

Anna SYNOWIEC<sup>1</sup>  
Ewa GOMÓŁKA<sup>2,3</sup>  
Tomasz ZYSS<sup>4</sup>  
Andrzej ZIĘBA<sup>4</sup>  
Ewa FLOREK<sup>5</sup>  
Wojciech PIEKOSZEWSKI<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków  
Kierownik:  
Prof. dr hab. Paweł Kościelniak

<sup>2</sup>Pracownia Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej, Katedra Toksykologii i Chorób Środowiskowych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków  
Kierownik Pracowni:  
Dr Ewa Gomółka

<sup>3</sup>Pracownia Toksykologii, Zakład Diagnostyki, Szpital Uniwersytecki, Kraków  
Kierownik Pracowni:  
Dr Ewa Gomółka

<sup>4</sup>Klinika Psychiatrii Dorosłych, Katedra Psychiatrii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków  
Kierownik Kliniki:  
Prof. dr hab. n. med. Andrzej Zięba

<sup>5</sup>Laboratorium Badań Środowiskowych, Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań  
Kierownik Laboratorium:  
Prof. dr hab. Ewa Florek

<sup>6</sup>Pracownia Wysokorozdzielczej Spektrometrii Mas, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków  
Kierownik Pracowni:  
Prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski

#### Dodatkowe słowa kluczowe:

aripiprazol  
HPLC  
monitorowanie stężenia leku

#### Additional key words:

aripiprazole  
HPLC  
therapeutic drug monitoring

Adres do korespondencji:  
dr Ewa Gomółka

Pracownia Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
31-501 Kraków  
ul. Śniadeckich 6  
e-mail: ewa.gomolka@uj.edu.pl

## Zastosowanie metody HPLC-UV do oznaczania aripiprazolu w surowicy

### Application of HPLC-UV method for aripiprazole determination in serum

Aripiprazol jest jednym z najnowszych leków stosowanych w terapii schizofrenii. Lek ten nie posiada bezwzględnych wskazań do monitorowania stężenia w trakcie terapii. Pomimo tego, dla oceny skuteczności stosowanych dawek wskazane jest sprawdzenie, w jaki sposób stężenie aripiprazolu koreluje ze stanem klinicznym pacjenta. Badanie stężenia leku w trakcie terapii pozwala na uniknięcie przekroczenia stężeń terapeutycznych w surowicy i wyeliminowanie efektów niepożądanych oraz jest formą kontroli, czy pacjent stosuje zalecone przez lekarza dawki leku.

Celem pracy było opracowanie prostej metody oznaczania aripiprazolu w surowicy na potrzeby prowadzenia kontroli stężenia leku w trakcie terapii.

Zastosowano metodę wysokosprawną chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV), rozdział prowadzono na kolumnie LC-8 w warunkach izokratycznych, przy przepływie 1,2 ml/min. Faza ruchoma zawierała mieszaninę 0,025M buforu trietyloamonowego i acetonitrylu w stosunku 62:38. Pomiarów dokonywano przy długości fali  $\lambda=214$  nm; jako wzorzec wewnętrzny zastosowano promazyne. Parametry walidacyjne metody: zakres liniowości (LOL) 100-800 ng/ml, granica detekcji (LOD) 10 ng/ml, granica oznaczalności (LOQ) 100 ng/ml. Współczynniki zmienności (CV) określające dokładność i precyzję metody nie przekraczały 10%.

Sprawdzono przydatność opracowanej metody w praktyce klinicznej dla celów terapii monitorowanej stężeniem leku u pacjenta leczonego aripiprazolem.

#### Wstęp

Preparaty z grupy atypowych leków przeciwpsychotycznych wyparły klasyczne neuroleptyki i od lat 90 ubiegłego wieku są szeroko stosowane w leczeniu schizofrenii. Badania wskazały, że atypowe leki przeciwpsychotyczne, do których należą risperidon, olanzapina, klozapina, amisulpryd, kwetiapina, ziprasidon, sertindol oraz aripiprazol są bezpieczniejsze w działaniu, nie zaburzają funkcji układu pozapiramidowego lub wywierają tylko niewielki wpływ [11]. Aripiprazol

aripiprazole is a new drug applied in schizophrenia treatment. There are not strict indications for aripiprazole therapeutic drug monitoring. Despite, serum aripiprazole measuring would help control the drug doses effectiveness. The drug monitoring can eliminate overdosing, adverse effects and let control proper drug ingestion.

The aim of the paper was to develop a simple method for aripiprazole determination in serum for therapeutic drug monitoring. High performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC-UV) was used. Resolution was performed on LC-8 column; moving phase was solution 0,025M trimethylammonium buffer : acetonitrile (62:38). Isocratic flow was 1,2 ml/min; internal standard (IS) was promazine; monitored wavelength was  $\lambda=214$  nm.

The validation parameters were: limits of linearity (LOL) 100-800 ng/ml, limit of detection (LOD) 10 ng/ml, limit of quantity (LOQ) 100 ng/ml. Coefficient of variation (CV) describing accuracy and precision didn't cross 10%.

The method was useful for therapeutic drug monitoring in serum of patients treated with aripiprazole.

(Abilify) jest jednym z najnowszych leków stosowanych w farmakoterapii schizofrenii, dopuszczonym do stosowania przez FDA w 2002 roku natomiast w Unii Europejskiej w 2004 roku. Jest to związek chemiczny o nomenklaturze systematycznej wg (IUPAC) 7-[4-[4-(2,3-dichlorofenyl)piperazyn-1-yl]butoksy]-3,4-dihydro-1H-chinolin-2-on (Rycina 1.) [7]. Aripiprazol jest prekursorem nowej grupy neuroleptyków, tak zwanych stabilizatorów układu dopaminergicznego i serotonergicznego, nazywany również

lekiem przeciwpsychotycznym trzeciej generacji [1].

Większość atypowych leków II generacji wywiera działanie sedatywne, co jest zjawiskiem niekorzystnym. Wiele danych wskazuje na problemy kliniczne związane z zaburzeniami przemiany materii pod postacią zespołu metabolicznego - m.in. przyrostu masy ciała, zaburzeń przemiany węglowodanów z hiperglikemią (u części chorych może rozwinąć się cukrzyca typu 2) oraz zaburzeń gospodarki lipidowej [5, 15]. Objawy niepożądane obniżają wartość kliniczną tych leków. Ich stosowanie wymaga uwzględnienia przeciwwskazań i monitorowania stanu somatycznego. Jedną z form prowadzenia bezpiecznej terapii jest monitorowanie stężenia leku. Pomiar stężenia aripiprazolu jest pomocny przy uwzględnieniu osobniczych różnic aktywności enzymów wpływających na metabolizm leku (zależny od genotypu i fenotypu) i ostatecznie pozwala określić bezpieczną dawkę leku dla danego pacjenta [3].

### Farmakokinetyka aripiprazolu

Aripiprazol dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, maksymalne stężenie w osoczu osiąga w ciągu 3-5 godzin po podaniu. Dostępność biologiczna wynosi około 87%. Spożywanie posiłków o dużej zawartości tłuszczu nie wpływa na farmakokinetykę aripiprazolu. Objętość dystrybucji aripiprazolu wynosi 4,9 l/kg, co wskazuje na dystrybucję pozanaczyniową. Aripiprazol jest metabolizowany głównie w wątrobie na drodze dehydrogenacji, hydroksylacji oraz N-dealkilacji (Rycina 2), przy udziale enzymów CYP2D6 oraz CYP3A4 [4, 8]. W stanie stacjonarnym aktywny metabolit, dehydroaripiprazol, stanowi około 40% AUC aripiprazolu w osoczu. W stężeniach terapeutycznych aripiprazol i dehydroaripiprazol wiążą się w ponad 99% z białkami surowicy, głównie z albuminami. Biologiczny okres półtrwania aripiprazolu wynosi od 75 do 146 godzin i jest zależny od aktywności izoenzymu CYP2D6 i CYP 3A4. Całkowity klirens aripiprazolu wynosi 0,7 ml/min/kg. Mniej niż 1% niezmienionego aripiprazolu wydalą się z moczem i około 18% z kałem [4].

Celem pracy było opracowanie szybkiej i prostej metodyki oznaczania aripiprazolu w surowicy krwi oraz sprawdzenie przydatności opracowanej metody dla celów kontroli terapii.

### Materiał i metody

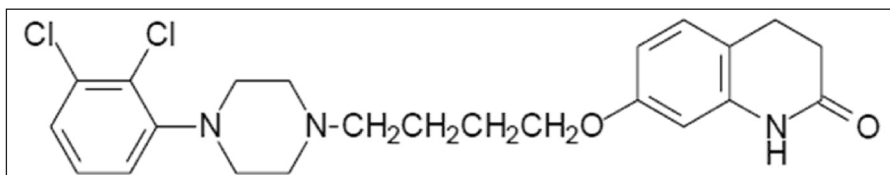
Do oznaczenia aripiprazolu w surowicy zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV). Zastosowano chromatograf cieczowy Pump L-7100 (Merck-Hitachi). Rozdział prowadzono na kolumnie LC-8 (Supelco). Pracowano w warunkach izokratycznych przy przepływie 1,2 ml/min. Skład fazy ruchomej: 0,025M bufor tryetyloamoniowy (Fluka) : acetonitryl HPLC Grade (Sigma) (62:38). Monitorowano długość fali 214 nm. Objętość próbki wprowadzanej na kolumnę - 100 µl. Czas analizy - 25 min. Czasy retencji wynosiły odpowiednio 14,3 min dla aripiprazolu i 16,5 min dla IS. Rozdział chromatograficzny przedstawia Rycina 3.

Przydatność metody sprawdzono na próbce surowicy krwi pacjenta leczonego aripiprazolem. Oznaczenia stężenia aripiprazolu prowadzono w Pracowni Toksykologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

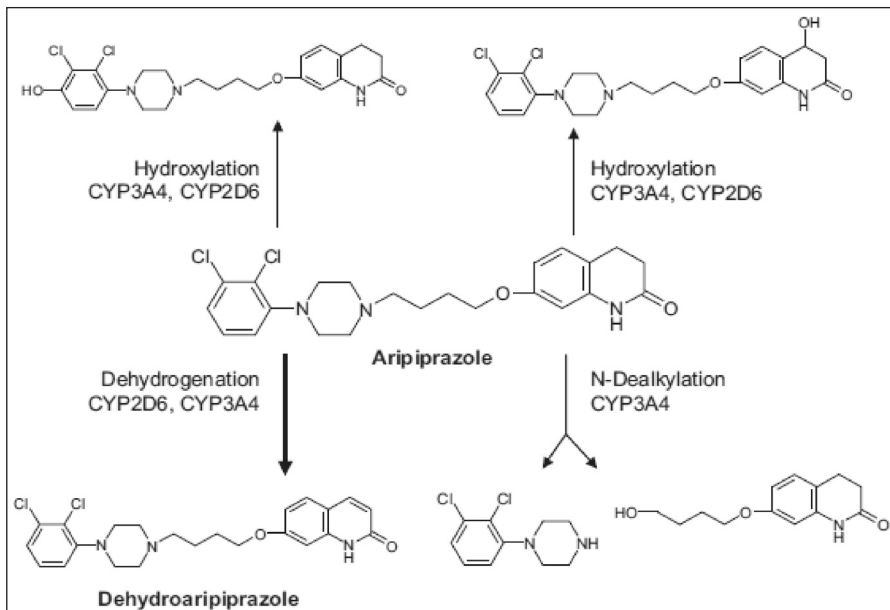
### Procedura ekstrakcji aripiprazolu z surowicy

Zastosowano metodę ekstrakcji ciecz-ciecz (L-L). Do 500 µl próbki badanej (surowicy) dodano 50 µl roztworu promazyiny o stężeniu 1 µg/ml, jako wzorca wewnętrznego (IS), próbki alkalizowano 200 µl buforu

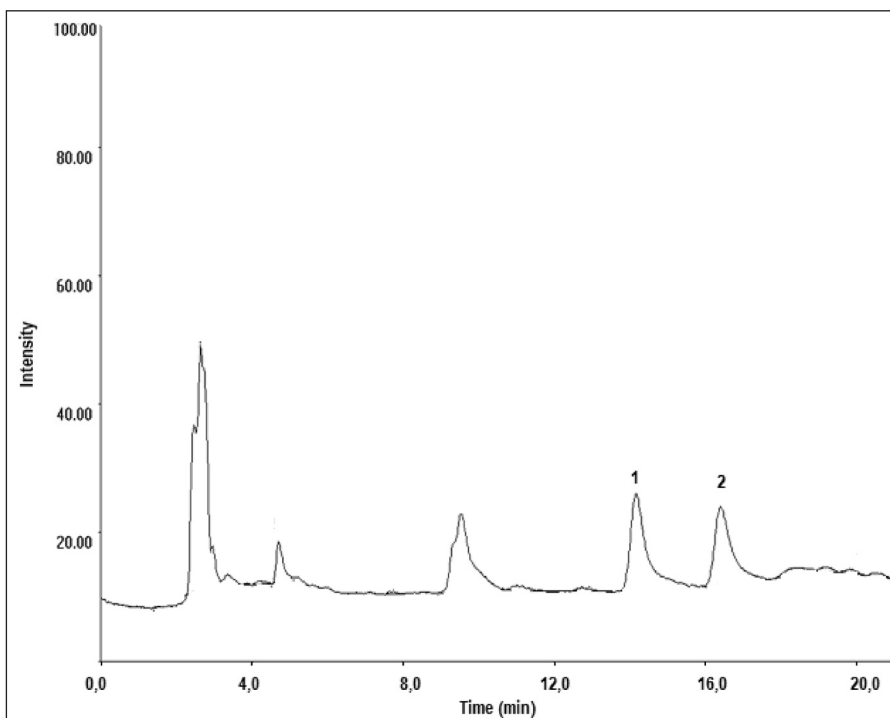
TRIS (POCH), ekstrahowano 1 ml mieszaniny heksan (Sigma): alkohol izoamylový (Merck) (99:1), wstrząsano przez 2 minuty i wirowano 5 min. przy 6 tys. rpm. Fazę organiczną odparowano w temp. 40°C w strumieniu sprężonego powietrza. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczano w 300 µl fazy ruchomej.



Rycina 1  
Wzór strukturalny aripiprazolu.  
Structural formula of aripiprazole.



Rycina 2  
Metabolizm aripiprazolu.  
Metabolism of aripiprazole.



Rycina 3  
Rozdział chromatograficzny badanej próbki surowicy (1 – aripiprazol, 2 – promazyina (IS)).  
Chromatography resolution of serum sample (1 – aripiprazole, 2 – promazine (IS)).

## Walidacja metody

Kalibrację metody wykonano stosując metodę serii wzorców przygotowanych z surowicy wzbogaconej aripiprazolem dla otrzymania roztworów o stężeniach 100, 200, 500, 800 ng/ml. Współczynnik korelacji krzywej kalibracji wynosił 0,9967. Granicę wykrywalności (LOD) wyznaczono, jako 3-krotną wartość stosunku sygnału szumu do sygnału wzorca wewnętrznego (mierzone, jako powierzchnia pików). Granicę oznaczalności (LOQ) wyznaczono, jako dziesięciokrotną wartość stosunku sygnału szumu do sygnału wzorca wewnętrznego (mierzone, jako powierzchnia pików).

Dokładność wyznaczono w oparciu o analizę 5-elementowych serii prób surowicy zawierających aripiprazol na poziomach 100 i 800 [ng/ml]. Dokładność obliczono ze wzoru:

Dokładność =  $(Ct-Co)/Ct \cdot 100\%$ , gdzie:  $Ct$  – teoretyczna wartość stężenia,  $Co$  – wyznaczona wartość stężenia.

Za miarę precyzji przyjęto współczynnik zmienności (CV). Precyzję metody badano dla dwóch różnych stężeń aripiprazolu, analizując te roztwory w 5-elementowych seriach w ciągu tego samego dnia oraz w odstępie 5 dni. Do obliczeń precyzji zastosowano wzór:  $CV = SD/C\bar{s}r \cdot 100\%$ , gdzie:  $SD$  – odchylenie standardowe,  $C\bar{s}r$  – stężenie średnie. Parametry walidacyjne metody zebrano w Tabeli I.

## Omówienie i wnioski

Aripiprazol jest lekiem przeciwpsychozytycznym o nowoczesnym profilu farmakologicznym, polegającym na połączeniu właściwości częściowego agonizmu o wysokim powinowactwie wobec receptorów dopaminowych D2 oraz serotoninowych 5HT1A z antagonizmem wobec receptorów 5HT2A [10, 12]. Ze względu na swój odmienny profil receptorowy aripiprazol może być interesującą alternatywą wobec pozostałych leków przeciwpsychozytycznych, a nawet może być uznany za lek tzw. trzeciej generacji w leczeniu schizofrenii. Cechuje się dobrą tolerancją, powodując mniej objawów niepożądanych niż inne leki przeciwpsychozytyczne, co sugeruje, że może być chętniej od innych neuroleptyków stosowany w leczeniu długoterminowym. Wyniki badań skuteczności aripiprazolu są zachęcające, wymagają jednak potwierdzenia w kolejnych próbach, na większych grupach badanych [1, 3, 12, 14].

Metabolizm aripiprazolu jest zależny głównie od aktywności izoenzymu CYP2D6 i CYP 3A4 [4]. Enzymy te cechują się dużą zmiennością w populacji, zależną od genotypu oraz fenotypu. Osobnicze różnice w

metabolizmie aripiprazolu wpływają na biologiczny okres półtrwania leku, który waha się od 75 h (szybci metabolizerzy) do 146 h (wolni metabolizerzy) [8, 10]. U pacjentów ze zmniejszoną aktywnością izoenzymów CYP2D6 i CYP3A4 dla odpowiedniego efektu klinicznego wymagane są niższe dawki leku. Wolni metabolizerzy narażeni są też na większe prawdopodobieństwo wystąpienia efektów niepożądanych: pobudzenie, bezsenność, objawy pozapiramidowe, akatyzyja, zawroty i bóle głowy, nieostre widzenie, niestrawność, zgaga, nudności, wymioty, zaparcia, nadmierne wydzielanie śliny, uczucie zmęczenia [15, 16]. Opracowaną metodę oznaczania aripiprazolu można, więc wykorzystać dla zwiększenia skuteczności terapii i ograniczenia efektów niepożądanych.

Techniki umożliwiające oznaczanie aripiprazolu w surowicy, to chromatografia cieczowa (HPLC-DAD, LC-MS) oraz elektroforeza kapilarna [2, 6, 9, 13]. Terapeutyczne i toksyczne zakresy stężeń tego leku nie są znane, więc wyniki oznaczeń leku w surowicy odnosi się do efektów klinicznych.

Dla oceny przydatności opisanej metody wykonano oznaczenie stężenia aripiprazolu w surowicy pacjenta leczonego tym lekiem z powodu schizofrenii. Zmierzone stężenie wynosiło 836 ng/ml. Interpretacja uzyskanego wyniku została dokonana w oparciu o aktualną literaturę i stwierdzono, że wynik ten znacznie przekracza najwyższe opisane w literaturze poziomy aripiprazolu w surowicy [3, 8]. Stężenia aripiprazolu u pacjentów leczonych minimum 6 tygodni terapeutycznymi dawkami aripiprazolu (10-30 mg/dzień) mieściły się w zakresie od 105 do 549 ng/ml [3, 8]. Nie oznacza to jednak, że oznaczone stężenie osiągnęło zakres toksyczny; górna granica zakresu stężeń terapeutycznych nie została dla aripiprazolu do tej pory określona.

Aripiprazol, to stosunkowo nowy lek przeciwpsychozytyczny. Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania tego leku podkreśla wielu autorów, chociaż farmakokinetyka, zależna od CYP2D6 i CYP3A4 wskazywałaby na możliwe istotne różnice w jego metabolizmie w naszej populacji [26].

Opisana metodyka jest zalecana do monitorowania terapii pomiarem stężeń

nia aripiprazolu w surowicy; cechuje się odpowiednią czułością i selektywnością, umożliwia oznaczenie stężenia leku w materiale biologicznym na poziomach terapeutycznych, także u pacjentów przyjmujących inne leki.

Opracowanie metody, walidacja i ocena jej przydatności w praktyce klinicznej stanowią etap wstępny pracy badawczej dotyczącej bezpieczeństwa i skuteczności terapii aripiprazolem. Planowane jest zbadanie korelacji pomiędzy dawką, stężeniem leku w surowicy oraz obserwowanym efektem klinicznym. W dalszej części podjęta zostanie próba wyznaczenia zakresu stężeń terapeutycznych aripiprazolu podczas długotrwałego leczenia.

## Piśmiennictwo

1. **Bhattacharjee J., El-Sayeh H.G.G.:** Aripiprazole versus typical antipsychotic drugs for schizophrenia. The Cochrane Library, 2010.
2. **Caloro M., Lionetto L., Cuomo I. et al.:** An improved simple LC-MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite. 2012, 62, 135.
3. **Kirschbaum K. M., Muller M. J., Zernig G. et al.:** Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection. Clin. Chem. 2005, 51, 1718.
4. **Kirschbaum K. M., Uhr M., Holthoewer D. et al.:** Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice – Sci. Direct Neuropharmacol. 2010, 59, 474.
5. **Krzystanek M., Krupka-Matuszczyk I.:** Severity of negative symptoms in schizophrenic patients treated with atypical neuroleptic – follow-up. Probl. Med. Rodz. 2008, 4, 63.
6. **Lancelin F., Djebbari K., Tabouti K. et al.:** Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2008, 867, 15.
7. **Laughren T.:** ABILIFY (aripiprazole) Tablets. Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd. 2006.
8. **Mallikaarjun S., Salazar D.E., Bramer S.L.:** Pharmacokinetics, tolerability, and safety of aripiprazole following multiple oral dosing in normal healthy volunteers. J. Clin. Pharmacol. 2004, 44, 179.
9. **Musenga A., Saracino M. A., Spinelli D. et al.:** Analysis of the recent antipsychotic aripiprazole in human plasma by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with diode array detection. Anal. Chim. Acta 2008, 612, 204.
10. **Ohno Y.:** Therapeutic role of 5-HT1A receptors in the treatment of schizophrenia and parkinson's diseases. CNS Neurosci. Therap. 2011, 17, 58.
11. **Pużyński S.:** Postępy w psychiatrii w 2005 roku. Med. Prak. 2006, 2, 172.
12. **Seeman P.:** All roads to schizophrenia lead to dopamine supersensitivity and elevated dopamine D2 high receptors. CNS Neurosci. Therap. 2011, 17, 118.
13. **Shimokawa Y., Akiyama H., Kashiyama E. et al.:** High performance liquid chromatographic methods for the determination of aripiprazole with ultraviolet detection in rat plasma and brain: application to the pharmacokinetic study. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2005, 821, 8.
14. **Travis M. J., Burns T., Dursun S. et al.:** Aripiprazole in schizophrenia: consensus guidelines. Blackwell Publishing Ltd Int. J. Clin. Pract. 2005, 59, 485.
15. **Ucok A., Gaebel W.:** Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. World Psychiatry 2008, 7, 58.
16. **Woron J., Grabski B., Siwek M.:** Pharmacoeconomic and toxicological aspects of atypical neuroleptics usage. Przegl. Lek. 2011, 68, 47.

## Tabela I

### Parametry walidacji metody oznaczania aripiprazolu w surowicy metodą HPLC-UV.

Validation parameters of aripiprazole serum determination by HPLC-UV.

Zakres liniowości (LOL) [ng/ml]		100 – 800
Równanie		$y=0,031x - 0,4456$
R2		0,9967
Granica wykrywalności (LOD) [ng/ml]		10
Granica oznaczalności (LOQ) [ng/ml]		100
Precyzja CV [%]	100 ng/ml	6,1 4,9
	800 ng/ml	
Zmienność w czasie dnia CV [%]	100 ng/ml	11,1 5,1
	800 ng/ml	
Zmienność pomiędzy dniami CV [%]	100 ng/ml	9,0 5,1
	800 ng/ml	