liquid extraction. This method was applied for a screening of all common benzodiazepines and it was also implemented in routine laboratory praxis. The developed method is conveniently applicable for the routine use since it is accurate and time non-consumable.

OBSAH

SOUHRN.....	4
SUMMARY	6
OBSAH	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	10
PODĚKOVÁNÍ.....	11
1 ÚVOD	12
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	14
2.1 CHROMATOGRAFIE.....	14
2.1.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	14
2.1.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	15
2.2 ACHIRÁLNÍ CHROMATOGRAFIE VE FARMAKOLOGII A TOXIKOLOGII	16
2.2.1 ACHIRÁLNÍ GC ANALÝZA VE FARMAKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH	17
2.2.2 ACHIRÁLNÍ GC ANALÝZA V TOXIKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH	18
2.2.3 ANALÝZA ETANOLU A PODOBNÝCH LÁTEK.....	18
2.2.4 ACHIRÁLNÍ LC ANALÝZA VE FARMAKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH	19
2.2.5 ACHIRÁLNÍ LC ANALÝZA V TOXIKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH	21
2.3 CHIRÁLNÍ FARMAKOLOGIE	24
2.3.1 CHIRALITA MOLEKUL VE FARMAKOLOGII	24
2.3.2 ČISTÉ IZOMERY JAKO LÉČIVA	25
2.4 CHIRÁLNÍ CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA	26
2.4.1 CHIRÁLNÍ GC	26
2.4.2 CHIRÁLNÍ LC	27
2.5 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU	28
2.6 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV V SÉRU PRO PRŮKAZ NON-COMPLIANCE	29
2.7 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI.....	31
3 CÍL PRÁCE	34
4 METODY	35
4.1 ANALYTICKÉ METODY	35
4.1.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT.....	35
4.1.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	35
4.1.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ	35
4.2 GENOTYPIZACE CYP2D6.....	36
4.3 SOUBOR PACIENTŮ.....	36
4.3.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT.....	36
4.3.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	37
4.4 METODY PRO STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT	37
5 VÝSLEDKY	38
5.1 ANALYTICKÉ METODY	38
5.1.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT.....	38
5.1.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	41
5.1.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI	44
5.2 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT.....	46
5.2.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT.....	46
5.2.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	47
5.2.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI	53
6 DISKUZE	55
6.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT	55
6.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV	56
6.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI	57
7 ZÁVĚR.....	58
LITERATURA.....	59
SEZNAM PŘÍLOH	70

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABP: (2-amino-5-bromfenyl)(pyridin-2-yl)metanon
ACB: 2-amino-5-chlorbenzofenon
ACE: angiotenzin konvertující enzym
 C_{max} : maximální koncentrace léčiva v séru
CE: kapilární elektroforéza
CSP: chirální stacionární fáze
Da: Dalton
DAD: detektor diodového pole
GC: plynová chromatografie
EMIT: enzyme multiplied immunoassay technique
FID: plamenově ionizační detektor v plynové chromatografii
FPD: plamenově fotometrický detektor
FPIA: fluorescenční polarizační immunoassay
LC: kapalinová chromatografie
LLE: extrakce kapalnou fází
LLOQ: dolní limit kvantifikace analytické metody
LOD: limit detekce analytické metody
MACB: 5-chlor-2-(metylamino)benzofenon
MS: hmotnostní spektrometr
 m/z : efektivní hmota iontu
NPD: dusíko-fosforový detektor
ODT: *O*-desmethyltramadol
 r : korelační koeficient
RC: metabolit klonazepamu (7-aminoklonazepam)
RF: metabolit flunitrazepamu (7-aminoflunitrazepam)
RN: metabolit nitrazepamu (7-aminonitrazepam)
RSD: relativní směrodatná odchylka
SD: směrodatná odchylka
SIM: mód hmotnostní analýzy, sledování určitého iontu (iontů)
SNRI: selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SRM: mód hmotnostní analýzy, sledování charakteristického rozpadu molekuly
SSRI: selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
STA: systematická toxikologická analýza
TDM: terapeutické monitorování léčiv
TLC: chromatografie na tenké vrstvě
 t_{max} : čas do dosažení maximální pozorované hladiny léčiva
 $t_{1/2}$: biologický poločas léčiva
UV/VIS: detektor pro látky absorbující v UV nebo viditelné oblasti světla

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Sumární IF: 13,413

1. CHYTIL, L., ŠTÍCHA, M., MATOUŠKOVÁ, O., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2009) Enatiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 1937–1942. **IF (2009): 2,777**
2. CHYTIL, L., MATOUŠKOVÁ, O., ČERNÁ, O., POKORNÁ, P., VOBRUBA, V., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2010) Enatiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 481–486. **IF (2009): 2,777**
3. CHYTIL, L., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., ŠTRAUCH, B., WIDIMSKÝ, J., JR., ŠTÍCHA, M., SLANAŘ, O. (2010) Development of a fast LC-MS/MS method for quantification of rilmenidine in human serum: elucidation of fragmentation pathways by HRMS. *J Mass Spectrom* **45**: 1179–1885. **IF (2009): 3,411**
4. CHYTIL, L., ŠTRAUCH, B., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., WIDIMSKÝ, J., JR., HOLAJ, R., SLANAŘ, O. (2010) Determination of doxazosin and verapamil in human serum by fast LC-MS/MS: application to document non-compliance of patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 3167–3173. **IF (2009): 2,777**
5. CHYTIL, L., MAREŠOVÁ, V., SLANAŘ, O. (2011) Průkaz benzodiazepinů v moči pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. *Soud lék.* **56**: 10–16.
6. MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* **IF (2009): 1,671** (v tisku)
7. MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupillometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* **149**: 66–68.

PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěl poděkovat svému školiteli docentovi MUDr. Ondřeji Slanařovi, PhD. za odborné rady, laskavou pomoc a vedení.

Dále děkuji kolegům z Farmakologického ústavu 1. LF UK a VFN, panu profesoru MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za to, že mi umožnili realizovat část této práce. Mé další poděkování patří i kolektivu pracovníků Toxikologického oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN pod vedením paní primářky Ing. Evy Novákové, Csc. za možnost použít nejmodernější analytické metody při realizaci velké části práce. Za zajímavé náměty a spolupráci bych chtěl poděkovat také pracovní skupině pana profesora MUDr. Jiřího Widimského ml., CSc. z III. interní kliniky 1. LF UK a VFN.

1 ÚVOD

Laboratorní diagnostika patří mezi základní vyšetřovací metody v medicíně. Současné moderní metody analytické chemie umožňují stanovit celou řadu látek v klasickém i alternativním biologickém materiálu. Zejména technické pokroky ve spojení chromatografie a hmotnostní spektrometrie umožnily prudký rozvoj aplikací v medicíně a biologii. Ve farmakologii a toxikologii patří tyto metody zdaleka mezi nejrozšířenější prostředky pro zjištění kvalitativního nebo kvantitativního obsahu látky v biologickém vzorku.

Achirální chromatografické analýzy se už léta rutinně používají například v rámci optimalizace farmakoterapie pro stanovení látek s nízkým terapeutickým indexem u chronicky léčených pacientů, neboť variabilita farmakokinetiky léčiv u lidí je považována za jednu z nejvýznamnějších příčin interindividuální odlišnosti lékové odpovědi na podávané léčivo. V toxikologické praxi se achirální chromatografické separace používají jak pro potvrzení cizorodé substance po předchozím skupinovém screeningovém záchytu, tak i pro kvantitativní doplnění toxikologického vyšetření. Neméně významné je použití achirálních chromatografických metod za účelem stanovení koncentrace etanolu a podobných látek.

Chirální separace nejsou zatím obvykle prováděny v běžném režimu laboratoře klinické farmakologie nebo toxikologie vzhledem k technickým obtížnostem, jež takový typ analýz doprovází. Jejich provoz se soustřeďuje spíše do laboratoří výzkumných center univerzit nebo soukromých subjektů. Je ale nutné dodat, že čím méně jsou tyto techniky rozšířené, tím zajímavější poznatky o metabolismu léčiva podléhajícímu stereospecifickému metabolismu mohou přinést.

Jednou z nových oblastí, kam chromatografické techniky úspěšně pronikly, je mimo jiné farmakogenetika, která se jako nový obor zabývá geneticky podmíněnou variabilitou odpovědi organismu na podané léčivo. Pomocí poměrů koncentrace metabolitů a mateřské látky, která byla stanovena achirální chromatografií, je možné odhadnout funkčnost enzymu popř. genetickou predispozici, odpovídajících za metabolizaci daného léčiva. Analogicky lze při použití chirální analýzy stanovit poměr koncentrací izomerů dané

látky a zjistit tak, který isomer je přednostně odbouráván stereospecifickým metabolismem.

Tato práce je předkládána jako komentovaný soubor prací, zabývajících se vývojem chromatografických metod a jejich aplikací ve farmakologii a toxikologii. Součástí je kromě popisu vývoje postupů také vyhodnocení naměřených výsledků a objasnění jejich významu pro experimentální výzkum i klinickou praxi. První část práce je věnována vývoji metod pro chirálního stanovení tramadolu a jeho metabolitu v plazmě a moči, což může být po porovnání s fenotypem přínosné pro predikci výskytu nežádoucích účinků u konkrétní skupiny pacientů. Druhá část práce se zabývá problematikou stanovení sérových hladin různých antihypertenziv, jako nástroje pro průkaz non-compliance. V poslední části je popsán vývoj metody pro kvalitativní průkaz benzodiazepinů v moči. Vzhledem k četnosti výskytu intoxikací těmito léky a dosavadní absenci univerzální detekční metody by vyvinutá metoda podstatně ulehčila postupy v toxikologické analýze a dokázala by řešit případy, které dosavadními způsoby zůstávaly neobjasněny.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod, které tvoří podstatnou část instrumentální analytické chemie. Dnes se chromatografické techniky mohou vyskytovat v mnoha formách, které mohou být různě modifikovány tak, že by bylo nemožné podat jednoduché rozdělení, které by zahrnovalo všechny tyto formy. Z toho důvodu je vhodné zavést základní rozdělení podle skupenství mobilní fáze na plynnou (plynová chromatografie-GC) a kapalnou (kapalinová chromatografie-LC).

Chromatografie využívá dělení analytu mezi dvě fáze. Jedna fáze je pohyblivá (plyn nebo kapalina) a je označována jako fáze mobilní. Druhá fáze je nepohyblivá a obvykle se označuje termínem stacionární. Někdy je tato stacionární fáze tvořena částicemi pevné fáze, jindy jde o tenký film kapaliny nanesený na vnitřních částech kapiláry. Pro jednoduchost je pro stacionární fázi všeobecně zavedeno označení sorbent. Kolonou, kterou je naplněn sorbent, prochází určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony je vložen vzorek obsahující jednotlivé složky (analyty). Vzorek je unášen mobilní fází ke konci kolony, přičemž složky postupují kolonou pomaleji než mobilní fáze, a to tak, že jedna složka má jinou rychlost než složka druhá (složky jsou různě retardované). Některé látky ovšem nebývají retardovány vůbec, což znamená, že neinteragují s povrchem sorbentu a nejsou tedy vůbec separovány. Naopak čím větší interakce, tím je čas pro projití kolonou (retenční čas) vyšší. V některých případech zase může dojít k současné koeluci více složek, což vyžaduje dodatečnou optimalizaci chromatografické separace vedoucí k rozdělení analytů nebo zařazení selektivního detektoru. Instrumentace, na níž se chromatografie provádí, je chromatograf, jehož detektor počítačově zpracovává měřený signál a vyhotovuje záznam tzv. chromatogram.

2.1.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Principem plynové chromatografie je distribuce složek směsi mezi plynnou (mobilní) a kapalnou nebo tuhoun (stacionární) fází. Látka, která má být analyzována pomocí GC

musí být schopna definovaně přejít do plynné fáze, aniž by došlo k rozkladu. Obvyklou horní hranicí je 400°C. Mobilní fází (nosným plynem) je plyn, který umožňuje transport složek kolonou a přitom nereaguje se složkami vzorku a aktivně se neúčastní separačního procesu. Jako mobilní fáze v GC se používají tzv. permanentní plyny (helium, dusík, vodík nebo argon).

Další základní částí instrumentace pro GC je detektor, jehož hlavním úkolem je rozpoznat průchod samotného nosného plynu a nosného plynu obsahujícího složku vzorku. Detektory v GC jsou většinou málo specifické (vyjma hmotnostního detektoru) a pro perfektní identifikaci je nutné kvalitní rozdělení složek již během chromatografického procesu. Pro farmakologické a toxikologické aplikace se obvykle používají následující typy detektorů:

1. Plamenový ionizační detektor (FID)
2. Dusíko-fosforový detektor (NPD)
3. Plamenový fotometrický detektor (FPD)
4. Hmotnostní detektor (MS)

Pro každý analyt resp. skupinu analytů je vhodný jiný detektor - například pro látky obsahující dusík je vhodný detektor NPD a pro látky s uhlíkem schopným hydrogenace se používá FID.

2.1.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Kapalinová chromatografie je charakterizována použitím kapaliny jako mobilní fáze. Obecně se LC s výhodou používá pro analýzu termolabilních, větších a polárnějších molekul. V analýze léčiv má kapalinová chromatografie nesporné výhody oproti GC. Mezi ně se řadí vyšší ovlivnitelnost účinnosti separace než v případě GC nebo možnost analýzy polárních analytů bez nutnosti zavedení derivatizačního kroku. Dále k jejím nesporným výhodám patří flexibilita, nízké provozní náklady, možnost automatizace a v neposlední řadě také možnost využití celé řady selektivních detektorů, z nichž patří mezi nejběžnější:

1. Fluorescenční detektor
2. Detektor pro látky absorbující UV nebo viditelnou část spektra (UV/VIS)
3. Hmotnostní detektor (LC-MS) popř. tandemový hmotnostní detektor (LC-MS/MS)

Analogicky jako v plynové chromatografii, i zde jsou způsoby detekce vybírány podle povahy analyzované látky. Pro látky absorbující v oblasti UV nebo viditelné oblasti spektra je možné použít velmi univerzální UV/VIS detektor. Pro fluoreskující látky nebo pro látky po derivatizaci speciálním činidlem je vhodné použít fluorescenční detektor, který je tyto látky mimořádně citlivý (10-100krát citlivější než UV/VIS). V poslední době se stále více dostává do popředí spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem, který rozlišuje eluované složky podle molekulové hmotnosti. Jeho modifikace, kde se používá tandemového uspořádání více hmotnostních detektorů (LC-MS/MS nebo obecněji LC-MSⁿ), pak umožňuje selektivnější a citlivější analýzu, která může být použita pro téměř všechny typy organických molekul. S vysokou citlivostí a selektivitou se pojí další výhody, jako například minimální úprava vzorku, což je vysoce ceněno, zejména pokud je výsledek rychle očekáván, nebo pokud je nutno analyzovat velkou sérii. Potenciální nevýhodou je jeho pořizovací cena.

2.2 ACHIRÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE VE FARMAKOLOGII A TOXIKOLOGII

Achirální GC se postupným vývojem stala nepostradatelnou v kvalitativních i kvantitativních analýzách. Také vývoj kapilárních kolon, které podstatně zvyšují účinnost separace, přispěl k nevídanému rozšíření této metody. Jak již bylo uvedeno, GC se používá pro látky, které je možné uvést do plynné fáze, což v praxi znamená, že metodu lze použít pro látky, jejichž molekulová hmotnost obvykle nepřesáhne 600 Da. Větší molekuly už jen těžko procházejí kolonou plynového chromatografu a je proto vhodné použít pro jejich analýzu LC. Rovněž látky s polárními funkčními skupinami (např. karboxy-, hydroxy- a aminoskupiny) nelze bez obtíží analyzovat, neboť příliš silně interagují se stacionární fází. Výsledkem jsou pak nesymetrické a táhlé peaky na chromatogramu, které znesnadňují nebo znemožňují další interpretaci a kvantifikaci. Tento problém lze do určité míry řešit chemickou derivatizací (maskování polárních skupin analytu). Derivatizované analyty dávají symetrické peaky a často i razantně vzroste citlivost metody. Jestliže je nutné analyzovat polárnější nebo větší molekuly, je výhodnější použít kapalinovou chromatografii.

Hlavní použití kapalinové chromatografie pramení z jejich výhod, které byly částečně popsány v předchozích částech. Všeobecně se používá k achirální analýze léčiv a jiných

toxikologicky významných látek isokratická eluce (konstantní složení mobilní fáze) nebo gradientová eluce (mění se složení mobilní fáze během analýzy), která umožňuje často účinnější separaci, což má smysl zejména ve screeningových metodách. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel, který je chemicky modifikován různými funkčními skupinami (např. oktadecyl, amino, fenyl a další). K němu se jako mobilní fáze používá směs polárních rozpouštědel (nejčastěji acetonitril, metanol, voda) a jedná se o tzv. chromatografii na obrácených či reverzních fázích.

2.2.1 ACHIRÁLNÍ GC ANALÝZA VE FARMAKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH

V minulosti byla plynová chromatografie používána v klinických laboratořích pro stanovení léčiv, u kterých je nutné sledovat sérovou koncentraci zejména kvůli jejich úzkému terapeutickému indexu, respektive pro jejich velký toxikologický potenciál. Takovými léčivy jsou především antiepileptika I. a II. generace (Varma, 1978; Hershey et al., 1979) nebo paracetamol (Becherucci et al., 1981) popř. kyselina salicylová (Kakkar & Mayersohn, 1998). Dnes už jsou tato léčiva standardně stanovována enzymatickými metodami.

Zajímavé jsou i aplikace, kde je nutné stanovovat farmakokinetický profil individuálně pro každého pacienta zvláště s následným výpočtem důležitých farmakokinetických údajů, které slouží pro výpočet velikosti dávky léčiva, která zajistí ustálenou koncentraci účinné látky v séru tak, aby pacient nebyl zbytečně poškozován nadbytkem účinné látky a zároveň aby nedocházelo k poddávkování. Takovou látkou může být například i dnes hojně využívané antituberkulotikum isoniasid (Lauterburg et al., 1981), který spolu se svými metabolity může způsobit jaterní poškození (Mitchell et al., 1976).

Použití GC analýz v bioekvivalenčních studiích bylo rozšířeno spíše na konci minulého století (Abernethy et al., 1984; Midha et al., 1984; Chan et al., 1985; Powell et al., 1985; Noonan et al., 1986; Yang et al., 1990; Franke et al., 1995; Dal Bo et al., 1997; Merslavic & Zupancic-Kralj, 1997), poněkud řidčeji lze nalézt v literatuře i novější aplikace (Niopas et al., 2004; Jhee et al., 2006; Li et al., 2008), neboť dnes jsou tyto studie zpracovávány téměř výlučně na podkladě LC měření.

2.2.2 ACHIRÁLNÍ GC ANALÝZA V TOXIKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH

Na úvod je nutné předeslat, že aplikace, které byly uvedeny jako příklady pro achirální GC metody v analýze léčiv sloužící pro terapeutické použití mohou být stejně tak použity pro stanovení sérové hladiny léčiva požitého při masivní intoxikaci v rámci toxikologického vyšetření. Z tohoto důvodu bude následující oddíl věnován pouze GC metodikám pro kvalitativní nebo semikvantitativní screeningová vyšetření na neznámou látku a metodikám pro identifikaci a kvantifikaci drog.

Stejně jako kvantitativní analýzy léčiv, tak i screeningová vyšetření bývají dnes často prováděna na systémech kapalinové chromatografie. Je to dáno jednak nepoměrně jednodušší přípravou biologického vzorku a jednak omezením GC analýz souvisejících s povahou analyzovaných léčiv. Nástup LC ovšem není tak razantní jako v oblasti kvantifikačních metod. Velké množství prací zabývajících se GC screeningovým vyšetřením se objevuje od osmdesátých let dvacátého století (Caldwell & Challenger, 1989; Dawling et al., 1990; Maurer, 1992) až do současnosti (Peters et al., 2003; Marešová et al., 2008). Dále lze nalézt několik přehledných prací, které se snaží objektivně porovnat screeningové metody plynové a kapalinové chromatografie (Poletti, 1999; Maurer, 2004).

Velmi rozšířené jsou metody pro vyšetření budivých aminů (Bruce & Maynard, 1969; Lebish et al., 1970; Terada et al., 1982; Cheung et al., 1997; Peters et al., 2003), opiátů (Edlund, 1981; Kintz & Mangin, 1995), kokainu s metabolity (Jatlow & Bailey, 1975; Taylor et al., 1987; Burdick et al., 1997), kanabinoidů (Clatworthy et al., 1990; Musshoff et al., 2002), buprenorfinu (Moody et al., 1997; Fuller, 2008) a metadonu (Norlander et al., 1986). Zatímco metody pro analýzu LSD pomocí GC již nejsou tak rozšířené (Musshoff & Daldrup, 1997). Hladina kyanidu v krvi může být rovněž stanovena pomocí GC (Calafat & Stanfill, 2002), stejně jako hladina karboxylhemoglobinu (Mayes, 1993), který vzniká při intoxikaci oxidem uhelnatým.

2.2.3 ANALÝZA ETANOLU A PODOBNÝCH LÁTEK

Etanol a těkavé látky tématicky spadají do skupiny toxikologických analýz, zde jsou ovšem vzhledem ke své specifičnosti zařazeny jako samostatná kapitola.

Etanol patří spolu s kofeinem a nikotinem mezi tzv. společenské drogy a jen raritně je používán ve farmakoterapii, kde nachází uplatnění jako dezinfekční prostředek a antidotum při intoxikacích metanolem a glykoly. O poznání důležitější roli hraje etanol na

poli toxikologické analýzy. Obvykle je alkohol, podáván jako složka nápojů, v nichž se jeho obsah různí. Endogenní obsah etanolu v krvi (1.5 mg/l), vzniklý pravděpodobně v gastrointestinálním traktu v lidském těle byl také popsán (Lester, 1962).

Kromě GC lze k analýze alkoholu použít i chemické nebo enzymatické metody, ty však nejsou předmětem této práce. Analýza GC s použitím FID detektoru začala vstupovat do praxe v šedesátých letech minulého století (Lester, 1962; Cooper, 1971). Metodika se postupně vyvíjela především z hlediska zpracování vzorku krve: z klasického nástřiku naředěné krve v roztoku vnitřního standardu se postupně přešlo na tzv. headspace analýzu (analýza par, uvolněných z krve po definovaném zahřátí) (Wilkinson et al., 1975), která je dnes standardně používanou metodou.

Ze široké škály alkoholů, které bývají nezhřídka předmětem toxikologických vyšetření, stojí v popředí metanol a etylenglykol jako původci často fatálních otrav. Metody vyvinuté pro determinaci etanolu jsou povětšinou použitelné i pro stanovení metanolu. Též neméně důležité je stanovení formaldehydu (Takeuchi et al., 2007) a kyseliny mravenčí (Abolin et al., 1980) jako hlavních produktů metabolizace metanolu. Rovněž stanovení etylenglykolu (Peterson & Rodgeron, 1974; Balíková & Kohlíček, 1988) je vhodné doplnit i o stanovení kyseliny glykolové (Porter et al., 1999), jako meziprojektu metabolické přeměny. Výsledek pak může podat důležité informace o progresi otravy. Zajímavá je i metoda pro simultánní determinaci etylenglykolu a etanolu (Brown et al., 1968), která poskytuje informaci o koncentraci noxy i použitého antidota, což je rozhodující pro posouzení účinnosti terapie intoxikace. Z dalších těkavých látek, které bývají analyzovány pomocí GC, stojí za zmínku toluen (Peterson & Bruckner 1978), který je často zneužíván narkomany pro svou relativně jednoduchou dostupnost.

2.2.4 ACHIRÁLNÍ LC ANALÝZA VE FARMAKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH

Majoritní využití achirální kapalinové chromatografie ve farmakologii zahrnuje stanovení plazmatických nebo sérových hladin pro terapeutické monitorování léčiv (TDM), farmakokinetické (včetně bioekvivalenčních) a metabolické studie. V následujícím textu budou uvedeny příklady konkrétních LC aplikací, které není možné provést pomocí plynové chromatografie. Dále se bude na konkrétním případě demonstrovat srovnání obtížnosti stanovení sérové hladiny vybraného léčiva pomocí plynové a kapalinové chromatografie.

Početnou skupinu léčiv, pro jejichž analýzu je možné použít kapalinovou chromatografii, tvoří například léčiva používaná pro imunosupresi, jakými jsou tacrolimus (Keevil et al., 2002), sirolimus (Maleki et al., 2000) nebo cyklosporin (Yee et al., 1982). U těchto léčiv se dnes rovněž často provádí kvantitativní analýza pomocí imunochemických metod. Nabízí se tedy srovnání přesností obou metod. Jako příklad může posloužit porovnání enzymové imunometody (EMIT) a LC-MS metody pro cyklosporin a tacrolimus (Ansermot et al., 2008): u komerčně dostupné metody EMIT bylo ve 23 % případů pro cyklosporin a ve 30 % pro tacrolimus naměřeno odlišné množství, než jaké bylo naměřeno pomocí LC-MS. Odchylka byla v rozmezí mezi 6 a 46 % u cyklosporinu, zatímco pro tacrolimus byl rozdíl ještě znatelnější – 3 až 73 %. Odlišné hodnoty byly způsobeny zkříženými reakcemi metabolitů obou analytů, které způsobují vyšší odezvu analytického systému EMIT. Zjištěný závěr poukazuje na nutnost zavádění specifických chromatografických metod pro některé aplikace v oblasti TDM.

Další velmi obsáhlou skupinou léčiv, která bývají analyzována tradičně LC metodami jsou antibiotika, antimykotika, a antivirotika. Například antibiotikum rifampicin, které bývá dosud užívané jako antituberkulotikum, se dnes výhradně stanovuje pomocí kapalinové chromatografie (Allanson et al., 2007). Imunochemické metody nebyly vyvinuty vzhledem k malé preskripci plynoucí z omezené indikace. Obdobná situace je u často používaných azolových antimykotik flukonazolu (Kim et al., 2007) nebo itraconazolu (Poirier et al., 1994). Z aplikací určená pro antivirotika stojí za zmínku metoda pro simultánní stanovení jedenácti antiretrovirotik používaných u pacientů infikovaných virem HIV (Martin et al., 2009). Obecně simultánní metody mají nesporné výhody jednak pro laboratorní přípravu, kde se z jednoho extraktu séra nebo plazmy dá provést více stanovení, a jednak pro samotného pacienta, kterému je odebíráno podstatně menší množství krve.

Ze široké škály aplikací LC metod lze ještě uvést metodiky, které se zabývají kvantitativním stanovením inhibitorů ACE perindoprilu (Jain et al., 2006) a ramiprilu (Tan et al., 2009) včetně jejich účinných metabolitů. Uvedené metody lze rutinně používat pro bioekvivalenční studie.

Zajímavá je situace v oblasti stanovení antiepileptik III. generace, na kterém se dá ukázat srovnání GC a LC. Sérové hladiny topiramátu se dají stanovit jak pomocí GC (Riffitts et al., 1999) a stejně tak s využitím LC (Park et al., 2008). Pro srovnání: pokud byla použita

plynová chromatografie, trval chromatografický běh 9 minut, naproti tomu pokud se použila kapalinová chromatografie, běžela chromatografie 3 minuty. Není těžké zjistit jaká je časová úspora při analýze pěti vzorků a jaká je úspora při analýze 1200 vzorků tvořící podklad rozsáhlé bioekvivalenční studii.

2.2.5 ACHIRÁLNÍ LC ANALÝZA V TOXIKOLOGICKÝCH APLIKACÍCH

Toxikologické aplikace pro kapalinovou chromatografii v sobě zahrnují jednak metody pro stanovení léčiv a ilegálních drog, tak i kvalitativní screeningová vyšetření a postupy pro identifikaci toxikologicky významné noxy v rámci provedení systematické toxikologické analýzy (STA). Kvantitativní stanovení léčiv se analogicky jako v oblasti GC analýz překrývá s aplikacemi farmakologickými. Vzhledem k tomu, že předchozí kapitola se věnovala monitoringu léčiv, která v toxikologické praxi nebývají až tak častá (vyjma antiepileptik), bude v této kapitole z kvantitativních metod připomenuto několik aplikací pro léčiva, která mohou hrát důležitou roli i v toxikologické praxi. Zejména se jedná o léčiva používaná pro léčbu psychiatricky nemocných.

Poněkud časté jsou aplikace simultánní stanovení více léčiv. Zajímavé jsou metody pro determinaci antidepresiv (Alves et al., 2007), benzodiazepinů (Marin et al., 2008) či neuroleptik (Josefsson et al., 2003). S výhodou lze tyto metody použít nejen pro doplnění toxikologické analýzy o kvantitativní vyšetření, ale i pro TDM u psychiatricky léčených pacientů.

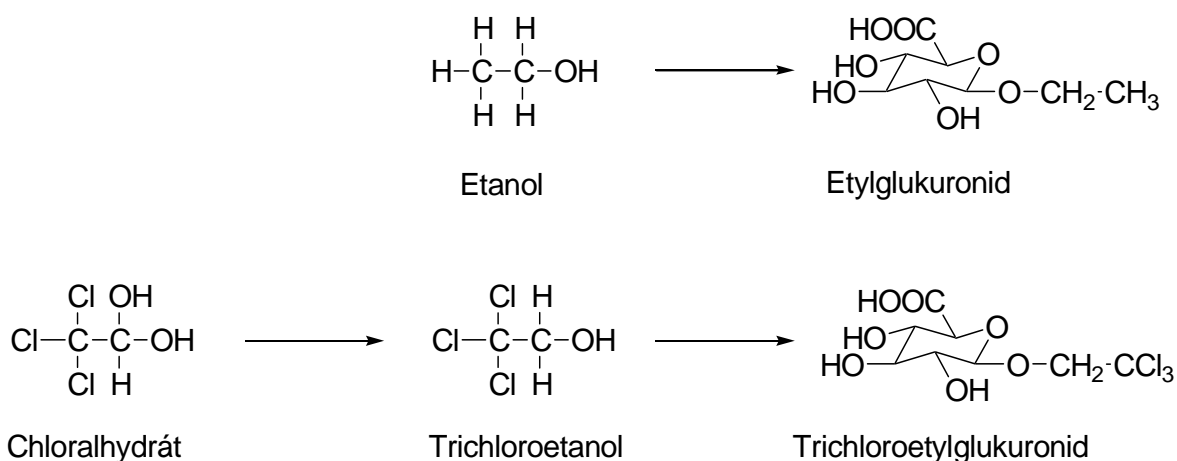
Rutinní použití kapalinové chromatografie pro kvalitativní screeningová vyšetření ze začátku naráželo na několik překážek: změny retenčních časů eluentů způsobených neschopností udržet stálé podmínky chromatografické separace, absence univerzálního detektoru zaručujícího detekci všech látek a nemožnost gradientové eluce. Postupem času se některé překážky podařilo překonat. Zejména pak systém REMEDI s předřazenou on-line extrakcí vzorku, který se skládal z předepsané kolony a UV detektoru, pracující za standardizovaných podmínek, umožnil provedení rychlého screeningového vyšetření. Standardizované podmínky zaručovaly relativně dobré výsledky v krátkém čase, což se stalo předpokladem i komerčního úspěchu. Následovalo zavedení detektoru diodového pole (DAD), se kterým lze souběžně měřit absorbanci eluovaných látek spojitěji v poměrně širokém rozsahu vlnových délek, což lze použít pro identifikaci jednotlivých peaků. Pokud jsou dodrženy definované postupy přípravy vzorku a retenční data jsou

konstantní, pak lze LC-DAD systémy s kvalitní UV spektrální databází zařadit mezi standardní postupy používané v STA (Maurer, 2000).

V devadesátých letech minulého století následovalo postupné zavádění LC-MS resp. LC-MS/MS (Maurer, 2007). To přineslo do praxe mnohá ulehčení zavedením nových screeningových metod, které vzhledem k selektivní hmotnostní detekci nevyžadují tak důkladnou chromatografickou separaci, neboť koeluuující látky jsou rozděleny až v detektoru. Zároveň příprava vzorku není obvykle tak zdlouhavá jako je tomu v GC screeningových metodách. Paradoxně obě tyto výhody mohou uškodit: Při nedostatečné izolaci sledovaných molekul z biologického materiálu může docházet k interferenci (vedoucí k falešné pozitivě) způsobené přítomností endogenních látek, a při nedostatečné chromatografické separaci může vyvolat falešnou pozitivitu koeluuující strukturně podobná sloučenina. Příkladem může být LC-MS/MS metoda pro determinaci atropinu v séru, kde došlo ke značnému zkreslení výsledku způsobenému přítomností metabolitu kokainu benzoyllecgoninu v jednom z analyzovaných vzorků (Boermans et al., 2006). Chromatografická separace byla provedena na velmi krátké koloně (nedošlo k rozdělení obou substancí), navíc obě látky měly totožnou molekulovou hmotnost (289 Da) a shodný nejintenzivnější fragment (m/z 124) charakterizující obvykle danou strukturu. Kombinace obojího pak měla za následek zdánlivě extrémně vysokou hladinu atropinu. Z uvedeného příkladu je zřejmé, že ověření potenciálně interferujících strukturně obdobných látek tvoří neodmyslitelnou součást validace analytických metod, neboť podobné chyby mohou mít ve forenzních interpretacích závažné následky (Peters et al., 2007).

Použití LC-MS/MS pro confirmaci záchytu skupinového screeningového vyšetření na imunochemické bázi se v poslední době stává rovněž velmi rozšířené. V minulosti bylo prezentováno velké množství metod pro potvrzení opiátů (Edinboro et al., 2005), kanabinoidů (Boleda et al., 2007), LSD (Johansen & Jensen, 2005) nebo budivých aminů (Concheiro et al., 2007). Výhodou oproti GC confirmacím je absence derivatizačního kroku a podstatně kratší chromatografický běh: Zatímco v GC trvá derivatizace amfetaminů v extraktu z biologického vzorku 20 minut a chromatografická analýza dalších 20 minut (Marešová et al., 2006), při LC-MS/MS metodě se počítá pouze s 8 minutami pro chromatografickou analýzu a derivatizační krok úplně chybí (Concheiro et al., 2007). Z uvedeného lze tedy s jistotou tvrdit, že pro potvrzení záchytu některých drog lze použít

jak GC tak LC metody. Jiná je situace u analýzy etylglukuronidu, který slouží k průkazu požití alkoholu v době, kdy již samotný alkohol není v těle přítomen. Zde se konfirmace provádí téměř výlučně pomocí LC-MS/MS metod. Co se důležitosti konfirmace týče, stojí za zmínku případ, kdy při screeningovém vyšetření pomocí EMIT došlo k falešně pozitivnímu záchytu na zmíněný specifický metabolit alkoholu (Arndt et al., 2009). Specifické konfirmační vyšetření pomocí LC-MS/MS se ukázalo jako negativní. Postupným pátráním se zjistilo, že pacientka podstupující ambulantní protidrogovou léčbu užívá psychiatrem předepsaný chloralhydrát, jehož metabolit trichloroetylglukuronid interferuje s etylglukuronidem a způsobuje tak falešnou odezvu EMIT.



Obrázek 1: Chemické struktury etylglukuronidu a trichloretylglukuronidu (převzato z Arndt et al., 2009).

Ačkoliv se kapalinová chromatografie velmi rychle vyvíjí, je třeba připomenout, že řada toxikologických laboratoří stále používá chromatografii na tenké vrstvě (TLC) jako velmi flexibilní a účinný systém pro identifikaci nox v biologickém vzorku (Kaistha & Jaffe, 1972). V principu se jedná o planární uspořádání kapalinové chromatografie, kde stacionární fáze je nanášena na inertní podloží a jako mobilní fáze slouží směsi rozpouštědel o různé polaritě a pH.

2.3 CHIRÁLNÍ FARMAKOLOGIE

2.3.1 CHIRALITA MOLEKUL VE FARMAKOLOGII

Nejpřesněji lze chirální molekulu definovat jako takovou, která není totožná se svým zrcadlovým obrazem. Chirálním léčivem pak nazýváme léčivo, které je složeno z chirálních molekul, přičemž nemusí být známo zastoupení jednotlivých enantiomerů (Francotte & Lindner, 2006). Přibližně 25 % léčiv trhu vykazuje chiralitu účinné látky (Caldwell, 1995). Chiralita, podobně jako molekulární hmotnost nebo polarita, má velmi úzký vztah k účinku, toxicitě i metabolizaci léčiva. (Jamali, 1992). Opodstatnění tohoto jevu lze hledat již na molekulární úrovni. Biologické struktury jsou tvořeny chirálními makromolekulami (např. proteiny jsou tvořeny z levotočivých forem aminokyselin), které odlišně interagují s různými enantiomery malých molekul (Caldwell, 1995).

Z farmakokinetického pohledu je zřejmé, že pasivní procesy, jako například difúze molekuly léčiva membránami, nebudou ovlivněny stereospecifitou, zatímco interakce s transportéry nebo enzymy mohou vykazovat někdy i významné rozdíly pro jednotlivé enantiomery (Testa & Mayer, 1988; Jamali et al., 1989).

Chiralita molekul a její vztah k farmakodynamice zaměstnává vědecké týmy už dlouhá desetiletí. Již z prvních experimentů vyplynulo, že enzymy a receptory zodpovědné za účinek léčiva vykazují stereoselektivní preferenci. V letech 1900 až 1910 bylo prokázáno Cushnym, že účinky různých stereoizomerů adrenalinu, nikotinu a hyosciaminu jsou velmi rozdílné. Což přispělo ke vzniku hypotézy o třech pevně určených vazebných místech enzymu pro interakci s chirálním ligandem (Testa et al., 1990). V období druhé světové války a delší dobu po ní nebylo stereoselektivitě v účinku léčiv věnováno mnoho pozornosti. První práce dokazující, že stereoselektivita podaného léčiva může ovlivnit účinek léčiva na pacienta, byla podána až v sedmdesátých letech. Jednalo se o kvantitativní srovnání antiarytmického působení racemického propranololu a jeho pravotočivého izomeru (Coltart et al., 1971). S následným vývojem chirálních stacionárních fází pro chromatografii došlo i k rozšíření poznatků o farmakokinetických a farmakodynamických parametrech jednotlivých stereoizomerů.

Celkově může použití čistých izomerů namísto chirálních léčiv přinést významné výhody: zvýšení účinnosti, snížení dávkování léčiva, snížení interindividuální variability ve farmakokinetice i farmakodynamice a snížení rizika vzniku nežádoucích účinků nebo

toxicity léčiva vyplývající z hromadění neaktivního izomeru. Na experimentální úrovni vykazují izomery léčiv ve srovnání s racemáty také zjednodušení závislosti účinku na dávce (Hutt & Caldwell, 1983; Ariens, 1984). Z těchto důvodů jsou v posledních letech uváděny na trh přípravky čistých izomerů a pro potřeby farmakokinetických, farmakogenetických i ostatních klinických studií je nutné disponovat validovanými bioanalytickými metodami pro stereoselektivní stanovování koncentrací léčiv.

2.3.2 ČISTÉ IZOMERY JAKO LÉČIVA

V současnosti se vyskytuje na trhu řada léčiv, která obsahují pouze čisté enantiomery. Zavedení na trh předcházela řada studií porovnávacích jejich farmakokinetiku, terapeutické účinky a toxicitu ve srovnání s původním racemickým lékem. V následujícím textu uvádím příklady úspěšného zavedení čistých izomerů do farmakoterapie.

Cetirizin patří mezi antihistaminika druhé generace, používá se k léčbě alergických projevů u dětí a dospělých. Mechanismus účinku spočívá v reverzibilní vazbě na H_1 histaminové receptory a navození jejich účinné blokády. Cetirizin je tvořen racemickou směsí dvou izomerů-levocetirizinu a dextrocetirizinu. Randomizovanou, dvojitě zaslepenou studii na kožním provokačním testu bylo prokázáno, že při podání 5 mg cetirizinu a 2,5 mg levocetirizinu bylo dosaženo stejné odpovědi na podaný lék. Naopak, u dobrovolníků, jimž byl podán S-enantiomer, nebylo dosaženo žádného terapeutického účinku (Devalia et al., 2001). Tyto rozdíly v terapeutické účinnosti vznikají na podkladě odlišných farmakokinetických a farmakodynamických vlastností levocetirizinu a racemátu (Baltes et al., 2001; Tillement et al., 2003; Gupta et al., 2006; Shih et al., 2008).

Citalopram je používán pro léčbu deprese. Mechanismem jeho účinku je zvýšení koncentrace serotoninu na synaptické štěrbině inhibicí zpětného vychytávání tohoto neurotransmiteru do presynaptického zakončení. Citalopram je chirální léčivo obsahující racemickou směs S- i R- enantiomerů. V roce 2002 byl uveden na trh Escitalopram obsahující výlučně S-enantiomer. Ve studiích *in vitro* byl prokázán významný rozdíl ve smyslu alosterické inhibice zpětného vychytávání serotoninu: S-enantiomer byl přibližně dvakrát účinnější než racemát, a přibližně 130× účinnější než R-enantiomer (Sanchez et al., 2004; Zhong et al., 2009). Zajímavá jsou i pozorování, podle kterých racemická směs izomerů podávaná potkanům snižovala aktivitu 5-HT neuronů, zatímco samotný S-enantiomer ji prakticky neovlivňoval. Navíc samostatně podaný S-enantiomer zvyšoval

v oblasti *gyrus dentatus* počet nově vzniklých buněk, což nebylo možné pozorovat při podání racemátu (Mnie-Filali et al., 2007). Pozitivně byl hodnocen escitalopram v rozsáhlých kontrolovaných studiích, kde byl srovnáván s jinými preparáty pro léčbu deprese ze skupiny SSRI nebo SNRI, a jeho účinnost je i v klinických studiích vyšší než je účinnost citalopramu (Cipriani et al., 2009; Kennedy et al., 2009).

2.4 CHIRÁLNÍ CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA

2.4.1 CHIRÁLNÍ GC

Chirální separace pomocí plynové chromatografie mohou být provedeny dvěma způsoby. Jednak je možné použít k separaci chirální stacionární fázi, která svým složením (nejčastěji deriváty cyklodextrinů) umožňuje rozlišení enantiomerů. Nebo pokud analyt obsahuje reaktivní funkční skupiny, je možné uplatnit derivatizaci opticky čistými derivatizačními činidly za vzniku diastereoizomerů, které mohou být separovány na běžné achirální koloně (Flanagan, 2007).

Všeobecně chirální aplikace mají význam pro stanovení farmak s chirálním centrem, která podléhají stereoselektivnímu metabolismu. Výsledky jsou pak s výhodou využity ve farmakokinetických studiích pro jednotlivé enantiomery. Z farmakologických aplikací je vhodné zmínit chirální analýzu amlodipinu (Scharpf et al., 1994), *N*-alkylovaných barbiturátů (Ghanem, 2007), fenfluraminu (Srinivas et al., 1988), metylfenidátu (Lim et al., 1986), mephentoinu s metabolitem (Wedlund et al., 1984; Yao et al., 2001) a mexiletinu (Knoche et al., 1996).

Z hlediska toxikologie má velký význam chirální separace metabolitů antiparkinsonika Selegilinu, amfetaminu a metamfetaminu (Maurer & Kraemer, 1992). Selegilin je vylučován v moči jako *N*-desmetylselegilin (norselegilin), *R*-amfetamin a *R*-metamfetamin. Bylo zjištěno, že screeningová metoda fluorescenční polarizační imunoassay (FPIA), která se používá v řadě toxikologických laboratoří pro provedení nespécifických skupinových screeningových testů, ukazuje pozitivitu při provedení testu na budivé aminy u pacientů, kteří jsou chronicky léčeni selegilinem. Bohužel specifický metabolit norselegilin je možné zachytit jen asi 12 hodin, a proto je jako důkaz požití selegilinu nedostačující (ostatní metabolity je přitom možné zachytit až 7 dní). Jediným východiskem je tedy chirální separace amfetaminu a metamfetaminu na základě níž lze

spolehlivě rozlišit, zda patientský vzorek obsahuje pouze R- izomery amfetaminu a metamfetaminu, které vznikají metabolizací legálního preparátu, nebo jsou-li obsaženy i S- izomery, což poukazuje na zneužití ilegálního pervitinu.

2.4.2 CHIRÁLNÍ LC

Chirální kapalinová chromatografie je mnohem rozšířenější než chirální GC, což je opět způsobeno absencí omezujících podmínek vztahujících se ke struktuře analyzovaných látek. Obecně chirální LC je přednostně využívána i pro semipreparativní i preparativní techniky. Nevýhodou může být cena chromatografických kolon s chirální stacionární fází (CSP), a také fakt, že ve většině analýz je nutná separace na tzv. normální fázi, což představuje uspořádání, kde k polárnímu sorbentu je použita mobilní fáze s nepolární majoritou (např. hexan, heptan), což může přinést určité technické komplikace. Zřídka je možné použít i reverzní fázi, která musí být ovšem modifikována chirálním aditivem nebo musí dojít, podobně jako v chirální GC, k derivatizaci analytu chirálním činidlem. Jako CSP se často používají navázané amylosové polymery, cyklické étery, cyklodextriny, makrocyclické glykopeptidy nebo proteiny. A není pravidlem, že určitý typ CSP je univerzálně použitelný pro určitý typ sloučenin, z čehož vyplývá, že účinnost separace nelze odvodit ze struktury látky, ale je nutné použít zdlouhavé experimentální činnosti (Flanagan, 2007).

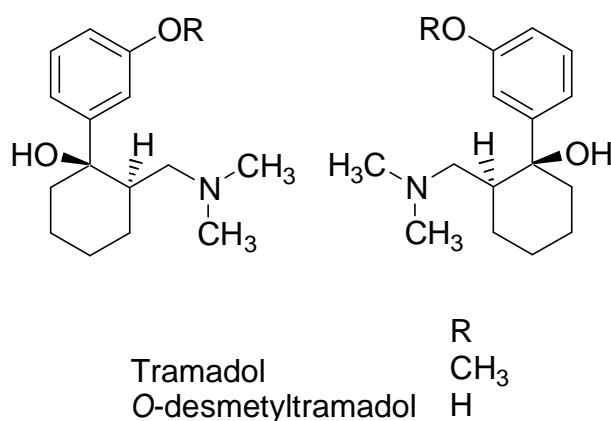
Ačkoliv chirální analýzy mají významnou pozici především v oblasti výzkumu a vývoje nových léčiv, lze dnes nalézt mnoho studií, které se zabývají enantiomerními poměry *in vivo*. Již v osmdesátých letech vznikaly první studie, které se snažily o zachycení chirálních změn při metabolizaci ibuprofenu (Avgerinos & Hutt, 1987), na niž navazuje další studie zaměřená na porovnání metabolismu enantiomeru S- ibuprofenu a racemické směsi (Evans, 2001). Enantioselektivní postmortem LC analýzou citalopramu a metabolitu *N*-desmetylcitalopramu ve venózní krvi z 53 zemřelých bylo dokázáno, že poměr S:R enantiomerů je $0,67 \pm 0,25$ pro mateřskou látku a $0,68 \pm 0,20$ pro metabolit a navíc poměr S:R narůstal se vzrůstající koncentrací citalopramu. Získané výsledky navíc odpovídaly výsledkům genotypizace CYP2D6 a CYP2C19 při absenci jiného léčiva, které by bylo substrátem nebo inhibitorem těchto enzymových systémů (Holmgren et al., 2004). Další zástupce ze skupiny SSRI, který byl rovněž chirálně stanovován byl fluoxetin (Shen et al., 2002). Z hlediska vývoje chirálních aplikací je zajímavé srovnání dvou metod pro stanovení

verapamilu s metabolitem (Fieger & Blaschke, 1992). V jedné metodě popisuje stanovení s předřazenou derivatizací na glykoproteinové CSP a ve druhé přímou analýzu bez nutnosti derivatizačního kroku na amylosové CSP.

2.5 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU

Tramadol (1*RS*, 2*RS*)-2-[(dimethylamin)methyl-1-(metoxyfenyl)-cyklohexanol] je centrálně působící analgetikum s analgetickým účinkem mezi slabými opioidy a morfinem, jež ve své molekule obsahuje dvě chirální centra, což umožňuje výskyt čtyř stereoisomerů. *trans* Tramadol (dále jen tramadol) se užívá v terapii jako racemát, ovšem chování každého enantiomeru se liší: (+)-tramadol (1*R*, 2*R*-tramadol) inhibuje především zpětné vychytávání serotoninu a (-)-tramadol (1*S*, 2*S*-tramadol) inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu (Paar et al., 1992; Dayer et al., 1997). Navíc bylo zjištěno, že (+)-tramadol je desetkrát účinnější než druhý enantiomer (Frankus et al., 1978).

Metabolická přeměna tramadolu je velmi obsáhlá – je známo 11 nekonjugovaných a 12 konjugovaných metabolitů (Wu et al., 2002). *N*-demethylace a *O*-demethylace mateřské látky probíhá za účasti třech enzymových systémů cytochromu P450: CYP2D6, CYP3A a CYP2B6.



Obrázek 2: Znázornění chiralit molekul tramadolu a *O*-desmethyltramadolu.

O-demethylací katalyzovanou enzymem CYP2D6 v játrech vzniká neaktivnější *O*-desmethyltramadol (ODT), který je pravděpodobně zodpovědný za vznik lékově navozené opioidní analgezie (Paar et al., 1992; Wu et al., 2002). (-)-ODT vykazuje

schopnost inhibice zpětného vychytávání monoaminů a (+)-ODT, jak bylo prokázáno studií na kryších, je schopen antinociceptivního efektu (Garrido et al., 2000). Ve studii prováděné s klonovanými lidskými opioidními receptory bylo prokázáno, že (+)-ODT vykazuje 200 krát vyšší afinitu než tramadol a je proto farmakodynamicky aktivní *in vitro* (Gillen et al., 2000).

Cytochrom P450 2D6 je vysoce polymorfní gen s více než 70 variantními alelami. Jeho polymorfismus může mít velký vliv na fenotyp vedoucí ke kompletním enzymovým deficitům u pomalých metabolizérů a částečný deficit u středních metabolizérů. Farmakokinetika tramadolu a jeho metabolitu je následně ovlivněna deficitem CYP2D6 (Slanař et al., 2007). Metabolismus katalyzovaný tímto enzymovým systémem je stereoselektivní (Poulsen et al., 1996; Pedersen et al., 2006; Halling et al. 2008). Geneticky predisponovaní pomalí metabolizéři měli hladinu (+)-ODT extrémně nízkou, zatímco ultrarychlí metabolizéři měli hladinu extrémně vysokou (Kirchheiner et al., 2008). Zatím ovšem neexistují přímé důkazy, že farmakokinetika závislá na genotypu má vliv na analgetické působení v klinické praxi a také, že farmakodynamické vlastnosti tramadolu jsou ovlivněny polymorfismem CYP2D6 (Slanař et al., 2007; Stamer & Stuber., 2007; Kirchheiner et al., 2008; Stamer et al., 2008). Díky metabolismu tramadolu, který je závislý na aktivitě CYP2D6, může být použit jako bezpečné léčivo k testování enzymové aktivity v humánních farmakogenetických studiích (Pedersen et al., 2005).

Náplní části postgraduálního studia bylo vytvoření analytické metody pro chirální stanovení tramadolu s metabolitem v moči i plazmě a pro následující klinické aplikace:

- fenotypizaci CYP2D6 *in vivo* pomocí modelového substrátu tramadolu
- terapeutické monitorování tramadolu u dětí různého věku hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče

2.6 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV V SÉRU PRO PRŮKAZ NON-COMPLIANCE

Spolupráce pacienta ve smyslu dodržování předepsaného dávkování léčiv je jedním ze základních pilířů úspěšné farmakologické léčby. Zatímco stanovení celé řady antiepileptik, antipsychotik a antidepresiv je dnes pro účely terapeutického monitorování běžně dostupné, stanovení antihypertenziv pro účel zjištění compliance nikoliv. Přičemž

neužívání předepsané medikace nejenže nutí ošetřujícího lékaře k hledání příčiny selhání léčebného postupu, ale je také velmi nebezpečné pro samotného pacienta. Dalším, neméně zanedbatelným aspektem, je i ekonomická stránka věci. Ať už se jedná o financování urgentní léčby náhle vzniklých stavů spojených s neléčenou hypertenzí, tak i o neúčelné vynakládání finančních prostředků z veřejného zdravotního pojištění na proplacení medikamentů, které jsou následně nesmyslně skladovány nebo vytváří toxický odpad.

Pro kontrolu dodržování léčebných postupů lze používat například kontroly vyzvednutí léčiv pacientem (Strocchi et al., 1996) nebo se balení léků opatřuje elektronickým počítadlem jednotlivých otevření a zavření (Andrejak et al., 2000). Určitým preventivním zásahem je i zavádění kombinovaných preparátů pro usnadnění dávkovacích schémat. Přímé stanovování obsahu léčiva v séru se začalo objevovat až v posledních letech (Maurer et al., 2004; Iriarte et al., 2006; Ferreiros et al., 2007; Gonzalez et al., 2009; Iriarte et al., 2009; Gonzalez et al., 2010). Metodiky pro sledování široké škály látek a současné zpracování získaných výsledků však chybí.

Dalším cílem doktorského studia bylo vyvinout analytické metody pro stanovení různých antihypertenziv (amlodipin, betaxolol, bisoprolol, spironolakton, doxazosin, hydrochlorothiazid, losartan, metoprolol, perindopril, ramipril, rilmenidin, telmisartan a verapamil) u pacientů léčených pro farmakorezistentní hypertenzi. Následně byla naměřená data statisticky zpracována, přičemž byl zkoumán vliv věku, pohlaví, počtu předepsaných léčiv a způsobu péče o pacienta na dodržování předepsané terapie.

Pro správnou interpretaci naměřených dat bylo nutné znát farmakokinetické údaje, na jejichž základě byla navržena vhodná doba odběru séra. Nezbytná je znalost biologického poločasu léčiva ($t_{1/2}$), maximální sérové koncentrace (C_{max}) a času do dosažení C_{max} (t_{max}). Aby měl výsledek vypovídající hodnotu, ve smyslu průkazu non-compliance je nutné odběr uskutečnit mezi očekávaným t_{max} a časem, kdy koncentrace v séru neklesne pod detekovatelnou mez analytické metody. Na základě velmi nízkých hodnot $t_{1/2}$ pro některá léčiva se místo původních forem stanovovaly jejich metabolity s delším $t_{1/2}$. V literatuře se uvádí hodnota $t_{1/2}$ pro spironolakton v rozmezí 1–2 hod, zatímco pro metabolit kanrenon, vzniklý odtržením thioacetalové skupiny od mateřské látky, se tato hodnota pohybuje mezi 14–20 hod (Cohen & Insel, 1996). Z tohoto důvodu se u pacientů užívajících spironolakton stanovuje pouze kanrenon. Obdobná je i situace u ACE inhibitorů

perindoprilu a ramiprilu, jejichž $t_{1/2}$ leží v rozmezí 0,8–1,5 hod pro perindopril a 1–5 hod pro ramipril (Schulz & Schmoldt, 2003). Obě léčiva jsou zařazována mezi tzv. proléčiva, jejichž metabolizací vznikají vlastní účinné látky s delšími $t_{1/2}$. V těchto konkrétních případech vznikají hydrolýzou esterové vazby aktivní substance perindoprilát a ramiprilát, které se stanovovaly místo původních forem. V případě losartanu se $t_{1/2}$ pohybuje v rozmezí 1–4 hod. (Ohtawa et al., 1993), což vede opět k jisté opatrnosti při posuzování compliance. Vzhledem ke komerční nedostupnosti metabolitu losartanu, sloučeniny EXP3174, jsme doporučili, odebírat krev pacientům pouze v rozmezí 1–6 hodin od užití poslední dávky. U dalších léčiv nebylo nutné konkretizovat čas odběru, vzhledem k příznivým farmakokinetickým parametrům.

2.7 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Přítomnost benzodiazepinů v biologickém materiálu se v toxikologické praxi obvykle prokazuje řadou na sebe navazujících vyšetření. Nejprve je biologický materiál podroben skupinovému screeningovému vyšetření nejčastěji na bázi imunochemických reakcí (např. EMIT, FPIA), které odhalí přítomnost blíže neurčeného benzodiazepinu (Pegon et al., 1982; Beck et al., 1990; DeRienz et al., 2008). Při pozitivním nálezu je vzorek dále vyšetřován specifickými chromatografickými metodami, kde se určuje, o který benzodiazepin se jedná, popřípadě se prokáže falešná pozitivita imunochemické metody. Fakultativně se v některých případech, provádí kvantifikace nálezu v krvi.

Odezva imunochemických screeningových metod může být vyhodnocena jako negativní, jako hraniční záchyt nebo jako záchyt. Vzhledem k množství léků, které jsou zařazeny mezi benzodiazepiny, lze jen těžko vytvořit imunochemický postup, který bude citlivý na všechny léky ze skupiny stejně. Proto je vybrána jedna struktura, pro kterou je systém vyvinut a pro další látky je posléze zkoušena citlivost. Po vyhodnocení se pak stanovuje jednotná hranice záchytu, resp. suspektního záchytu. V praxi to tedy znamená, že není možné na základě screeningového vyšetření pomocí imunochemických metod vyhodnotit, který benzodiazepin pacient požil a kolik ho bylo. Vzhledem k odlišné citlivosti pro různé struktury může nastat situace, že určitá odezva systému může znamenat subterapeutickou dávku látky, pro niž je skupinový screening citlivý nebo masivní intoxikaci lékem, pro který screening citlivý není.

Imunochemické metody jsou rychlé, snadno proveditelné a v současnosti tvoří nedílnou součást toxikologických vyšetřovacích schémat. Bohužel pro každou skupinu drog existují látky, způsobující zkříženou reaktivitu imunochemické reakce, a tím falešnou pozitivitu. Tento jev byl popsán u různých imunochemických metod pro amfetaminy (Kelly, 1990; Marin et al., 2009), opiáty (de Paula et al., 1998; Baden et al., 2001; Straley et al., 2006), kanabinoidy (Kovatsi et al., 2010), LSD (Rohrich et al., 1998), buprenorfin (Shaikh et al., 2008) etylglukuronid (Arndt et al., 2009) i benzodiazepiny (El-Haj et al., 2008; Blank et al., 2009; Nasky et al., 2009). Falešně pozitivní nález může mít pro pacienta samozřejmě závažné důsledky. Například pro pacienta vyšetřovaného z důvodu ověření abstinence, může znamenat vyloučení z odvykací terapie. Konečné ověření falešné positivity je možné získat pouze pomocí specifických chromatografických metod.

V toxikologické praxi, se lze nejčastěji setkat s nálezy diazepamu, alprazolamu, bromazepamu, tetrazepamu, klonazepamu a midazolamu. Méně často se vyskytuje chlordiazepoxid, flunitrazepam nebo nitrazepam (v současnosti již nejsou poslední dva jmenované v ČR registrovány). Diazepam podléhá *N*-demetylace za vzniku účinného metabolitu nordiazepam, který je hydroxylován na sedmičlenném kruhu za vzniku 3-hydroxynordiazepam (oxazepam). Alternativní cestou je hydroxylace sedmičlenného kruhu diazepam za vzniku 3-hydroxydiazepam (temazepam). Oxazepam i nordiazepam podléhají konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo sírovou (Večerková, 1997). Kyselou hydrolyzou vzniklých glukuronidů, lze získat 2-amino-5-chlorbenzofenon (ACB). Konjugaci podléhá i 3-hydroxydiazepam, který po kyselé hydrolyze poskytuje 5-chlor-2-(methylamino)benzofenon (MACB) (Schütz, 1986). Současným nálezem ACB a MACB ovšem nelze spolehlivě prokázat požití samotného diazepam, jelikož ten sám může vznikat i biotransformací jiných látek, například medazepamu nebo tetrazepam (Schutz et al., 1985; Maurer & Pflieger., 1987; Balíková, 2004). Stejně tak i jeden z prekurzorů ACB nordiazepam, může vzniknout biotransformací chlordiazepoxidu, což opět vylučuje jednoznačný závěr. Naopak kyselou hydrolyzou bromazepam a jeho metabolitů lze získat (2-amino-5-bromfenyl)(pyridin-2-yl)metanon (ABP), jednoznačně poukazující na přítomnost původní formy (Schütz, 1986). Redukcí nitroskupin klonazepam, flunitrazepam a nitrazepam vznikají charakteristické aminoderiváty: 7-aminoklonazepam (RC), 7-aminonitrazepam (RN) a 7-aminoflunitrazepam (RF), jejichž nález dokazuje požití mateřských látek (Večerková, 1997). Alprazolam se vylučuje z 20 %

v nezměněné podobě a dále asi ze 17 % ve formě α -hydroxyalprazolamu, který pak vytváří konjugát s kyselinou glukuronovou (Joern & Joern, 1987). Analogicky dochází k hydroxylaci u midazolamu s následnou konjugací (Reves et al., 1985).

Poznatky o metabolických cestách patří k nutným znalostem, při vývoji analytické metody. Doposud bylo popsáno mnoho analytických postupů, které umožňují detekci benzofenonů (Schütz, 1986; Cardenas et al., 1998), redukovaných forem (Negrusz et al., 2003; Hackett & Elian, 2006), tetrazepamu (Maurer & Pflieger, 1987), alprazolamu (Joern & Joern, 1987; Balíková et al., 1999) a midazolamu (Ha et al., 1993) s metabolity. Pro průkaz benzofenonů a redukovaných metabolitů v moči se po dlouhá léta v četných laboratorních provozech používaly TLC metody (Večerková, 1994), zatímco pro detekci alprazolamu, midazolamu a jejich metabolitů bylo použito metod vycházejících z GC (Balíková et al., 1999). V současnosti již tenkovrstevná chromatografie nesplňuje požadavky, které si žádá moderní toxikologická analýza. Nevýhodou je velké množství zpracovávaného materiálu, náročné provedení hydrolýzy a interpretace chromatogramu, která je ztížena řadou interferujících artefaktů. Metody na bázi plynové chromatografie zase většinou vyžadovaly, kromě extrakce, zdlouhavou a nákladnou dekonjugaci pomocí β -glukuronidázy s následnou derivatizací. Vzhledem k těmto skutečnostem nebylo tedy ani možné počítat s prováděním GC analýz benzodiazepinů v rutinní praxi. V dnešní době můžeme k analýze benzodiazepinů a jejich metabolitů využít velmi rychlé a robustní kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní detekcí LC-MS/MS.

Cílem této části práce bylo vyvinout jednoduchou a spolehlivou analytickou metodu pro screeningové vyšetření na běžné benzodiazepiny nebo jejich metabolity v moči pomocí LC-MS/MS. Popis metody se soustředí jak na přípravu extraktu moče, tak i na optimalizaci metody pro tandemovou hmotnostní detekci. Během zavádění metody jsme kladli důraz na to, aby bylo možné uvedený postup rutinně používat v běžném provozu forenzní nebo klinické toxikologické laboratoře. Součástí práce jsou i statistiky ze zpracovaných reálných případů, které jsme řešili v rámci běžného laboratorního provozu.

3 CÍL PRÁCE

Cílem doktorského studia bylo vyvinout citlivé a přesné chromatografické metody pro analýzu léčiv z různých terapeutických skupin pro aplikace ve farmakologii a toxikologii. Konkrétně jsme pro použití ve farmakologických studiích a toxikologické praxi vybrali stanovení enantiomerů tramadolu a jeho aktivního metabolitu v moči a plazmě, stanovení antihypertenziv v séru a kvalitativní analýzu benzodiazepinů v moči. Enantioselektivní analýza tramadolu s metabolitem by měla zejména sloužit pro stanovení metabolického fenotypu, stanovení antihypertenziv jsme vybrali z důvodů objektivizace nedostatečné spolupráce pacientů a analytická metoda pro detekci benzodiazepinů by měla být zařazena mezi rutinní postupy v rámci klinické a forenzní toxikologické analýzy.

4 METODY

Použité metody jsou popsány *in extenso* v příložených publikacích. V následujícím textu jsou uvedeny postupy, které nebyly součástí publikovaných sdělení.

4.1 ANALYTICKÉ METODY

4.1.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Separace a kvantifikace enantiomerů tramadolu a ODT byla provedena dvěma různými analytickými metodami. K analýze v moči bylo použito chirální GC-MS, zatímco analýza v plazmě byla, vzhledem k nižším koncentracím, prováděna pomocí citlivé LC-MS/MS (podrobný popis vývoje metod uvedený v Přílohách 1 a 2). Dekonjugace ODT v moči byla provedena enzymaticky působením β glukuronidázy.

4.1.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Vzhledem k povaze stanovovaných látek (přítomnost polárních funkčních skupin a termolabilita) a počtu vzorků byla pro analýzu zvolena metoda LC-MS/MS. Pro extrakci analytů ze vzorků séra byla použita extrakce kapalina-kapalina (LLE; amlodipin, betaxolol, bisoprolol, kanrenon, doxazosin, hydrochlorothiazid, losartan, metoprolol, telmisartan a verapamil) nebo extrakce na pevné fázi (SPE; perindoprilát, ramiprilát a rilmenidin). Kvantifikační postupy byly validovány podle mezinárodně platných kritérií (Peters et al., 2007), a ověřovaly se u nich všechny důležité parametry (matricový efekt, výtěžnost extrakčního postupu, opakovatelnost, správnost, korelační koeficient kalibrační závislosti, selektivita a sensitivita). Validace a podrobný popis vývoje metod pro doxazosin, rilmenidin a verapamil jsou uvedeny v Přílohách 3 a 4.

4.1.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ

Benzodiazepiny a jejich metabolity byly detekovány pomocí LC-MS/MS. Samotné chromatografické analýze předcházela dvoustupňová LLE extrakce s předřazenou kyselou hydrolyzou sulfátů a glukuronidů benzodiazepinových metabolitů. Podrobněji je vývoj analytického postupu popsán v Příloze 5.

4.2 GENOTYPIZACE CYP2D6

Všechny metody genotypizace jsou založené na metodikách PCR, PCR-RFLP, eventuelně nested PCR-RFLP. Měření bylo prováděno na Farmakologickém ústavu 1. LF UK a VFN.

4.3 SOUBOR PACIENTŮ

4.3.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Klinická aplikace chirální analýzy tramadolu byla provedena ve dvou souborech pacientů. Obě klinické studie byly odsouhlaseny Etickou komisí VFN a probíhaly v souladu s platnými mezinárodními požadavky pro provádění klinických studií.

Do souboru dospělých pro stanovení fenotypu CYP2D6 se zařazovali zdraví dobrovolníci se známým genotypem CYP2D6. Vylučujícími kritérii pro zařazení bylo:

- gravidita nebo laktace
- přecitlivělost na tramadol
- jakékoliv chronické onemocnění
- účast v jiných klinických studiích během předcházejících 4 týdnů
- aktivní infekce
- alkoholický nebo lékový abus
- imunizace během předcházejících 4 týdnů

Do druhého souboru pacientů vyžadujících sledování hladin tramadolu byli zařazováni pacienti po získání informovaného souhlasu rodiče nebo jeho zákonného zástupce v následujících situacích:

- nedonošení novorozenci z 24.+(0) až 37.+(6) gestačního týdne se syndromem dechové tísně s nutností umělé plicní ventilace (UPV), nazální distenze (n-CPAP) s analgosedací
- donošení novorozenci z 38.+(0) gestačního týdne s analgosedací z téže indikace jako v předchozí skupině a dále novorozenci v bezprostředním pooperačním období
- kojenci do 1. roku věku s analgosedací ze stejné indikace jako v první skupině a kojenci v pooperačním období

- starší děti do osmnácti let věku s nutností analgosedace, případně umělé plicní ventilace nebo bezprostředně po operacích a jiných invazivních výkonech

4.3.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Pro prováděnou studii se vybírali pacienti, léčení pro hypertenzi, jejichž dosavadní léčebné postupy aplikované odborným lékařem v místě bydliště selhaly. Tito pacienti byli proto indikováni k vyšetření popř. hospitalizaci na specializovaném oddělení pro léčbu hypertenze III. Interní kliniky VFN a 1. LF UK v Praze. Pacientům byl odebrán vzorek krve při první návštěvě ambulance nebo při přijetí k hospitalizaci, přičemž byli seznámeni s účelem odběru.

4.4 METODY PRO STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT

Statistické vyhodnocení vlivu demografických údajů na compliance bylo prováděno testováním hypotéz použitím χ^2 na hladině významnosti $p < 0,05$. K porovnání rozdílů mezi skupinami jsme použili T test ($p < 0,05$). Výpočetní část byla provedena programem *STATGRAPHIC Plus*[®].

5 VÝSLEDKY

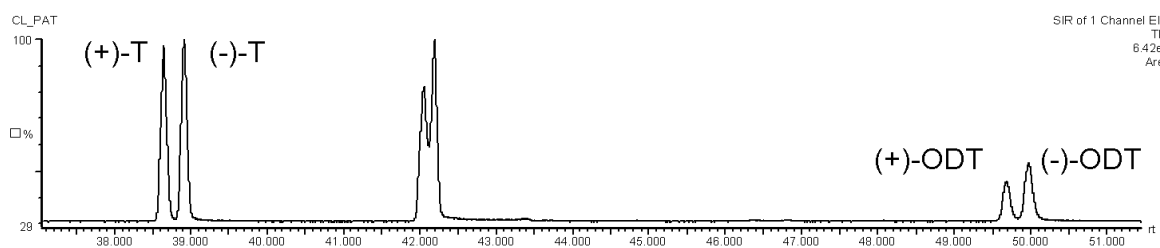
Výsledky a jejich diskuze k analytickým metodám jsou z velké části obsahem příložených publikací *in extenso*, kde se jim věnuje dostatečný prostor. Zde jsou probírány dosud nepublikovaná shrnutí, statistické analýzy a komentáře.

5.1 ANALYTICKÉ METODY

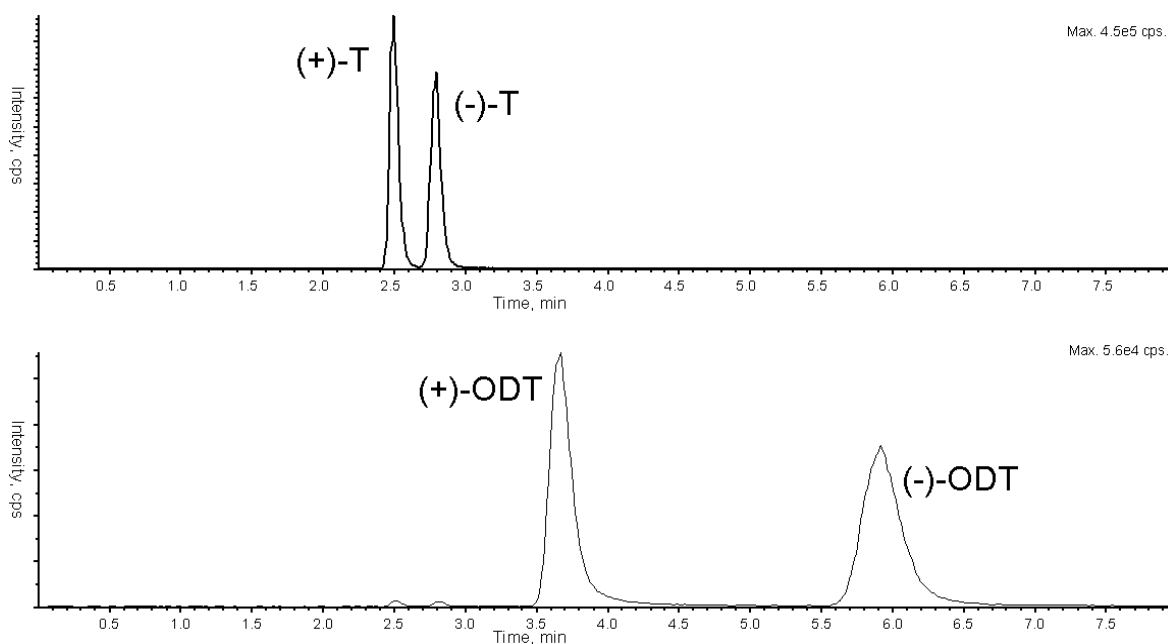
5.1.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Pro chirální stanovení tramadolu i ODT v moči byla použita kolona s cyklodextrinovou fází. Chirální separace analytů v plazmě byla provedena na normálních fázích při použití kolony s náplní obsahující celulózu s navázaným chlorovaným derivátem metylfenylkarbamátu. Enantiomery mateřské látky i metabolitu byly dobře rozděleny jak při GC-MS analýze (Obrázek 3), tak při LC-MS/MS analýze (Obrázek 4).

Extrakce sledovaných analytů z plazmy i moče byla provedena pomocí SPE. Metody byly validovány dle mezinárodně platných kritérií. Kalibrační závislost byla popsána lineární rovnicí v obecném tvaru $y = ax + b$. Vhodnost použití lineárního modelu byla ověřena pomocí korelačního koeficientu (r), který musí být větší než 0,99. Při opakované kalibraci ($n = 6$), charakterizují směrodatná odchylka parametrů a , b a r a relativní směrodatná odchylka (RSD) parametru a stabilitu kalibrace. Srovnáním těchto parametrů pro obě metody lze usoudit, že kalibrace byly stabilnější (nižší SD popř. RSD pro všechny parametry) a lineární korelace byly těsnější (vyšší průměry r) pro LC-MS/MS metodu (viz. Tabulka 1 a 2). Podrobněji jsou vývoj metodik a další validační parametry diskutovány v Příloze 1 a 2.



Obrázek 3: GC-MS SIM (m/z 58) chromatogram moče dobrovolníka obsahující 1,93 μ g/ml (+)-tramadolu [(+)-T], 1,97 μ g/ml (-)-tramadolu [(-)-T], 0,73 μ g/ml (+)-ODT a 1,08 μ g/ml (-)-ODT.



Obrázek 4: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou plazmy dobrovolníka obsahující 83,5 ng/ml (+)-T, 78,2 ng/ml (-)-T, 9,9 ng/ml (+)-ODT a 11,3 ng/ml (-)-ODT.

V moči jsem kvantifikoval volnou i glukuronidovanou formu analytů, z jejichž srovnání bylo možné posoudit aktivitu glukuronyltransferázy pro každý enantiomer. Důležitou součástí bylo nalezení způsobu jak uvolnit vázanou formu analytů a připravit moč pro analýzu. Všeobecně se dekonjugace glukuronidů provádí buď chemicky (Maurer & Bickeboeller-Friedrich, 2000), nebo působením enzymu β glukuronidázy (Moon et al., 2008). Koncentrace vázané formy se počítá jako rozdíl mezi celkovou formou (po dekonjugaci) a volnou formou (bez předřazené dekonjugace). Pro kvantifikace volných i vázaných forem bylo použito shodně 1 ml moče.

V rámci optimalizace metody byly zkoušeny oba běžné postupy: dekonjugace pomocí kyseliny a pomocí β glukuronidázy. Při vývoji metody se kladl důraz na zaručení co největší

účinnosti a na co nejlepší opakovatelnost, což zaručuje nejvyšší a konstantní výtěžek dekonjugace. Kyselá hydrolyza se ukázala jako nepoužitelná vzhledem k neuspokojivé opakovatelnosti metody. Naproti tomu enzymová hydrolyza již při počátku procesu optimalizace vykazovala velmi dobré výsledky. Bohužel, pro nedostupnost standardu glukuronidovaných analytů, nebylo možné absolutně vyjádřit účinnost enzymatické hydrolyzy. Stanovená účinnost byla pouze relativní a byla zjištěna vícenásobnou analýzou moče získané od pacienta užívající tramadol. Vzorek byl rozdělen na několik alikvotních podílů a glukuronidy v každém z nich byly dekonjugovány při různých podmínkách (různá teplota, rozdílný čas dekonjugace a množství enzymu). Následnou GC-MS analýzou se získala data, která posloužila k vyhodnocení optimalizace výtěžnosti dekonjugace. Nejlepší výsledky byly docíleny dekonjugací pomocí 2% roztoku lyofilizovaného enzymu v acetátovém pufru (pH 5) při teplotě 60°C po dobu tří hodin. Opakovatelnost dekonjugace byla ověřena tak, že byla moč od šesti pacientů užívajících tramadol připravena šestkrát stejným postupem (celkem 36 vzorků) a po GC-MS analýze byly porovnány stanovené koncentrace pro všechny vzorky jednoho pacienta. Opakovatelnost vyvinutého postupu byla lepší než 9,6 %.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
<i>n</i> = 6		(+)- <i>T</i>			(-) <i>T</i>	
<i>průměr</i>	0,5068	-0,0126	0,9988	0,5022	-0,0144	0,9981
<i>SD</i>	0,0315	0,0351	0,0011	0,0292	0,0255	0,0007
<i>RSD (%)</i>	6,22			5,81		
		(+)- <i>ODT</i>			(-)- <i>ODT</i>	
<i>průměr</i>	0,3007	-0,0169	0,9992	0,3031	-0,0167	0,9992
<i>SD</i>	0,0241	0,0405	0,0005	0,0187	0,0283	0,0004
<i>RSD (%)</i>	8,01			6,17		

Tabulka 1: Charakteristiky linearity kalibračních závislostí pro GC-MS chirální stanovení tramadolu a metabolitu v moči.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
<i>n</i> = 6		(+)- <i>T</i>			(-) <i>T</i>	
<i>průměr</i>	2,4575	0,0126	0,9990	2,4050	0,0067	0,9994
<i>SD</i>	0,0228	0,0074	0,0007	0,0335	0,0021	0,0003
<i>RSD (%)</i>	0,93			1,39		
		(+)- <i>ODT</i>			(-)- <i>ODT</i>	
<i>průměr</i>	1,6325	-0,0079	0,9995	1,6750	-0,0084	0,9997
<i>SD</i>	0,0773	0,0085	0,0005	0,075	0,0072	0,0005
<i>RSD (%)</i>	4,73			4,48		

Tabulka 2: Charakteristiky linearity kalibračních závislostí pro LC-MS/MS chirální stanovení tramadolu a metabolitu v plazmě.

5.1.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Použití LC-MS/MS se ukázalo jako výhodné, vzhledem k relativně jednoduché přípravě vzorku a relativně rychlému chromatografickému běhu (1,2–2 min). Hodnota koncentrace léčiva v neznámém vzorku byla vypočtena z lineární kalibrační závislosti, jejíž stabilita byla obdobně jako v případě stanovení tramadolu a ODT ověřována výpočtem parametrů *SD* a *RSD* pro *a*, *b* a *r* (výsledky pro verapamil a doxazosin viz Tabulka 3). Všechny metody splnily mezinárodně platná kritéria pro validaci chromatografických metod a staly se tak použitelnými v zamýšleném účelu.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
<i>n</i> = 6		<i>doxazosin</i>			<i>verapamil</i>	
<i>průměr</i>	0,178	0,0027	0,9985	0,499	0,0039	0,9979
<i>SD</i>	0,011	0,0015	0,0012	0,014	0,001	0,0011
<i>RSD (%)</i>	6,46			2,76		

Tabulka 3: Charakteristiky linearity kalibračních závislostí pro LC-MS/MS stanovení doxazosinu a verapamilu v séru.

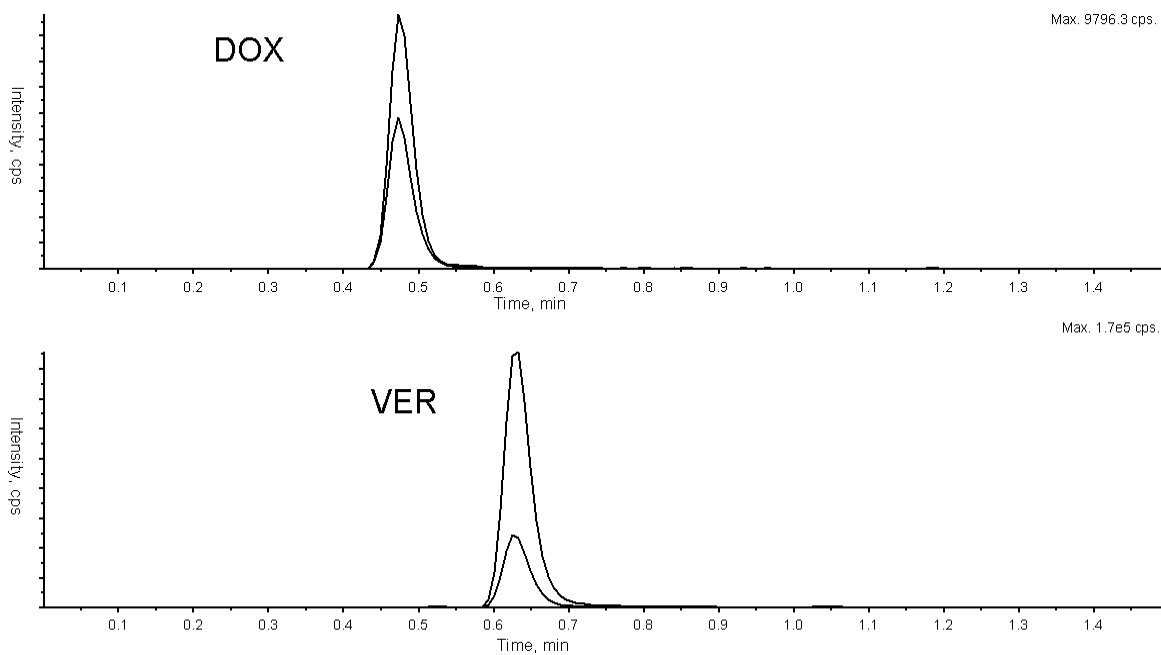
Obzvláště důležitými validačními parametry byly konkrétně v této aplikaci limit detekce (LOD) a dolní limit kvantifikace (LLOQ). LOD je minimální hodnota koncentrace analytu ve vzorku, která může být ještě detekovatelná (sensitivity metody). LLOQ, který je vždy vyšší než LOD, je nejnižší hodnota koncentrace analytu v analyzovaném vzorku, která může být stanovena (vyčíslena) s požadovanou přesností. LLOQ je obvykle nejnižším bodem kalibrační závislosti. Hodnoty stanovené nad LLOQ byly interpretovány číselně, hodnoty nacházející se pod LLOQ avšak nad LOD byly interpretovány jako hodnota pod limitem

kvantifikace a výsledky nedosahující LOD byly interpretovány jako negativní. Výsledek byl pak porovnán s terapeutickými rozmezími, která byla získána z literatury (Schulz & Schmoldt, 2003). Následně byl výsledek interpretován buď jako hodnota v terapeutickém rozmezí, nebo jako hodnota pod nebo nad terapeutickým rozmezím, nebo jako hodnota nedetekovatelná (nulová). Podrobněji shrnuje LOD, LLOQ a terapeutická rozmezí pro jednotlivá léčiva Tabulka 4.

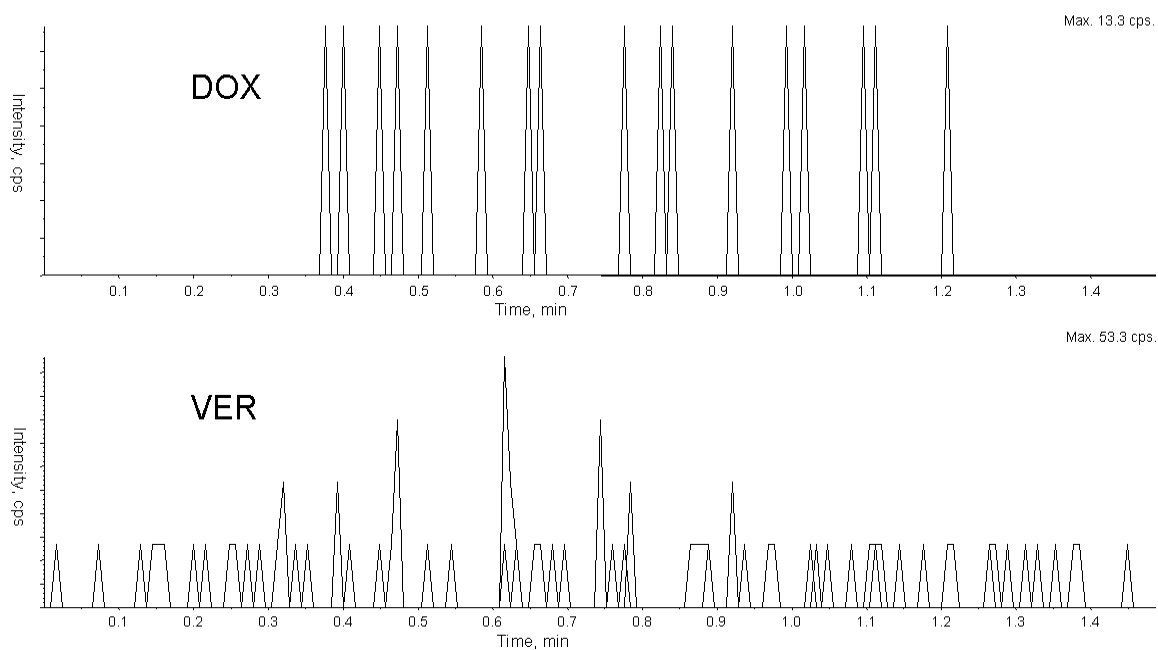
<i>terapeutická skupina</i>	<i>Léčivo</i>	<i>LOD [ng/ml]</i>	<i>LLOQ [ng/ml]</i>	<i>ter. rozmezí [ng/ml]</i>
<i>blokátory Ca²⁺ kanálů</i>	amlodipin	0,5	1	5-15
	verapamil	0,5	1	10-400
<i>β blokátory</i>	betaxolol	0,5	1	5-50
	bisoprolol	1	4	10-100
	metoprolol	2	10	35-500
<i>diuretika</i>	kanrenon	1	4	-
	hydrochlorothiazid	2	4	40-2000
<i>antagonisté angiotenzinu II</i>	losartan	1	4	<200
	telmisartan	1	4	-
<i>inhibitory ACE</i>	perindoprilát	0,5	1	-
	ramiprilát	0,5	1	-
<i>blokátor α₁ receptorů</i>	doxazosin	0,5	1	10-150
<i>centrálně působící antihypertenzivum</i>	rilménidin	0,04	0,1	-

Tabulka 4: Limity a terapeutická rozmezí pro stanovovaná léčiva.

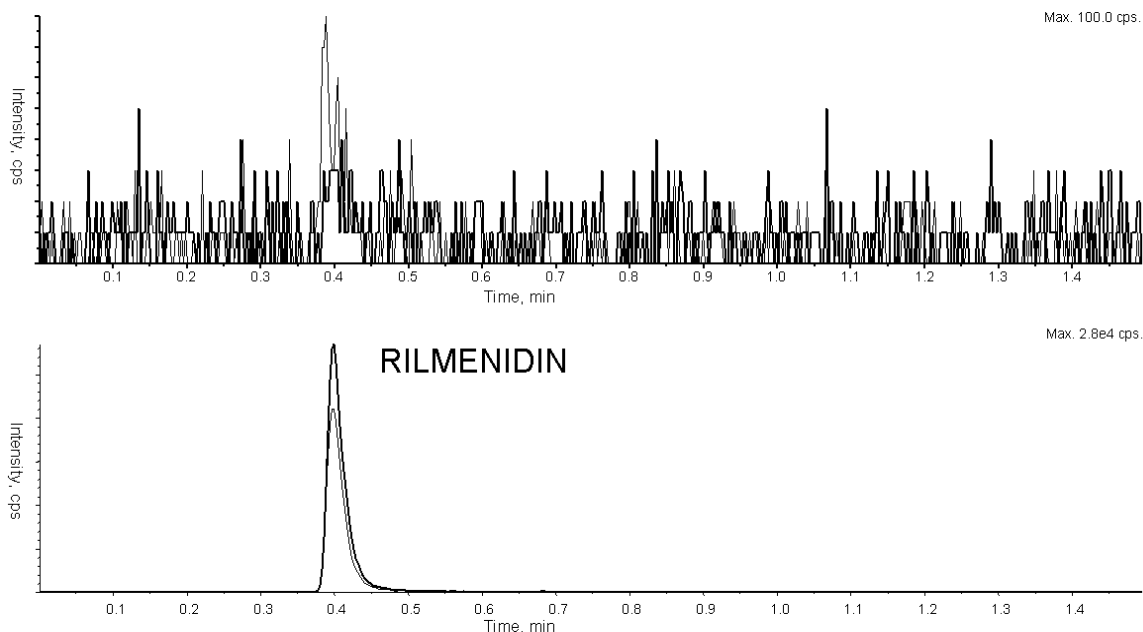
S každým vzorkem séra pacienta byl zároveň analyzován vzorek séra bez přítomnosti analytu (tzv. blank) pro porovnání s patientským vzorkem, což je mimo jiné nutné pro správné posouzení případné negativity. Bohužel, pro některé analyty (kanrenon, telmisartan, perindoprilát, ramiprilát a rilménidin) nejsou hodnoty terapeutických rozmezí dosud k dispozici, bylo tedy nutné výsledek ponechat bez interpretace. Chromatogramy pacientů s terapeutickou a nulovou hladinou verapamilu, doxazosinu a rilménidinu v séru jsou znázorněny na Obrázcích 5,6 a 7.



Obrázek 5: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta obsahující 21,4 ng/ml doxazosinu (DOX) a 44,8 ng/ml verapamilu (VER).



Obrázek 6: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta s negativním nálezem doxazosinu a verapamilu.



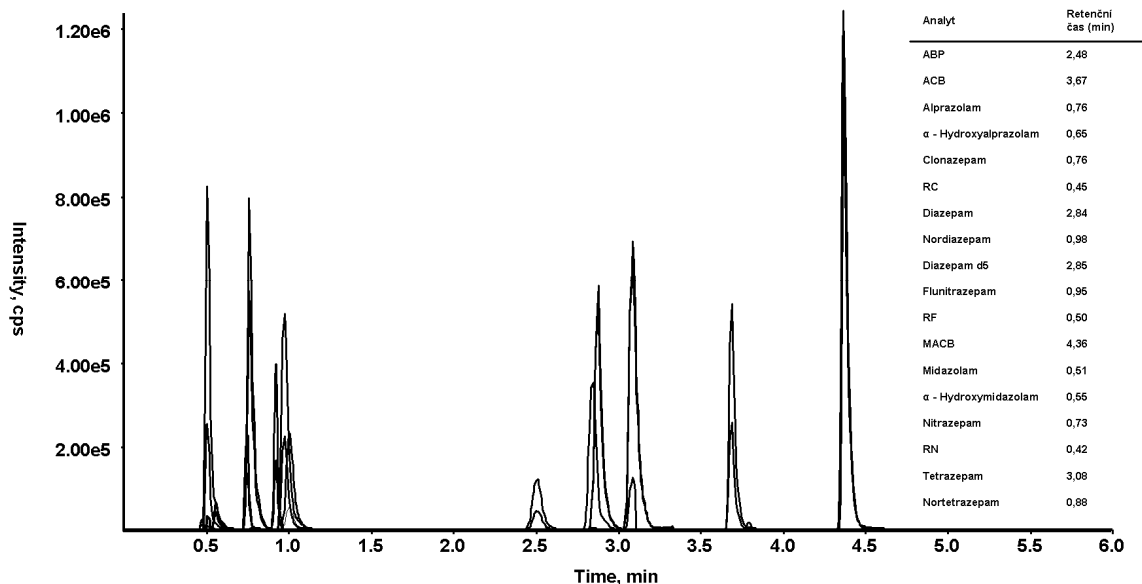
Obrázek 7: LC-MS/MS SRM chromatogramy získané analýzou séra pacienta s negativním nálezem rilmenidinu (nahore) a s nálezem 1,8 ng/ml.

Vzorky sér pacientů byly v závislosti na stanovovaném léčivu připravovány dvěma různými extrakčními postupy (LLE, SPE). Obě extrakční metody jsou široce používané a vyhovující pro následnou chromatografickou analýzu, nicméně snahou bylo použít cenově výhodnější LLE. Bohužel v některých případech (perindoprilát, ramiprilát) se ukázala jako neúčinná a bylo nutné sáhnout po dražší avšak selektivnější SPE. V případě rilmenidinu byla zvolena SPE vzhledem k lepším výsledkům při validaci postupu. Příklady optimalizace extrakčních metod pro doxazosin, rilmenidin a verapamil jsou uvedeny v Příloze 3 a 4.

5.1.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

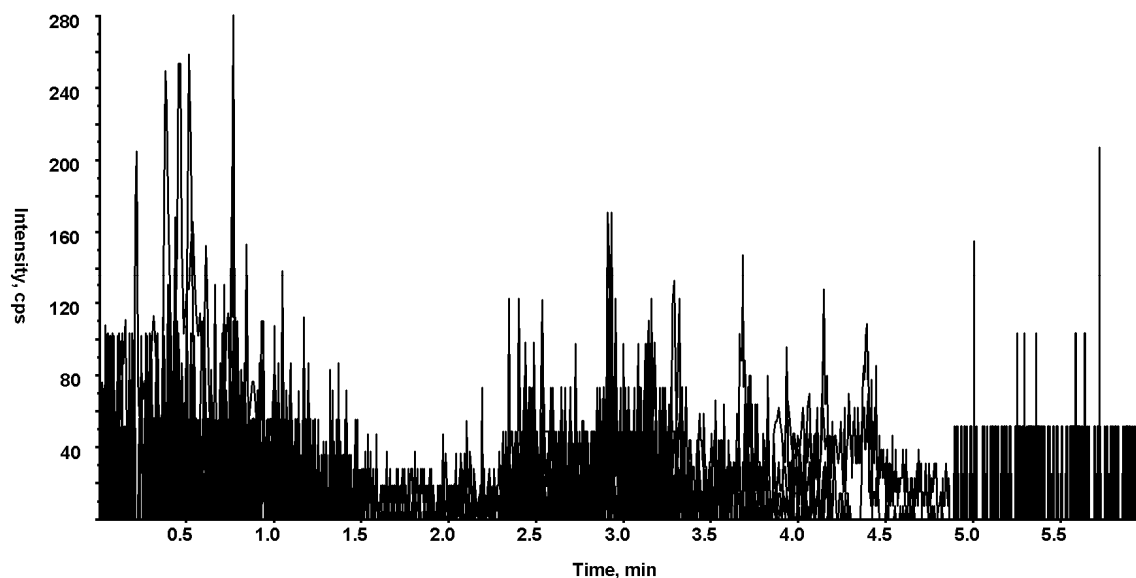
Gradientová eluce, použitá pro chromatografickou separaci zaručovala poměrně dobré rozdělení analytů. Pouze v čase okolo 0,5 minuty docházelo k eluci většího počtu analytů, což nezměnila žádná úprava chromatografických podmínek. Tento zdánlivý nedostatek se kompenzoval specifickou tandemově-hmotnostní detekcí. Pro každý analyt byly vybrány dva SRM přechody, což spolu s retencí zaručilo dostatečný průkaz neznámé látky. Vzorek moče byl vždy porovnán s retenčními časy standardů analyzovaných látek (Obrázek 8). Metoda byla testována na reálných případech řešených na Toxikologickém oddělení Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN. Při testování metody byly zpočátku analyzované vzorky souběžně měřeny již ověřenými metodami. Tento způsob

ověření funkčnosti metody byl zvolen vzhledem ke komerční nedostupnosti kontrolních vzorků moče s obsahem benzodiazepinových derivátů.



Obrázek 8: LC-MS/MS SRM chromatogram získaný analýzou zkušební testovací směsi benzodiazepinů a jejich metabolitů.

Pro extrakci sledovaných látek byla použita dvojitá extrakce kapalinou z bazického a neutrálního prostředí. Pro rozklad glukuronidů byla extrakci předřazena kyselá hydrolyza koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou (detailní popis uveden v Příloze 5). Tyto postupy se ukázaly jako účinné pro všechny analyty. Vzniklé extrakty obsahovaly značné množství nečistot, ale vzhledem k velmi malému objemu, který byl nastříkovan na kolonu a předřazenému kolonovému filtru, nedošlo ke znečištění analytického systému. Na chromatografických záznamech se nevyskytovaly interferenční peaky, které by ztěžovaly interpretaci naměřených dat (chromatografický záznam negativní moče viz Obrázek 9)



Obrázek 9: LC-MS/MS SRM chromatogram získaný analýzou negativní moči.

5.2 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

5.2.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Do skupiny zdravých dobrovolníků jsme zařadili celkem 12 subjektů. U šesti dobrovolníků byl fenotyp stanoven z moči a u šesti z krve. Ve skupině dospělých dobrovolníků jsme pro účely fenotypizace naměřili hodnoty sumarizované v Tabulce 5.

moč	(+)-ODT/(+)-T	(-)-ODT/(-)-T	(±)-ODT/(±)-T
EM (n = 2)	0,63±0,12	0,51±0,49	0,57±0,07
IM (n = 2)	0,38±0,01	0,30±0,02	0,34±0,02
PM (n = 2)	0,00±0,00	0,51±0,02	0,26±0,18
plazma			
EM (n = 3)	0,36±0,26	0,42±0,33	0,39±0,30
PM (n = 3)	0,02±0,01	0,05±0,01	0,03±0,01

Tabulka 5: Průměrné hodnoty poměrů ODT/T (\pm SD) v plazmě a moči pro skupinu dobrovolníků pro jednotlivé fenotypy.

Ve skupině fenotypizovaných z krve jsme zaznamenali hraniční statistickou signifikanci rozdílu mezi skupinou PM a EM pro poměry (+)-ODT/(+)-T ($p = 0,07$), (-)-ODT/(-)-T ($p = 0,09$) a (±)-ODT/(±)-T ($p = 0,08$). Trend k nižší tvorbě ODT a zejména (+)-ODT byl jasně

pozorovatelný ve všech skupinách s predikovanou nižší aktivitou CYP2D6 a to při fenotypizaci z moči i z krve.

Do skupiny novorozenců bylo zařazeno 28 pacientů s porodní hmotností od 750 g do 4,6 kg a s porodní délkou od 34 cm do 55 cm. Do skupiny kojenců a starších dětí byli zařazeni pacienti s hmotností od 2650 g do 62 kg a délkou/výškou od 50 cm do 185 cm.

V celém souboru 64 dětských pacientů byli identifikováni 4 pomalí metabolizátoři (PM) s genotypem CYP2D6*4/CYP2D6*4. Ve skupině bylo dále 23 intermediárních metabolizátorů (IM, heterozygotů pro funkčně deficitní alely). Nejčastější deficitní alelou byla CYP2D6*4. Distribuce genotypů odpovídala Hardy-Weinbergově rovnováze. Frekvence alel se významně neliší od výskytu variantních alel v České populaci.

V souboru se provedlo celkem 98 analýz. Průměrné hodnoty plazmatické koncentrace analytů ve vzorcích celého souboru a vzorcích bez zahrnutí pacientů s genotypem PM jsou uvedeny v Tabulce 6.

	(+)-T	(-)-T	(+)-ODT	(-)-ODT
Průměrné koncentrace [ng/ml]	140,7±139,4	138,8±135,5	21,7±20,3	40,3±40,4
Průměrné koncentrace bez PM [ng/ml]	139,8±143,1	138,6±139,6	22,5±20,3	42,6±41,0

Tabulka 6: Průměrné koncentrace (±SD) tramadolu a ODT v séru u dětských pacientů.

5.2.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Soubor pacientů a demografická data

Celkově bylo vyšetřeno 215 pacientů (104 žen), kteří měli užívat 1 až 5 přípravků pro léčbu vysokého krevního tlaku. Pro jednodušší manipulaci s daty byli pacienti rozděleni do tří věkových skupin: do čtyřiceti let, od čtyřiceti let včetně do šedesáti let a konečně od šedesáti let výše. Nejvíce pacientů (118; 54,9 %) bylo pro obě pohlaví ve skupině mezi čtyřicátým a šedesátým rokem. Nejmladší pacientce bylo 16 let (nejmladší pacient 21) a nejstarší 90 (nejstarší pacient 77). Průměrný věk žen byl 54±14 let a průměrný věk mužů byl 53±11 let. Detailněji rozebírá demografická data Tabulka 7.

Celkově bylo provedeno 496 analýz séra. Největší počet analýz byl proveden pro stanovení doxazosinu (127; 25,7 %) a verapamilu (87; 17,5 %), naopak nejmenší počet stanovení byl proveden v případě rilmenidinu (3; 0,6 %). Podrobný rozbor obsahuje Tabulka 8.

věk	počet pacientů			počet analýz		
	muži	ženy	celkem	muži	ženy	celkem
do 40	16 (14,4 %)	13 (12,5 %)	29 (13,5 %)	38 (15,1 %)	25 (10,2 %)	63 (12,7 %)
40 - 60	61 (55,0 %)	57 (54,8 %)	118 (54,9 %)	128 (51,0 %)	142 (58,0 %)	270 (54,4 %)
od 60	34 (30,6 %)	34 (32,7 %)	68 (31,6 %)	85 (33,9 %)	78 (31,8 %)	163 (32,9 %)
celkem	111	104	215	251	245	496

Tabulka 7: Počet a zastoupení pacientů a analýz podle věku a pohlaví.

	<i>amlodipin</i>	<i>betaxolol</i>	<i>bisoprolol</i>	<i>doxazosin</i>	<i>hchtz</i>	<i>kanrenon</i>	<i>losartan</i>
57 (11,5 %)	17 (3,4 %)	5 (1,1 %)	127 (25,7 %)	66 (13,3 %)	4 (0,8 %)	23 (4,6 %)	
	<i>metoprolol</i>	<i>perindoprilát</i>	<i>ramiprilát</i>	<i>rilménidin</i>	<i>telmisartan</i>	<i>verapamil</i>	
50 (10,1 %)	30 (6,0 %)	8 (1,6 %)	3 (0,6 %)	19 (3,8 %)	87 (17,5 %)		

Tabulka 8: Počet a zastoupení jednotlivých léčiv (metabolitů) stanovovaných v séru pacientů.

Metody pro různá léčiva vždy prokazovaly dostatečnou citlivost, takže bylo vždy pokryto celé terapeutické rozmezí. U látek, pro které nebylo možné v literatuře nalézt terapeutické rozmezí, bylo nejprve analyzováno několik vzorků sér od pacientů, kteří tento preparát prokazatelně užívali (kontrolované podávání). Těmto pacientům byla odebrána a analyzována krev v okamžiku podávání perorální dávky (získání nejnižší koncentrace) a v čase předpokládané C_{max} (získání nejvyšší koncentrace). Tato data byla případně použita pro rozšíření stávající kalibrační závislosti.

Minimální (bez započtení nekvantifikovatelných a negativních vzorků), průměrné a maximální naměřené hodnoty koncentrace analytů shrnuje Tabulka 9, do které, vzhledem k nízkému počtu pacientů, nebylo zahrnuto hodnocení kanrenonu a rilménidinu. Porovnáním naměřených maximálních hodnot s terapeutickým rozmezím je patrné, že u některých léčiv dochází k jeho častému převýšení (např. 12 pacientů v případě amlodipinu). Hodnoty minimálních koncentrací, které nedosahují na terapeutické rozmezí, mohou být známkou nedostatečného dávkování, individuálně variabilní farmakokinetiky, lékových interakcí nebo nedostatečné compliance. Z farmakogenetického pohledu lze uvažovat i možnost, že pacienti s nízkými nebo naopak vysokými hodnotami mohou vykazovat dědičné odchylky v odbourávání léčiv, odpovědné za neobvykle rychlejší nebo pomalejší metabolizaci daných léčiv.

<i>léčivo v séru</i>	<i>amlodipin</i>	<i>betaxolol</i>	<i>bisoprolol</i>	<i>doxazosin</i>	<i>hchtz</i>	<i>losartan</i>
<i>minimum [ng/ml]</i>	1,4	1,1	16,3	1,0	4,9	7,0
<i>maximum [ng/ml]</i>	55,0	83,0	28,6	174,0	715,0	58,5
<i>průměr [ng/ml]</i>	13,6	26,8	20,5	41,0	92,6	28,9
<i>počet</i>	34	10	4	96	42	12
<i>léčivo séru</i>	<i>metoprolol</i>	<i>perindoprilát</i>	<i>ramiprilát</i>	<i>telmisartan</i>	<i>verapamil</i>	
<i>minimum [ng/ml]</i>	25,6	1,9	6,1	5,0	1,0	
<i>maximum [ng/ml]</i>	618,0	175,0	140,0	130,0	393,0	
<i>průměr [ng/ml]</i>	144,2	29,7	56,6	38,8	122,3	
<i>počet</i>	24	25	5	14	76	

Tabulka 9: Průměrné a extrémní naměřené hodnoty pro stanovovaná léčiva (s vyloučením nulových hladin).

Vliv počtu předepsaných léčiv na compliance pacienta

Nejvíce pacientů bylo léčeno dvojkombinací (116; 54 %), dále trojkombinací (35; 16,3 %), jedním léčivem (34; 15,8 %), čtyřkombinací (25; 11,6 %) a nejméně jich mělo kombinaci pěti léčiv (5; 2,3 %).

Porovnáním počtu negativních výsledků v jednotlivých skupinách rozdělených podle počtu předepsaných léčiv lze vyzorovat zajímavý trend, který naznačuje, že čím více léčiv bylo předepsáno, tím horší byla spolupráce pacienta ($\chi^2 = 22,05$; $p = 0,0002$). To je v souladu s dříve publikovanými pracemi (Hussein et al., 2010; Benner et al., 2009; Burnier et al., 2009). U pacientů s více než třemi léčivy je navíc patrné, že převažuje totální non-compliance (32 % pro čtyři léčiva a 28,6 % pro tři léčiva), což i odpovídá stavu, kdy pacientovi byla předepisována další a další léčiva v domněnku, že dosavadní léčba je nedostačující.

Naproti tomu nejlepší spolupráce pacienta byla pozorována při užívání jediného antihypertenziva (85,3 % pacientů). Nejmenší ochota spolupracovat byla pozorována u pacientů, kteří měli předepsáno čtyři nebo pět léčiv (40 % pacientů). Lze sice považovat za zkrslující poněkud nižší zastoupení pacientů s pěti resp. čtyřmi léky (2,3 resp. 11,6 %) oproti pacientům se dvěma nebo jedním léčivem (54 resp. 15,8 %), avšak trend rostoucího podílu spolupracujících pacientů spolu s klesajícím počtem předepsaných medikamentů je evidentní (podrobněji Tabulka 10).

počet léčiv	počet pacientů (%)	100% compliance (%)	non-compliance, počet negativních nálezů (%)				
			1	2	3	4	5
5	5 (2,3 %)	2 (40,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (40,0 %)	1 (20,0 %)
4	25 (11,6 %)	10 (40,0 %)	3 (12,0 %)	3 (12,0 %)	1 (4,0 %)	8 (32,0 %)	
3	35 (16,3 %)	19 (54,3 %)	2 (5,7 %)	4 (11,4 %)	10 (28,6 %)		
2	116 (54,0 %)	88 (75,9 %)	18 (15,5 %)	10 (8,6 %)			
1	34 (15,8 %)	29 (85,3 %)	5 (14,7 %)				

Tabulka 10: Závislost počtu negativních výsledků na množství předepsaných léčiv.

Vliv pohlaví a věku pacienta na compliance

Posouzení vlivu pohlaví a věku pacienta na ochotu dodržovat předepsanou farmakoterapii by mohlo být v budoucnu nápomocné pro typizaci suspektně non-compliantních pacientů. Pro hodnocení byli pacienti rozděleni podle pohlaví a věku do tří resp. šesti skupin. U těchto skupin byly vypočítávány podíly spolupracujících - 100 % compliance, částečně spolupracujících - negativní na jedno z předepsaných léčiv (s vyloučením negativních na jedno léčivo při současném podávání jediného léčiva) a zcela nespolečujících pacientů - totální non-compliance. Pro důkladnost byly hodnoceny také výsledky jednotlivých analýz (viz. Tabulka 11).

věková skupina	počet pacientů					
	muži			Ženy		
	40	40-60	60	40	40-60	60
100% compliance	10 (62,5 %)	47 (77,0 %)	30 (88,2 %)	7 (53,8 %)	30 (52,6 %)	24 (70,6 %)
negativní na jedno léčivo	2 (12,5 %)	6 (9,8 %)	3 (8,8 %)	1 (7,7 %)	8 (14,0 %)	3 (8,8 %)
totální non-compliance	2 (12,5 %)	7 (11,5 %)	1 (2,9 %)	4 (30,8 %)	14 (24,6 %)	6 (17,6 %)

věková skupina	počet analýz					
	muži			Ženy		
	40	40-60	60	40	40-60	60
v ter. Rozmezí	23 (60,5 %)	91(71,1 %)	77 (90,6 %)	13 (52,0 %)	64 (45,1 %)	48 (61,5 %)
pod ter. Rozmezím	2 (5,3 %)	10 (7,8 %)	3 (3,5 %)	1 (4,0 %)	18 (12,7 %)	6 (7,7 %)
negativní	13 (34,2 %)	27 (21,1 %)	5 (5,9 %)	11 (44,0 %)	60 (42,2 %)	24 (30,8 %)

Tabulka 11: Shrnutí compliance pacientů podle věku a pohlaví.

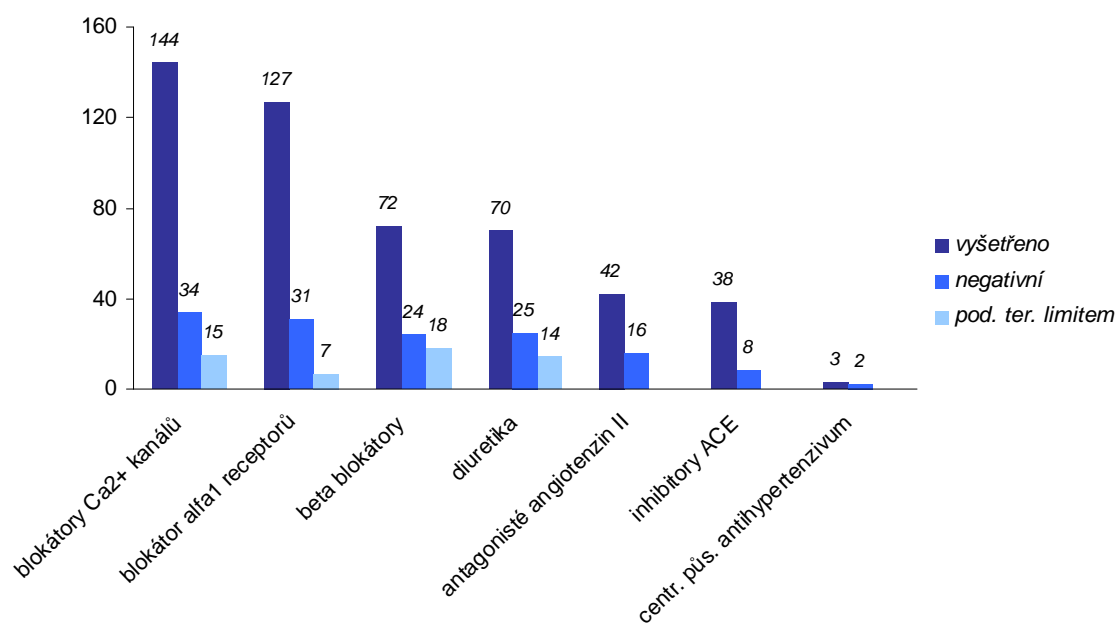
Statisticky bylo ověřeno, že compliance je závislá na pohlaví ($\chi^2 = 8,84$; $p = 0,0029$). Souvislost s věkem u obou pohlaví nebyla prokázána (muži: $\chi^2 = 4,39$; $p = 0,1112$, ženy: $\chi^2 = 2,97$; $p = 0,2226$). Nicméně, porovnáním procentuálních zastoupení v daných skupinách,

lze vypořádat některé trendy. Spolupráce se u obou pohlaví zvyšuje s rostoucím věkem pacienta, přičemž v nejvyšší věkové skupině je u mužů vyšší než u žen (88,2 resp. 70,6 %). U mužů je nejvyšší celková non-compliance pozorována ve věkové skupině do 40 let (12,5 %), stejně jako u žen (30,8 %) a již v této skupině je rozdíl podílu nespolupracujících mezi pohlavími markantní. Ve skupině mezi 40. až 60. rokem je podíl nespolupracujících více než dvakrát větší u žen než u mužů (24,6 resp. 11,5 %). Rozdíl mezi pohlavími se dále prohlubuje ve skupině nad 60 let, u žen je šestkrát větší podíl totálně nespolupracujících než u mužů (17,6 resp. 2,9 %). U částečně nespolupracujících pacientů nejsou rozdíly napříč skupinami tak významné. Výsledky analýz přibližně opisují závěry z jednotlivých skupin pacientů.

Z uvedeného je tedy zřejmé, že pravděpodobně nejochotněji bude při farmakoterapii spolupracovat pacient muž starší čtyřiceti let. Naopak u mladších žen bude ochota užívat antihypertenziva nejnižší a s věkem se tato ochota spolupráce bude zvyšovat daleko pomaleji než u mužů.

Compliance pro jednotlivé skupiny léčiv

Je-li pomínut rilmenidin s nejnižším počtem analyzovaných vzorků, lze uzavřít, že podíl negativních analýz v jednotlivých skupinách léčiv není dramaticky odlišný ($\chi^2 = 8,3$; $p = 0,1402$). Nejnižší podíl negativních nálezů mají ACE inhibitory (21,1 %) a nejvyšší antagonisté angiotenzinu II (38,1 %), přičemž průměr je 29,4 %. Množství analýz pod terapeutickým rozmezím není možné vyhodnocovat vzhledem k faktu, že pro mnohá léčiva nebyl dosud tento interval přesně vymezen. Sumární vyhodnocení nálezů zobrazuje Obrázek 10.



Obrázek 10: Počet a výsledky vyšetřovaných pacientů podle terapeutických skupin předepsaných léčiv.

Vliv druhu péče o pacienta na compliance

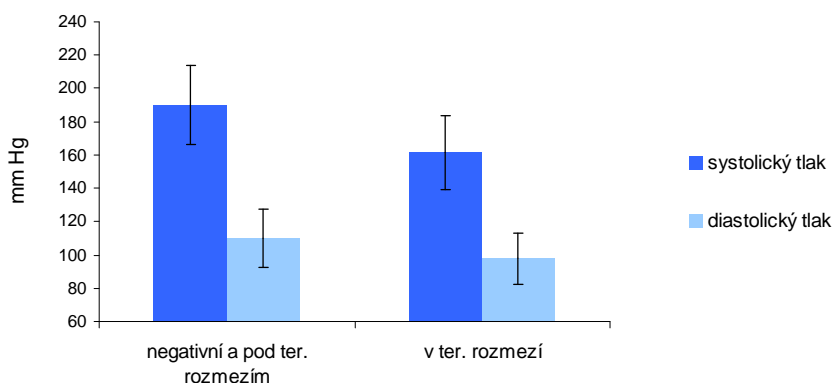
Z celkového počtu 215 pacientů bylo 131 (60,9 %) hospitalizováno a 84 (39,1 %) se jich léčilo ambulantně. Porovnáním výsledků analýz bylo zjištěno několik zajímavých skutečností. Podíl spolupracujících pacientů byl mezi hospitalizovanými daleko vyšší než mezi ambulantně léčenými ($\chi^2 = 16,17$; $p = 0,0001$). Pacientů, kteří byli alespoň na jedno léčivo negativní, bylo mezi hospitalizovanými podstatně méně než mezi ambulantními pacienty. Poměr totálně non-compliantních byl u ambulantních pacientů téměř dvojnásobný (viz. Tabulka 12).

druh péče	počet	100% compliance	1 negativní	totální non-compliance
hospitalizace	131 (60,9 %)	104 (79,4 %)	9 (6,9 %)	16 (12,2 %)
ambulantní	84 (39,1 %)	44 (52,4 %)	14 (16,7 %)	18 (21,4 %)

Tabulka 12: Závislost compliance pacientů na druhu péče.

Hodnota tlaku v závislosti na dodržování léčby

Verapamil a doxazosin jsou podávány pro jejich minimální ovlivnění sérových hladin hormonů podílejících se na regulaci tlaku, což bylo nápomocné pro diagnostiku sekundární hypertenze (podrobněji o této problematice viz Příloha 4). Vzhledem k velkému počtu provedených stanovení (87 a 127) bylo možné vyhodnotit vztah mezi výsledkem analýzy a hodnotou systolického a diastolického tlaku. Střední hodnota systolického tlaku (\pm SD) byla u non-compliantních pacientů $190,0 \pm 24$ mm Hg ($n = 25$), zatímco u spolupracujících $161,5 \pm 22$ mm Hg ($n = 54$). Obdobná korelace platila i pro diastolický tlak: non-compliantní $110,0 \pm 17$ mm Hg, spolupracující $98,0 \pm 16$ mm Hg (viz Obrázek 4). Rozdíly mezi skupinami nedosáhly ani u systolického ani u diastolického tlaku hranice statistické významnosti. Pacienti s prokázanou nebo suspektní sekundární příčinou hypertenze ($n = 26$) byli vyloučeni z porovnávaného souboru.



Obrázek 11: Porovnání středních hodnot tlaků (\pm SD) pro non-compliantní a spolupracující pacienty

5.2.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Vyvinutým analytickým postupem bylo analyzováno celkem 117 případů, u kterých byl v rámci rutinního toxikologického vyšetření vyžadován průkaz benzodiazepinů po skupinovém záchytu pomocí imunochemického screeningu. 26 případů bylo negativních a ve zbylých 91 případech bylo prokázano 116 nálezů různých benzodiazepinů. Neshoda výsledku LC-MS/MS analýz a imunochemického screeningu byla v 16 případech vysvětlena přítomností sertralinu, který může způsobovat falešnou pozitivitu (Nasky et al., 2009). U

zbylých negativních vzorků se jednalo o příliš nízkou hodnotu hraničního záchytu screeningové metody, který je nastaven kvůli schopnosti zachytit všechny látky ze skupiny i v stopovém množství. Výsledky provedených analýz shrnuje Tabulka 13 (pozn.: vzhledem k nejednotnosti způsobu interpretace nálezů ACB a MACB jsou tyto interpretovány jako metabolity benzodiazepinového derivátu typu diazepam a zahrnují diazepam, medazepam, chlórdiazepoxid, oxazepam aj.). 30 případů bylo souběžně zpracováno a analyzováno pomocí jiných zaběhnutých metod (TLC, GC-MS), které se rutinně používají pro průkaz benzodiazepinů. Ve 29 případech byla zaznamenána shoda ve výsledcích. V jednom případě se ukázala kyselá hydrolýza glukuronidů jako nedostačující a vzorek musel být hydrolyzován enzymaticky (Balíková et al., 1999). LC- MS/MS analýzou takto připraveného vzorku byla potvrzena přítomnost stopového množství α -hydroxymidazolamu, pro jehož uvolnění byla kyselá hydrolýza nedostačující.

<i>nález</i>	<i>midazolam</i>	<i>alprazolam</i>	<i>met. derivátu typu diazepam</i>	<i>bromazepam</i>	<i>tetrazepam</i>	<i>klonazepam</i>
<i>počet (%)</i>	14 (12,1 %)	21 (18,1 %)	50 (43,1 %)	8 (6,9 %)	2 (1,7 %)	21 (18,1 %)

Tabulka 13: Zastoupení výsledků LC-MS/MS analýz testovaných pro průkaz benzodiazepinů.

6 DISKUZE

6.1 CHIRÁLNÍ STANOVENÍ TRAMADOLU A ODT

Stereoselektivní metody pro stanovení tramadolu a ODT jsme využili při farmakogenetické studii se zdravými dospělými dobrovolníky k ověření možnosti použití tramadolu jako modelového substrátu pro stanovení aktivity CYP2D6 *in vivo*. Ověřovali jsme možnost fenotypizace z krve i neinvazivně z moči. Získané výsledky odpovídaly predikovaným fenotypům založených na genotypu CYP2D6. Porovnávali jsme tři metody hodnocení výsledků fenotypizace pomocí metabolických poměrů (+)-ODT/(+)-T, (-)-ODT/(-)-T a (±)-ODT/(±)-T. Za nejsenzitivnější lze považovat poměr (+)-ODT/(+)-T, u kterého byl rozdíl mezi PM a EM nejvýraznější. Toto pozorování je nejspíše způsobeno alternativní metabolickou cestou, která vede ke vzniku (-)-ODT, což ilustrují relativně vysoké naměřené koncentrace tohoto analytu ve sběrech moči u subjektů PM a IM. Díky tvorbě (-)-ODT nezávislé na aktivitě CYP2D6 je potom i metabolický poměr (±)-ODT/(±)-T méně senzitivní k identifikaci míry deficitu CYP2D6. Díky malým počtům subjektů v genotypových skupinách nedosáhly rozdíly mezi PM a EM statistické significance, které by jinak při nulových koncentracích (+)-ODT u PM bylo ve větším souboru bezpochyby dosaženo.

Hladiny enantiomerů tramadolu a ODT ve skupině dětí vykazovaly vysokou interindividuální variabilitu. Variabilita byla v našem souboru přibližně stejná pro všechny sledované analyty (Tabulka 6). Hlavním zdrojem variability hladin v tomto souboru byly proto nejspíše maturační a ontogenetické změny v metabolických cestách podílejících se na biodegradaci léčiva. Vzhledem k tomu, že pro ODT není stanoveno terapeutické rozmezí, nevěnoval jsem se v této práci charakterizaci a hodnocení vztahu hladin ke klinické odpovědi. Toto bude náplní pokračující studie až po získání většího množství pacientů, aby mohla být hodocena farmakokinetika v jednotlivých věkových a genotypových skupinách pomocí strategie „sparse sampling“.

6.2 STANOVENÍ ANTIHYPERTENZIV

Stanovení antihypertenziv u pacientů s rezistentní hypertenzí je velmi objektivní způsob ověřování dodržování předepsané farmakoterapie. Na rozdíl od jiných, nepřímých metod, jako je počítání otevření a zavření balení nebo kontrola lékárenské databáze, poskytuje stanovení léčiv ve většině případů uspokojivou a jasnou odpověď. Pro analýzu sér bylo nutné použití validovaných analytických postupů, které zaručují správnost naměřených dat.

Z parametrů, potenciálně ovlivňujících ochotu pacienta spolupracovat, byly zkoumány věk a pohlaví, počet a terapeutické skupiny předepsaných léčiv a druh lékařské péče. U pohlaví byly prokázány zřetelné trendy, které poukazují na rozdílný přístup a zodpovědnost mužů a žen. Při dodržování compliance se ukázali muži jako podstatně zodpovědnější. Porovnáním dat u různých věkových skupin se jako spolehlivější ukázali starší pacienti (nad 60 let). Terapeutická skupina předepsaného léčiva nehrála významnější roli, z čehož plyne univerzálně zamítavý postoj nespolupracujících pacientů k jakémukoliv druhu medikamentózní antihypertenzní terapie. Počet předepsaných léčiv hrál významnou roli: čím více léčiv bylo pacientovi předepsáno, tím horší spolupráce byla pozorována. Způsob péče o pacienta ovlivňoval ochotu spolupracovat. Sérum pacientů, kteří byli léčeni ambulantně, bylo podstatně častěji hodnoceno jako negativní na předepsaná léčiva, naopak pacienti, jimž bylo analyzováno sérum při přijetí k hospitalizaci, byli častěji shledáni jako spolupracující. U pacientů, kteří byli vyhodnoceni jako negativní, bylo doporučeno kontrolované podávání předepsaných léčiv a následná analýza séra pro ověření možnosti odchylek v metabolismu léčiv, které by potenciálně mohly mít za následek negativní výsledek analýzy. Alternativně bylo rovněž doporučeno farmakogenetické vyšetření molekulárně-biologickými metodami k vyloučení ultrarychlého typu metabolismu léčiv. Přestože jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl v hodnotách průměrného systolického a diastolického tlaku u pacientů dodržujících a nedodržujících léčbu, měli pacienti s hladinami léčiv v terapeutickém rozmezí obě hodnoty nižší. V absolutních číslech byl rozdíl průměrných hodnot mezi skupinami 28,5/12,0 mmHg, což je rozdíl klinicky velmi významný. Bez ohledu na nedosažení statistické signifikance (pravděpodobně z důvodu malé velikosti souboru) lze z klinického

pohledu očekávat významně vyšší rizika spojená s nedostatečně kompenzovaným krevním tlakem ve skupině nespolupracujících pacientů.

V současnosti se stanovování hladin antihypertenziv přesouvá z oblasti experimentální do klinické praxe, přičemž stále zůstává nevýhodou relativní nedostupnost a vysoká cena vyšetření.

6.3 PRŮKAZ BENZODIAZEPINŮ V MOČI

Uvedená metoda byla připravena pro měření vzorků, které jsou podrobovány analýze v rámci STA v laboratoři klinické i forenzní toxikologie. Vývoj metody byl požadován z důvodu nahrazení dosavadního systému tenkovrstevné chromatografie, který je rozšířen zejména v České republice. Při tenkovrstevné chromatografii se zpracovává minimálně 20 ml moče pro kyselou hydrolýzu a 50 ml pro extrakci z alkalického prostředí. Takové množství biologického materiálu může být samo o sobě značně komplikující např. při požadavku na analýzu moče u oligourických/anurických pacientů. Další nevýhodou TLC je častá přítomnost interferujících skvrn v chromatogramu, což ztěžovalo, nebo úplně znemožňovalo interpretaci nálezu. Navíc při běžném postupu nebylo možné prokázat alprazolam a midazolam, k čemuž se musela použít buď odlišná chromatografická soustava pro vývoj TLC chromatogramů (v případě midazolamu) nebo dokonce GC-MS analýza (v případě alprazolamu). Provedení GC-MS ovšem předchází zdlouhavá enzymatická hydrolýza, extrakční procedura a derivatizace. Navíc při analýze produktů enzymatických hydrolýz dochází k nevratnému poškození kolony plynového chromatografu, což značně zkracuje obvyklou životnost této důležité a nákladné části měřicího systému. LC-MS/MS analýza se ve více jak ročním provozu osvědčila a zdá se, že nic nebrání její plné implementaci mezi běžně užívané postupy. Po rozšíření parametrů hmotnostní detekce o všechny původní formy (clobazam, bromazepam aj.) se může metoda testovat pro analýzu séra na přítomnost benzodiazepinů, což by dále prokázalo univerzálnost vyvinutého postupu.

7 ZÁVĚR

Předkládaná práce se zabývala aplikacemi chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii. Tři příklady aplikací ilustrují důležitost moderní kvalitativní a kvantitativní analýzy biologického materiálu pro terapeutické i výzkumné účely.

Výsledky lze obecně shrnout v těchto bodech:

- chirální stanovení léčiv v biologických matricích přináší velmi cenné poznatky o průběhu stereoselektivního odbourávání léčiv, což může být významné při hledání příčiny sníženého účinku nebo naopak toxicity u individuálních pacientů
- chirální stanovení léčiv v biologických matricích poskytuje senzitivnější metodu pro fenotypzaci aktivity metabolické přeměny u modelových substrátů se stereoselektivní farmakokinetikou než achirální analýza
- pomocí stanovení sérových hladin antihypertenziv lze stanovit rozsah compliance pacientů s doporučeným terapeutickým režimem na individuální i populační úrovni
- pomocí stanovení sérových hladin antihypertenziv jsme zjistili zastoupení nespolupracujících pacientů ve skupině hypertoniků s diagnostikovanou rezistencí ke kombinované antihypertenzní léčbě a zároveň jsme popsali rozdíl v průměrných hodnotách krevního tlaku ve skupině pacientů nedodržujících a dodržujících doporučené terapeutické režimy
- vyhodnocením naměřených dat jsme zjistili, že pohlaví, rozsah medikace a způsob péče o pacienta mají vliv na ochotu dodržovat předepsanou farmakoterapii, zatímco vliv věku a terapeutické skupiny předepsaného léčiva je menší a v našem souboru nebyl statisticky významný
- metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro průkaz celé škály benzodiazepinů se ukázala jako dostatečně citlivá a spolehlivá, což ji předurčilo k zavedení do klinické praxe

LITERATURA

- ABERNETHY, D. R., TODD, E. L., MITCHELL, J. R. (1984) Verapamil and norverapamil determination in human plasma by gas-liquid chromatography using nitrogen-phosphorus detection: application to single-dose pharmacokinetic studies. *Pharmacology* **29**: 264–268.
- ABOLIN, C., MCRAE, J. D., TOZER, T. N., TAKKI, S. (1980) Gas chromatographic head-space assay of formic acid as methyl formate in biologic fluids: potential application to methanol poisoning. *Biochem Med* **23**: 209–218.
- ALLANSON, A. L., COTTON, M. M., TETTEY, J. N., BOYTER, A. C. (2007) Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: a potential method for therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal* **44**: 963–969.
- ALVES, C., SANTOS-NETO, A. J., FERNANDES, C., RODRIGUES, J. C., LANCAS, F. M. (2007) Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **42**: 1342–1347.
- ANDREJAK, M., GENES, N., VAUR, L., PONCELET, P., CLERSON, P., CARRE, A. (2000) Electronic pill-boxes in the evaluation of antihypertensive treatment compliance: comparison of once daily versus twice daily regimen. *Am J Hypertens* **13**: 184–190.
- ANSERMOT, N., FATHI, M., VEUTHEY, J. L., DESMEULES, J., RUDAZ, S., HOCHSTRASSER, D. (2008) Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique. *Clin Biochem* **41**: 910–913.
- ARIENS, E. J. (1984) Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* **26**: 663–668.
- ARNDT, T., GIERTEN, B., GUSSREGEN, B., WERLE, A., GRUNER, J. (2009) False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self-medication. *Forensic Sci Int* **184**: 27–29.
- AVGERINOS, A., HUTT, A. J. (1987) Determination of the enantiomeric composition of ibuprofen in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **415**: 75–83.
- BADEN, L. R., HOROWITZ, G., JACOBY, H., ELIOPOULOS, G. M. (2001) Quinolones and false-positive urine screening for opiates by immunoassay technology. *Jama* **286**: 3115–3119.
- BALÍKOVÁ, M., KOHLÍČEK, J. (1988) Rapid determination of ethylene glycol at toxic levels in serum and urine. *J Chromatogr* **434**: 469–474
- BALÍKOVÁ, M., MAREŠOVÁ, V., VEČERKOVÁ, J. (1999) Sensitivity of GC-MS in the detection of benzodiazepines in the urine in the form of trimethylsilyl derivatives. *Soud Lek* **44**: 34–42.
- BALÍKOVÁ, M. (2004) *Forezní a klinická toxikologie - laboratorní toxikologická vyšetření*. Galén, Praha.
- BALTES, E., COUPEZ, R., GIEZEK, H., VOSS, G., MEYERHOFF, C., STROLIN BENEDETTI, M. (2001) Absorption and disposition of levocetirizine, the eutomer of cetirizine, administered alone or as cetirizine to healthy volunteers. *Fundam Clin Pharmacol* **15**: 269–277

- BECK, O., LAFOLIE, P., ODELIUS, G., BOREUS, L. O. (1990) Immunological screening of benzodiazepines in urine: improved detection of oxazepam intake. *Toxicol Lett* **52**: 7–14.
- BECHERUCCI, C., RUNCII, F. M., SEGRE, G. (1981) Gas chromatographic determination of paracetamol in plasma. *Farmaco Prat* **36**: 312–316.
- BENNER, J. S., CHAPMAN, R. H., PETRILLA, A. A., TANG, S. S., ROSENBERG, N., SCHWARTZ, J. S. (2009) Association between prescription burden and medication adherence in patients initiating antihypertensive and lipid-lowering therapy. *Am J Health Syst Pharm* **66**: 1471–1477.
- BLANK, A., HELLSTERN, V., SCHUSTER, D., HARTMANN, M., MATTHEE, A. K., BURHENNE, J., HAEFELI, W. E., MIKUS, G. (2009) Efavirenz treatment and false-positive results in benzodiazepine screening tests. *Clin Infect Dis* **48**: 1787–1789.
- BOERMANS, P. A., GO, H. S., WESSELS, A. M., UGES, D. R. (2006) Quantification by HPLC-MS/MS of atropine in human serum and clinical presentation of six mild-to-moderate intoxicated atropine-adulterated-cocaine users. *Ther Drug Monit* **28**: 295–298.
- BOLEDA, M. R., GALCERAN, M. T., VENTURA, F. (2007) Trace determination of cannabinoids and opiates in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1175**: 38–48.
- BROWN, D. J., JAIN, N. C., FORNEY, R. B., HUGHES, F. W., RICHARDS, A. B. (1968) Gas chromatographic assay of glycol-ethanol combinations in biological materials. *J Forensic Sci* **13**: 537–543.
- BRUCE, R. B., MAYNARD, W. R., JR. (1969) Determination of amphetamine and related amines in blood by gas chromatography. *Anal Chem* **41**: 977–979.
- BURDICK, J. D., BONI, R. L., FOCHTMAN, F. W. (1997) Quantitation of cocaine and cocaethylene in small volumes of rat whole blood using gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **15**: 1167–1173.
- BURNIER, M., BROWN, R. E., ONG, S. H., KESKINASLAN, A., KHAN, Z. M. (2009) Issues in blood pressure control and the potential role of single-pill combination therapies. *Int J Clin Pract* **63**: 790–798.
- CALAFAT, A. M., STANFILL, S. B. (2002) Rapid quantitation of cyanide in whole blood by automated headspace gas chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **772**: 131–137.
- CALDWELL, J. (1995) Chiral Pharmacology and the Regulation of New Drugs. *Chemistry & Industry*: 176–179.
- CALDWELL, R., CHALLENGER, H. (1989) A Capillary Column Gas-Chromatographic Method for the Identification of Drugs of Abuse in Urine Samples. *Annals of Clinical Biochemistry* **26**: 430–443.
- CARDENAS, S., GALLEGRO, M., VALCARCEL, M. (1998) Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of selected benzophenones from benzodiazepines in human urine following automatic screening. *J Chromatogr A* **823**: 389–399.
- CIPRIANI, A., SANTILLI, C., FURUKAWA, T. A., SIGNORETTI, A., NAKAGAWA, A., MCGUIRE, H., CHURCHILL, R., BARBUI, C. (2009) *Escitalopram versus other antidepressive agents for depression*. Cochrane Database Syst Rev: CD006532.
- CLATWORTHY, A. J., OON, M. C., SMITH, R. N., WHITEHOUSE, M. J. (1990) Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of radioimmunoassay results for cannabinoids in blood and urine. *Forensic Sci Int* **46**: 219–230.

- COHEN, J. S., INSEL, P. A. (1996) The Physicians' Desk Reference. Problems and possible improvements. *Arch Intern Med* **156**: 1375–1380.
- COLTART, D. J., GIBSON, D. G., SHAND, D. G. (1971) Plasma propranolol levels associated with suppression of ventricular ectopic beats. *Br Med J* **1**: 490–491.
- CONCHEIRO, M., SIMOES, S. M., QUINTELA, O., DE CASTRO, A., DIAS, M. J., CRUZ, A., LOPEZ-RIVADULLA, M. (2007) Fast LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. *Forensic Sci Int* **171**: 44–51.
- COOPER, J. D. (1971) Determination of blood ethanol by gas chromatography. *Clin Chim Acta* **33**: 483–485.
- DAL BO, L., VERGA, F., MARZO, A., LA COMMARE, P., DE VITO, M. L. (1997) Gas chromatographic assay for estazolam in human plasma and results of a bioequivalence study. *Pharmacol Res* **35**: 329–333.
- DAWLING, S., WARD, N., ESSEX, E. G., WIDDOP, B. (1990) Rapid Measurement of Basic Drugs in Blood Applied to Clinical and Forensic Toxicology. *Annals of Clinical Biochemistry* **27**: 473–477.
- DAYER, P., DESMEULES, J., COLLART, L. (1997) Pharmacology of tramadol. *Drugs* **53** Suppl 2: 18–24.
- DE PAULA, M., SAIZ, L. C., GONZALEZ-REVALDERIA, J., PASCUAL, T., ALBEROLA, C., MIRAVALLS, E. (1998) Rifampicin causes false-positive immunoassay results for urine opiates. *Clin Chem Lab Med* **36**: 241–243.
- DERIENZ, R. T., HOLLER, J. M., MANOS, M. E., JEMIONEK, J., PAST, M. R. (2008) Evaluation of four immunoassay screening kits for the detection of benzodiazepines in urine. *J Anal Toxicol* **32**: 433–437.
- DEVALIA, J. L., DE VOS, C., HANOTTE, F., BALTES, E. (2001) A randomized, double-blind, crossover comparison among cetirizine, levocetirizine, and ucb 28557 on histamine-induced cutaneous responses in healthy adult volunteers. *Allergy* **56**: 50–57.
- EDINBORO, L. E., BACKER, R. C., POKLIS, A. (2005) Direct analysis of opiates in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **29**: 704–710.
- EDLUND, P. O. (1981) Determination of opiates in biological samples by glass capillary gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr* **206**: 109–116.
- EL-HAJ, B., AL-AMRI, A., ALI, H. (2008) Cross-reactivity of nefopam and its metabolites with benzodiazepine EMIT immunoassay. *J Anal Toxicol* **32**: 790–792.
- EVANS, A. M. (2001) Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clin Rheumatol* **20** Suppl 1: S9–14.
- FERREIROS, N., DRESEN, S., ALONSO, R. M., WEINMANN, W. (2007) Validated quantitation of angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) in human plasma by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry using minimum sample clean-up and investigation of ion suppression. *Ther Drug Monit* **29**: 824–834.
- FIEGER, H., BLASCHKE, G. (1992) Direct determination of the enantiomeric ratio of verapamil, its major metabolite norverapamil and gallopamil in plasma by chiral high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **575**: 255–260.
- FLANAGAN, R. J. (2007) *Fundamentals of analytical toxicology*. John Wiley and Sons Ltd., London.
- FRANCOTTE, E., LINDNER, W. (2006) *Chirality in Drug research*. Wiley-VCH, Weinheim.

- FRANKE, G., DILETTI, E., HOFFMANN, C., ZSCHIESCHE, M., SCHEUCH, E., SIEGMUND, W. (1995) Relative bioavailability of different valproic acid formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther* **33**: 653–657.
- FRANKUS, E., FRIDERICH, E., KIM, S. M., OSTERLOH, G. (1978) [On separation of isomeres, structural elucidation and pharmacological characterization of 1-(*m*-methoxyphenyl)-2-(dimethylaminomethyl)-cyclohexan-1-ol (author's transl)]. *Arzneimittelforschung* **28**: 114–121.
- FULLER, D. C. (2008) A simple gas chromatography-mass spectrometry procedure for the simultaneous determination of buprenorphine and norbuprenorphine in human urine. *J Anal Toxicol* **32**: 626–630.
- GARRIDO, M. J., VALLE, M., CAMPANERO, M. A., CALVO, R., TROCONIZ, I. F. (2000) Modeling of the in vivo antinociceptive interaction between an opioid agonist, (+)-*O*-desmethyltramadol, and a monoamine reuptake inhibitor, (-)-*O*-desmethyltramadol, in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 352–359.
- GHANEM, A. (2007) Enantioselective Gas Chromatographic Separation of Racemic *N*-alkylated Barbiturates: Application of C11-Chirasil-Dex as Chiral Stationary Phase in GC. *Anal Chem Insights* **2**: 75–80.
- GILLEN, C., HAURAND, M., KOBELT, D. J., WENNDT, S. (2000) Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human μ -opioid receptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**: 116–121.
- GONZALEZ, O., IRIARTE, G., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2009) Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* **50**: 630–639.
- GONZALEZ, O., IRIARTE, G., RICO, E., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2010) LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 2685–2692.
- GUPTA, A., HAMMARLUND-UDENAES, M., CHATELAIN, P., MASSINGHAM, R., JONSSON, E. N. (2006) Stereoselective pharmacokinetics of cetirizine in the guinea pig: role of protein binding. *Biopharm Drug Dispos* **27**: 291–297.
- HA, H. R., RENTSCH, K. M., KNEER, J., VONDERSCHMITT, D. J. (1993) Determination of midazolam and its alpha-hydroxy metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* **15**: 338–343.
- HACKETT, J., ELIAN, A. A. (2006) Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl SPE columns. *Forensic Sci Int* **157**: 156–162.
- HALLING, J., WEIHE, P., BROSEN, K. (2008) CYP2D6 polymorphism in relation to tramadol metabolism: a study of Faroese patients. *Ther Drug Monit* **30**: 271–275.
- HERSHEY, A. E., PATTON, J. R., DUDLEY, K. H. (1979) Gas chromatographic method for the determination of valproic acid in human plasma. *Ther Drug Monit* **1**: 217–241.
- HOLMGREN, P., CARLSSON, B., ZACKRISSON, A. L., LINDBLOM, B., DAHL, M. L., SCORDO, M. G., DRUID, H., AHLNER, J. (2004) Enantioselective analysis of citalopram and its metabolites in postmortem blood and genotyping for CYP2D6 and CYP2C19. *J Anal Toxicol* **28**: 94–104.
- HUSSEIN, M. A., CHAPMAN, R. H., BENNER, J. S., TANG, S. S., SOLOMON, H. A., JOYCE, A., FOODY, J. M. (2010) Does a single-pill antihypertensive/lipid-lowering regimen improve

- adherence in US managed care enrollees? A non-randomized, observational, retrospective study. *Am J Cardiovasc Drugs* **10**: 193–202.
- HUTT, A. J., CALDWELL, J. (1983) The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids—a novel route with pharmacological consequences. *J Pharm Pharmacol* **35**: 693–704.
- CHAN, K. K., SAWCHUK, R. J., THOMPSON, T. A., REDALIEU, E., WAGNER, W. E., JR., LESHER, A. R., WEEKS, B. J., HALL, N. R., GERARDIN, A. (1985) Bioequivalence of carbamazepine chewable and conventional tablets: single-dose and steady-state studies. *J Pharm Sci* **74**: 866–870.
- CHEUNG, S., NOLTE, H., OTTON, S. V., TYNDALE, R. F., WU, P. H., SELLERS, E. M. (1997) Simultaneous gas chromatographic determination of methamphetamine, amphetamine and their p-hydroxylated metabolites in plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **690**: 77–87.
- IRIARTE, G., GONZALEZ, O., FERREIROS, N., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., JIMENEZ, R. M. (2009) Validation of a fast liquid chromatography-UV method for the analysis of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 3045–3053.
- IRIARTE, G., FERREIROS, N., IBARRONDO, I., ALONSO, R. M., MAGUREGI, M. I., GONZALEZ, L., JIMENEZ, R. M. (2006) Optimization via experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of valsartan and its metabolite in human plasma samples. *J Sep Sci* **29**: 2265–2283.
- JAIN, D. S., SUBBIAH, G., SANYAL, M., PANDE, U. C., SHRIVASTAV, P. (2006) First LC-MS/MS electrospray ionization validated method for the quantification of perindopril and its metabolite perindoprilat in human plasma and its application to bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **837**: 92–100.
- JAMALI, F., MEHVAR, R., PASUTTO, F. M. (1989) Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls. *J Pharm Sci* **78**: 695–715.
- JAMALI, F. (1992) Stereochemistry and bioequivalence. *J Clin Pharmacol* **32**: 930–934.
- JATLOW, P. I., BAILEY, D. N. (1975) Gas-chromatographic analysis for cocaine in human plasma, with use of a nitrogen detector. *Clin Chem* **21**: 1918–1921.
- JHEE, O. H., JEON, Y. C., CHOI, H. S., LEE, M. H., OM, A. S., LEE, J. W., HONG, J. W., KIM, Y. S., KANG, J. C., LEE, Y. S., SHAW, L. M., KANG, J. S. (2006) Quantitative analysis of tiropamide in human plasma by gas chromatography coupled to mass spectrometry for application to a bioequivalence test. *Clin Chim Acta* **366**: 179–184.
- JOERN, W. A., JOERN, A. B. (1987) Detection of alprazolam (Xanax) and its metabolites in urine using dual capillary column, dual nitrogen detector gas chromatography. *J Anal Toxicol* **11**: 247–251.
- JOHANSEN, S. S., JENSEN, J. L. (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of LSD, ISO-LSD, and the main metabolite 2-oxo-3-hydroxy-LSD in forensic samples and application in a forensic case. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **825**: 21–28.
- JOSEFSSON, M., KRONSTRAND, R., ANDERSSON, J., ROMAN, M. (2003) Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **789**: 151–167.

- KAISTHA, K. K., JAFFE, J. H. (1972) TLC techniques for identification of narcotics, barbiturates, and CNS stimulants in a drug abuse urine screening program. *J Pharm Sci* **61**: 679–689.
- KAKKAR, T., MAYERSOHN, M. (1998) Simultaneous quantitative analysis of methyl salicylate, ethyl salicylate and salicylic acid from biological fluids using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **718**: 69–75.
- KEEVIL, B. G., MCCANN, S. J., COOPER, D. P., MORRIS, M. R. (2002) Evaluation of a rapid micro-scale assay for tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* **39**: 487–492.
- KELLY, K. L. (1990) Ranitidine cross-reactivity in the EMIT d.a.u. Monoclonal Amphetamine/Methamphetamine Assay. *Clin Chem* **36**: 1391–1392.
- KENNEDY, S. H., ANDERSEN, H. F., THASE, M. E. (2009) Escitalopram in the treatment of major depressive disorder: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin* **25**: 161–175.
- KIM, S. S., IM, H. T., KANG, I. M., LEE, H. S., LEE, H. W., CHO, S. H., KIM, J. B., LEE, K. T. (2007) An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **852**: 174–179.
- KINTZ, P., MANGIN, P. (1995) Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int* **73**: 93–100.
- KIRCHHEINER, J., KEULEN, J. T., BAUER, S., ROOTS, I., BROCKMOLLER, J. (2008) Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol* **28**: 78–83.
- KNOCHE, B., GEHRCKE, B., KONIG, W. A., WAINER, I. W. (1996) Determination of the enantiomeric composition of mexiletine and its four hydroxylated metabolites in urine by enantioselective capillary gas chromatography. *Chirality* **8**: 30–34.
- KOVATSI, L., POULIOPOULOS, A., PAPADAKI, A., SAMANIDOU, V., TSOUKALI, H. (2010) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the evaluation of niflumic acid cross-reactivity of two commercial immunoassays for cannabinoids in urine. *J Anal Toxicol* **34**: 229–232.
- LAUTERBURG, B. H., SMITH, C. V., MITCHELL, J. R. (1981) Determination of Isoniazid and Its Hydrazino Metabolites, Acetylisoniazid, Acetylhydrazine, and Diacetylhydrazine in Human-Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography* **224**: 431–438.
- LEBISH, P., FINKLE, B. S., BRACKETT, J. W., JR. (1970) Determination of amphetamine, methamphetamine, and related amines in blood and urine by gas chromatography with hydrogen-flame ionization detector. *Clin Chem* **16**: 195–200.
- LESTER, D. (1962) The concentration of apparent endogenous ethanol. *Q J Stud Alcohol* **23**: 17–25.
- LI, K. J., CHEN, Q. H., ZHANG, Z., ZHOU, P., LI, P., LIU, J., ZHU, J. (2008) Determination of phenazopyridine in human plasma by GC-MS and its pharmacokinetics. *J Chromatogr Sci* **46**: 686–689.
- LIM, H. K., HUBBARD, J. W., MIDHA, K. K. (1986) Development of enantioselective gas chromatographic quantitation assay for dl-threo-methylphenidate in biological fluids. *J Chromatogr* **378**: 109–123.

- MALEKI, S., GRAVES, S., BECKER, S., HORWATT, R., HICKS, D., STROSHANE, R. M., KINCAID, H. (2000) Therapeutic monitoring of sirolimus in human whole-blood samples by high-performance liquid chromatography. *Clin Ther* **22** Suppl B: B25–37.
- MAREŠOVÁ, V., CHADT, J., PŘIKRYL, L. (2006) Simultaneous determination of amphetamines and amphetamine-derived designer drugs in human urine by GC-MS. *Neuro Endocrinol Lett* **27** Suppl 2: 121–124.
- MAREŠOVÁ, V., CHADT, J., NOVÁKOVÁ, E. (2008) Screening and semiquantitative analysis of drugs and drugs of abuse in human serum samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Neuro Endocrinol Lett* **29**: 749–754.
- MARIN, S. J., COLES, R., MERRELL, M., McMILLIN, G. A. (2008) Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* **32**: 491–498.
- MARIN, S. J., MOORE, C., McMILLIN, G. A. (2009) Cross-reactivity of phentermine with an immunoassay designed to detect amphetamine in a meconium specimen. *Clin Chem* **55**: 589–590.
- MARTIN, J., DESLANDES, G., DAILLY, E., RENAUD, C., RELIQUET, V., RAFFI, F., JOLLIET, P. (2009) A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 3072–3082.
- MAURER, H., PFLEGER, K. (1987) Identification and differentiation of benzodiazepines and their metabolites in urine by computerized gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* **422**: 85–101.
- MAURER, H. H. (1992) Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* **580**: 3–41.
- MAURER, H. H., KRAEMER, T. (1992) Toxicological detection of selegiline and its metabolites in urine using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and differentiation by enantioselective GC-MS of the intake of selegiline from abuse of methamphetamine or amphetamine. *Arch Toxicol* **66**: 675–678.
- MAURER, H. H. (2000) Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. A review. *Comb Chem High Throughput Screen* **3**: 467–480.
- MAURER, H. H., BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J. (2000) Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **24**: 340–347.
- MAURER, H. H. (2004) Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **42**: 1310–1324.
- MAURER, H. H., TENBERKEN, O., KRATZSCH, C., WEBER, A. A., PETERS, F. T. (2004) Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr A* **1058**: 169–181.
- MAURER, H. H. (2007) Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* **388**: 1315–1325.

- MAYES, R. W. (1993) ACP Broadsheet No 142: November 1993. Measurement of carbon monoxide and cyanide in blood. *J Clin Pathol* **46**: 982–988.
- MERSLAVIC, M., ZUPANCIC-KRALJ, L. (1997) Determination of tramadol in human plasma by capillary gas chromatography-mass spectrometry using solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **693**: 222–227.
- MIDHA, K. K., HAWES, E. M., KORCHINSKI, E. D., HUBBARD, J. W., MCKAY, G., COOPER, J. K., ROSCOE, R. M. (1984) A bioequivalency study of two trifluoperazine tablet formulations using RIA and GC-MS. *Biopharm Drug Dispos* **5**: 25–32.
- MITCHELL, J. R., ZIMMERMAN, H. J., ISHAK, K. G., THORGEIRSSON, U. P., TIMBRELL, J. A., SNODGRASS, W. R., NELSON, S. D. (1976) Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Ann Intern Med* **84**: 181–192.
- MNIE-FILALI, O., FAURE, C., MANSARI, M. E., LAMBAS-SENAS, L., BEROD, A., ZIMMER, L., SANCHEZ, C., HADDJERI, N. (2007) R-citalopram prevents the neuronal adaptive changes induced by escitalopram. *Neuroreport* **18**: 1553–1556.
- MOODY, D. E., LAYCOCK, J. D., SPANBAUER, A. C., CROUCH, D. J., FOLTZ, R. L., JOSEPHS, J. L., AMASS, L., BICKEL, W. K. (1997) Determination of buprenorphine in human plasma by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **21**: 406–414.
- MOON, J. Y., KIM, J. Y., MOON, M. H., CHUNG, B. C., IN, M. K., CHOI, M. H. (2008) Validated gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary cannabinoids purified with a calcium-hardened beta-cyclodextrin polymer. *J Chromatogr A* **1204**: 87–92.
- MUSSHOFF, F., DALDRUP, T. (1997) Gas chromatographic/mass spectrometric determination of lysergic acid diethylamide (LSD) in serum samples. *Forensic Sci Int* **88**: 133–140.
- MUSSHOFF, F., JUNKER, H. P., LACHENMEIER, D. W., KROENER, L., MADEA, B. (2002) Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **26**: 554–560.
- NASKY, K. M., COWAN, G. L., KNITTEL, D. R. (2009) False-Positive Urine Screening for Benzodiazepines: An Association with Sertraline?: A Two-year Retrospective Chart Analysis. *Psychiatry (Edgmont)* **6**: 36–39.
- NEGRUSZ, A., BOWEN, A. M., MOORE, C. M., DOWD, S. M., STRONG, M. J., JANICAK, P. G. (2003) Elimination of 7-aminoclonazepam in urine after a single dose of clonazepam. *Anal Bioanal Chem* **376**: 1198–1204.
- NIOPAS, I., DAFTSIOS, A. C., NIKOLAIDIS, N. (2004) Evaluation of the bioequivalence of two tablet formulations of enalapril/hydrochlorothiazide after single oral administration to healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **54**: 160–165.
- NOONAN, P. K., GONZALEZ, M. A., RUGGIRELLO, D., TOMLINSON, J., BABCOCK-ATKINSON, E., RAY, M., GOLUB, A., COHEN, A. (1986) Relative bioavailability of a new transdermal nitroglycerin delivery system. *J Pharm Sci* **75**: 688–691.
- NORLANDER, B., CARLSSON, B., BERTLER, A. (1986) Sensitive assay of methadone in plasma by using capillary gas chromatography with photoionization detection. *J Chromatogr* **375**: 313–319.
- OHTAWA, M., TAKAYAMA, F., SAITOH, K., YOSHINAGA, T., NAKASHIMA, M. (1993) Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Br J Clin Pharmacol* **35**: 290–297.

- PAAR, W. D., FRANKUS, P., DENGLER, H. J. (1992) The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *Clin Investig* **70**: 708–710.
- PARK, J. H., PARK, Y. S., LEE, M. H., RHIRN, S., SONG, J. C., LEE, S. J., KIM, J. M., SHAW, L. M., KANG, J. S. (2008) Determination of plasma topiramate concentration using LC-MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers. *Biomedical Chromatography* **22**: 822–829.
- PEDERSEN, R. S., DAMKIER, P., BROSEN, K. (2005) Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol Ther* **77**: 458–467.
- PEDERSEN, R. S., DAMKIER, P., BROSEN, K. (2006) Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *Eur J Clin Pharmacol* **62**: 513–521.
- PEGON, Y., POURCHER, E., VALLON, J. J. (1982) Evaluation of the EMIT Tox enzyme immunoassay for toxicological analysis of benzodiazepines in serum. *J Anal Toxicol* **6**: 1–3.
- PETERS, F. T., SCHAEFER, S., STAACK, R. F., KRAEMER, T., MAURER, H. H. (2003) Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **38**: 659–676.
- PETERS, F. T., DRUMMER, O. H., MUSSHOFF, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci Int* **165**: 216–224.
- PETERSON, R. G., BRUCKNER, J. V. (1978) A rapid analytical method for measuring toluene in biological specimens. *J Chromatogr* **152**: 69–78.
- PETERSON, R. L., RODGERSON, D. O. (1974) Gas-chromatographic determination of ethylene glycol in serum. *Clin Chem* **20**: 820–824.
- POIRIER, J. M., LEBOT, M., DESCAMPS, P., LEVY, M., CHEYMOL, G. (1994) Determination of itraconazole and its active metabolite in plasma by column liquid chromatography. *Ther Drug Monit* **16**: 596–601.
- POLETTINI, A. (1999) Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **733**: 47–63.
- PORTER, W. H., RUTTER, P. W., YAO, H. H. (1999) Simultaneous determination of ethylene glycol and glycolic acid in serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **23**: 591–597.
- POULSEN, L., ARENDT-NIELSEN, L., BROSEN, K., SINDRUP, S. H. (1996) The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* **60**: 636–644.
- POWELL, M. L., WEISBERGER, M., GURAL, R., CHUNG, M., PATRICK, J. E., RADWANSKI, E., SYMCHOWICZ, S. S. (1985) Comparative bioavailability and pharmacokinetics of three formulations of albuterol. *J Pharm Sci* **74**: 217–219.
- REVES, J. G., FRAGEN, R. J., VINIK, H. R., GREENBLATT, D. J. (1985) Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology* **62**: 310–324.
- RIFFITTS, J. M., GISCLON, L. G., STUBBS, R. J., PALMER, M. E. (1999) A capillary gas chromatographic assay with nitrogen phosphorus detection for the quantification of topiramate in human plasma, urine and whole blood. *J Pharm Biomed Anal* **19**: 363–371.
- ROHRICH, J., ZORNTLEIN, S., LOTZ, J., BECKER, J., KERN, T., RITTNER, C. (1998) False-positive LSD testing in urine samples from intensive care patients. *J Anal Toxicol* **22**: 393–395.

- SANCHEZ, C., BOGESO, K. P., EBERT, B., REINES, E. H., BRAESTRUP, C. (2004) Escitalopram versus citalopram: the surprising role of the R-enantiomer. *Psychopharmacology (Berl)* **174**: 163–176.
- SHAIKH, S., HULL, M. J., BISHOP, K. A., GRIGGS, D. A., LONG, W. H., NIXON, A. L., FLOOD, J. G. (2008) Effect of tramadol use on three point-of-care and one instrument-based immunoassays for urine buprenorphine. *J Anal Toxicol* **32**: 339–343.
- SHEN, Z., WANG, S., BAKHTIAR, R. (2002) Enantiomeric separation and quantification of fluoxetine (Prozac) in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction in 96-well plate format. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**: 332–338.
- SHIH, M. Y., HSU, J. Y., WENG, Y. S., FU, L. S. (2008) Influence of cetirizine and levocetirizine on two cytokines secretion in human airway epithelial cells. *Allergy Asthma Proc* **29**: 480–485.
- SCHARPF, F., RIEDEL, K. D., LAUFEN, H., LEITOLD, M. (1994) Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for amlodipine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Appl* **655**: 225–233.
- SCHULZ, M., SCHMOLDT, A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* **58**: 447–474.
- SCHUTZ, H., EBEL, S., FITZ, H. (1985) [Screening and detection of tetrazepam and its major metabolites]. *Arzneimittelforschung* **35**: 1015–1024.
- SCHÜTZ, H. (1986) *Dünnschichtchromatographische Suchanalyse für 1,4 - Benzodiazepine in Harn, Blut und Mageninhalt*. VCH - Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- SLANAŘ, O., NOBILIS, M., KVĚTINA, J., MIKOVINY, R., ZIMA, T., IDLE, J. R., PERLÍK, F. (2007) Miotic action of tramadol is determined by CYP2D6 genotype. *Physiol Res* **56**: 129–136.
- SRINIVAS, N. R., HUBBARD, J. W., COOPER, J. K., MIDHA, K. K. (1988) Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for dl-fenfluramine and dl-norfenfluramine in plasma. *J Chromatogr* **433**: 105–117.
- STAMER, U. M., STUBER, F. (2007) Codeine and tramadol analgesic efficacy and respiratory effects are influenced by CYP2D6 genotype. *Anaesthesia* **62**: 1294–1295.
- STAMER, U. M., STUBER, F., MUDERS, T., MUSSHOF, F. (2008) Respiratory depression with tramadol in a patient with renal impairment and CYP2D6 gene duplication. *Anesth Analg* **107**: 926–929.
- STRALEY, C. M., CECIL, E. J., HERRIMAN, M. P. (2006) Gatifloxacin interference with opiate urine drug screen. *Pharmacotherapy* **26**: 435–439.
- STROCCHI, E., PRANDIN, M. B., ANTONIOLI, P., LISI, L., MALINI, P. L., AMBROSIONI, E., MAGNANI, M. (1996) Compliance to anti-hypertensive therapy: analysis of data available from prescriptions. *American Journal of Hypertension* **9**: 1.
- TAKEUCHI, A., TAKIGAWA, T., ABE, M., KAWAI, T., ENDO, Y., YASUGI, T., ENDO, G., OGINO, K. (2007) Determination of formaldehyde in urine by headspace gas chromatography. *Bull Environ Contam Toxicol* **79**: 1–4.
- TAN, A., JIN, W., DENG, F., HUSSAIN, S., MUSUKU, A., MASSE, R. (2009) Bioanalytical method development and validation using incurred samples--simultaneous quantitation of ramipril and ramiprilat in human EDTA plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 3673–3680.
- TAYLOR, R. W., JAIN, N. C., GEORGE, M. P. (1987) Simultaneous identification of cocaine and benzoylecgonine using solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **11**: 233–234.

- TERADA, M., YAMAMOTO, T., YOSHIDA, T., KUROIWA, Y., YOSHIMURA, S. (1982) Rapid and highly sensitive method for determination of methamphetamine and amphetamine in urine by electron-capture gas chromatography. *J Chromatogr* **237**: 285–292.
- TESTA, B., MAYER, J. M. (1988) Stereoselective drug metabolism and its significance in drug research. *Prog Drug Res* **32**: 249–303.
- TESTA, B., HOMSTEDT, B., HARTMUT, F. (1990) *Chirality and biological activity*. A R Liss, New York.
- TILLEMENT, J. P., TESTA, B., BREE, F. (2003) Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H1-receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* **66**: 1123–1126.
- VARMA, R. (1978) Simultaneous gas chromatographic determination of diphenylhydantoin, carbamazepin (Tegretol), phenobarbital and primidone in presence of Kemadrin (procyclidine) and Prolixin (fluphenazine) in plasma of psychiatric patients. *J Chromatogr* **155**: 182–186.
- VEČERKOVÁ, J. (1994) Systematic analytic procedure for identification of unknown medicaments in biological material. *Sb Lek* **95**: 357–361.
- VEČERKOVÁ, J. (1997) *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*. Nakladatelství Univerzity Karlovy Praha.
- WEDLUND, P. J., SWEETMAN, B. J., MCALLISTER, C. B., BRANCH, R. A., WILKINSON, G. R. (1984) Direct enantiomeric resolution of mephenytoin and its N-demethylated metabolite in plasma and blood using chiral capillary gas chromatography. *J Chromatogr* **307**: 121–127.
- WILKINSON, P. K., WAGNER, J. G., SEDMAN, A. J. (1975) Sensitive head-space gas chromatographic method for the determination of ethanol utilizing capillary blood samples. *Anal Chem* **47**: 1506–1510.
- WU, W. N., MCKOWN, L. A., CODD, E. E., RAFFA, R. B. (2002) In vitro metabolism of the analgesic agent, tramadol-N-oxide, in mouse, rat, and human. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **27**: 193–197.
- YANG, X. J., HU, Y. S., ZHENG, X., WANG, G. J., TU, X. D. (1990) [Determination of metoprolol in plasma by gas chromatography and electron-capture detection]. *Yao Xue Xue Bao* **25**: 457–461.
- YAO, T. W., ZENG, S., WANG, T. W., CHEN, S. Q. (2001) Phenotype analysis of cytochrome P450 2C19 in Chinese subjects with mephenytoin S/R enantiomeric ratio in urine measured by chiral GC. *Biomed Chromatogr* **15**: 9–13.
- YEE, G. C., GMUR, D. J., KENNEDY, M. S. (1982) Liquid-chromatographic determination of cyclosporine in serum with use of a rapid extraction procedure. *Clin Chem* **28**: 2269–2271.
- ZHONG, H., HANSEN, K. B., BOYLE, N. J., HAN, K., MUSKE, G., HUANG, X., EGEJBERG, J., SANCHEZ, C. (2009) An allosteric binding site at the human serotonin transporter mediates the inhibition of escitalopram by R-citalopram: kinetic binding studies with the ALI/VFL-SI/TT mutant. *Neurosci Lett* **462**: 207–212.

SEZNAM PŘÍLOH

1. CHYTIL, L., ŠTÍCHA, M., MATOUŠKOVÁ, O., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2009) Enantiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 1937–1942.
2. CHYTIL, L., MATOUŠKOVÁ, O., ČERNÁ, O., POKORNÁ, P., VOBRUBA, V., PERLÍK, F., SLANAŘ, O. (2010) Enantiomeric determination of tramadol and *O*-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 481–486.
3. CHYTIL, L., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., ŠTRAUCH, B., WIDIMSKÝ, J., JR., ŠTÍCHA, M., SLANAŘ, O. (2010) Development of a fast LC-MS/MS method for quantification of rilmenidine in human serum: elucidation of fragmentation pathways by HRMS. *J Mass Spectrom* **45**: 1179–1185.
4. CHYTIL, L., ŠTRAUCH, B., CVAČKA, J., MAREŠOVÁ, V., WIDIMSKÝ, J., JR., HOLAJ, R., SLANAŘ, O. (2010) Determination of doxazosin and verapamil in human serum by fast LC-MS/MS: application to document non-compliance of patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 3167–3173.
5. CHYTIL, L., MAREŠOVÁ, V., SLANAŘ, O. (2011) Průkaz benzodiazepinů v moči pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. *Soud lek* **56**: 10–16.
6. MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther* (v tisku)
7. MATOUŠKOVÁ, O., SLANAŘ, O., CHYTIL, L., PERLÍK, F. (2010) Pupillometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* **149**: 66–68.