

Universitatea de Medicină și Farmacie

"Carol Davila"

Facultatea de Farmacie

**Metode cromatografice performante pentru monitorizarea
terapiei. Aplicații pentru medicamente inhibitoare
selective ale recaptării serotoninei (fluoxetină) și
anticonvulsivante (carbamazepină)**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand:

Farm. Cristian Tuchilă

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Farm. Cristina Dinu-Pîrvu

București

2019

Cuprinsul tezei de doctorat

I.	Introducere	4
1.	Motivarea alegerii temei.....	4
II.	Stadiul actual al cunoașterii	9
2.	Monitorizarea terapeutică.....	9
	2.1. Introducere.....	9
	2.2. Concepte fundamentale.....	9
	2.3. Criterii pentru evaluarea clinică a monitorizării medicamentelor	11
	2.4. Indicații pentru monitorizarea terapeutică.....	12
	2.5. Cerințe analitice.....	13
	2.6. Programarea măsurărilor.....	14
	2.7. Tehnici de măsurare.....	15
	2.8. Interpretarea rezultatelor.....	15
	2.9. Aplicații.....	15
	2.10. Depresia.....	16
	2.11. Epilepsia.....	20
	2.12. Medicamente propuse pentru monitorizare terapeutică.....	24
3.	Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).....	31
	3.1. Introducere	31
	3.2. Principii.....	33
	3.3. Parametrii de performanță cromatografici.....	35
	3.4. Validarea metodelor	38
4.	Evaluarea critica a metodelor analitice publicate in literatura pentru determinarea carbamazepinei si fluoxetinei din probe biologice.....	39
	4.1. Carbamazepina.....	39
	4.2. Fluoxetina.....	45
III.	Contribuții personale	50
5.	Metoda HPLC de dozare a carbamazepinei din plasma umana utilizand nitrazepam ca standard intern.....	50
	5.1. Introducere	50
	5.2. Premise.....	50
	5.3. Materiale si metode.....	52
	5.4. Rezultate si discutii.....	62

5.5. Concluzii.....	76
6. Metoda HPLC de dozare a carbamazepinei din plasma umana utilizand trimipramină ca standard intern.....	77
6.1. Introducere	77
6.2. Premise.....	77
6.3. Materiale și metode.....	79
6.4. Rezultate și discuții.....	89
6.5. Concluzii.....	105
7. Metoda de dozare a fluoxetinei din plasma umana utilizand trimipramina ca standard intern.....	106
7.1. Introducere	106
7.2. Premise.....	106
7.3. Materiale și metode.....	107
7.4. Rezultate și discuții.....	118
7.5. Concluzii.....	137
8. Analiza unor probe de plasmă provenite de la pacienți tratați cu carbamazepină.....	138
8.1. Rezumat al studiului.....	138
8.2. Rezultate.....	138
8.3. Concluzii.....	145
9. Concluziile generale.....	146
IV. Bibliografie	150
V. Anexe	166
1. Anexa 1 – Protocolul studiului.....	166
2. Anexa 2 – Listă de tabele.....	174
3. Anexa 3 – Listă de figuri.....	176

1. Introducere

Contextul medical, farmacoterapeutic și toxicologic actual reprezintă o provocare complexă pentru profesioniștii în domeniu și un teren nesigur pentru pacienți, în condițiile în care capacitatea noastră de a genera informații o depășește cu mult pe aceea de a le interpreta.

Devine impetuos necesară achiziția cât mai rapidă a datelor științifice și clinice și transformarea acestora în resurse utilizabile în favoarea pacienților. Acest aspect devine esențial în managementul polipatologiilor, al afecțiunilor majore, ce pun viața în pericol și, nu în ultimul rând, în cadrul terapiei cu substanțe active a caror comportare farmacocinetică și toxicologică prezintă fluctuații interindividuale.

Profilul farmacocinetic al carbamazepinei indică, sub numeroase aspecte, necesitatea monitorizării concentrației plasmatice a anticonvulsivantului pentru a asigura eficacitatea și siguranța terapeutică. Nivelul plasmatic de carbamazepină este, de asemenea, cel mai sigur marker de diagnostic al intoxicațiilor, întrucât semnele clinice și paraclinice sunt nespecifice și doar orientative.

Încă din 1970 s-a descoperit rolul serotoninei în mecanismul neurochimic al depresiei și s-a încercat descoperirea unui medicament care să medieze acest dezechilibru. Abia în anul 1987 a fost aprobată de US FDA (Food and Drug Administration) folosirea fluoxetinei ca medicament antidepressiv, inhibitor al recaptării serotoninei din fanta sinaptică (1).

Fluoxetina face parte din grupul antidepressivelor inhibitoare ale recaptării serotoninei, neurotransmițătorul care intervine în producerea somnului, în procesele mintale și afective, în funcții motorii, în termoreglare, în reglarea tensiunii arteriale, în actul vomei și al funcțiilor hormonale. Tratamentul cu fluoxetină se începe strict sub supraveghere medicală. Efectele antidepressive nu se văd imediat după începerea tratamentului, ci după câteva săptămâni. Astfel pacienții pot fi tentați să crească doza pentru a grăbi apariția efectului. Încă un impediment care trebuie luat în calcul ar fi reacțiile adverse ce pot apărea la nivelul sistemului nervos central. În studiile clinice s-au observat comportamente legate de suicid (tentative de suicid) și ostilitate (comportament dominat de opoziție, agresiune și furie), mai frecvent în rândul adolescenților și adulților tineri. Aceste simptome se reduc după ce se ajunge la concentrații plasmatice constante.

Cazurile de supradozaj ale fluoxetinei ca medicament unic au, de obicei, o evoluție benignă. Simptomele supradozajului au inclus greață, vărsături, convulsii și semne de

excitație ale SNC. Mortalitatea atribuită supradozajului cu fluoxetină, ca unic medicament, a fost extrem de rară. Însă, riscul de mortalitate crește dacă pacienții sunt tratați cu fluoxetină asociată cu antidepresive IMAO, dar și la pacienții care au întrerupt recent un tratament cu fluoxetina și au început un tratament cu IMAO, deoarece fluoxetina se elimină lent din organism, în decursul a 5 săptămâni.

Este evidentă, deci, necesitatea existenței unei metode de monitorizare, atât detectare, cât și de dozare a concentrației plasmatice de fluoxetină din plasma umană pentru a evita supradozările, precipitarea episoadelor cu tendință de suicid, dar și pentru a iniția în siguranță cel mai potrivit tratament antidepresiv.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) este una din cele mai utilizate metode de analiză utilizată în numeroase domenii (industrie chimică, industrie farmaceutică, bioechivalență, etc.). Precizia, exactitatea și posibilitatea analizei unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt, dar mai ales selectivitatea și sensibilitatea sunt considerate principalele avantaje ale acestei metode.

Unul dintre principalele obiective ale lucrării de față este, consecutiv celor prezentate, este acela de a identifica și analiza situațiile în care monitorizarea farmacocinetică a terapiei cu carbamazepină și fluoxetină este necesară și de a dezvolta metode analitice adecvate acestui scop.

2. Considerații teoretice

2.1. Monitorizarea terapeutică

Monitorizarea terapeutică (TDM – *Therapeutic Drug Monitoring*) poate fi definită ca urmărirea unui medicament sau a unui metabolit al acestuia în lichidele biologice (5). Acest lucru poate fi de mare ajutor în managementul terapiei (6).

TDM reprezintă o activitate multidisciplinară. Rezultatele acestei activități pot fi utile pacientului numai prin colaborarea între chimiști, farmaciști, medici și personal medical auxiliar. Numai printr-o bună comunicare se pot obține rezultate precise și care să prezinte relevanță clinică (7). Există numeroase ghiduri care prezintă criteriile pe baza cărora se decide dacă o anumită substanță se pretează sau nu monitorizării terapeutice și indicații pentru cazurile când monitorizarea terapeutică este utilă.

În cazul celor două substanțe (carbamazepina și fluoxetina) monitorizarea terapeutică este indicată.

2.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Cromatografia de lichide este metoda de separare bazată pe repartizarea diferențiată a componentelor unui amestec între două faze aflate în contact. Una dintre faze este fixă (faza staționară) și una se află în mișcare (faza mobilă). Separarea compușilor analizați se bazează pe vitezele diferite cu care componentele amestecului traversează faza staționară, antrenate de faza mobilă de-a lungul coloanei cromatografice sau a unui echivalent al acesteia (102).

Prin variația naturii și a compoziției celor două faze, precum și a altor factori, se pot obține condițiile optime pentru analiza dorită.

Cromatografia de înaltă performanță se aplică în numeroase domenii: industria farmaceutică, industria chimică, industria alimentară, analizele de mediu, diagnosticare, descoperire de compuși noi, studii de bioechivalență, de farmacocinetică etc.

Pentru TDM metoda HPLC este cea mai utilizată dintre tehnicile cromatografice, cuplată deseori cu spectrometria de masă pentru o creștere a sensibilității și a specificității, LC-MS. Avantajele metodelor cromatografice sunt reprezentate de (6):

- Dezvoltare rapidă a metodelor;
- Capacitatea de a fi utilizate pentru o gamă largă de substanțe;
- Specificitate (metodă de separare);
- Volum mic de probă.

Dezavantajele sunt:

- Costuri mai mari;
- Personal calificat;
- Timp mai mare de analiză – nu pot fi utilizate în urgențe.

2.3. Evaluarea critica a metodelor analitice publicate in literatura pentru determinarea carbamazepinei si fluoxetinei din probe biologice

2.3.1. Carbamazepina

În urma studierii literaturii de specialitate s-a observat utilizarea unor metode RP-HPLC (reversed-phase high performance liquid chromatography – cromatografie de lichide de înaltă performanță cu faze inverse), cu folosirea unor coloane cromatografice cu fază staționară octadecilsilan (C18) (133). Sunt utilizate și alte faze staționare precum octilsilan (C8) (134) sau Diisopropil-tetradecilsilan (diisopropil-C14) (135).

Fazele mobile, polare, utilizează amestecuri simple, de obicei binare, de apă și solvent organic (acetonitril sau metanol). În anumite cazuri se adaugă acizi pentru scăderea pH-ului fazei apoase: acid acetic (136) (137), acid ortofosforic (138) (139) și acid heptafluorobutiric (140) sau modificatori organici: alcool izopropilic (140) (134). În alte metode sunt utilizate soluțiile tampon, cu pH ajustat tot în mediul acid sau neutru (134) (141) (142) (143), mai rar slab bazic (135).

Deteția se realizează prin metode spectrofotometrice (UV), iar lungimile de undă utilizate sunt între 220 nm și 285 nm. Este descrisă de asemenea și o metodă cu dectie MS (137). Datorita coeficientului de absorbtie ridicat in UV si a concentratiilor plasmatice terapeutice ridicate dectia UV este suficientă pentru stabilirea unei metode de dozare a carbamazepinei din plasmă.

Analize imunologice au fost de asemenea raportate pentru determinarea carbamazepinei în plasmă (144). Într-unul din cazuri, dozarea imunologică s-a utilizat pentru generarea de ecuații matematice pentru determinarea carbamazepinei și a metabolitului său din plasmă (145).

Metodele folosite pentru prelucrarea probelor biologice (în general plasma) sunt atât extracțiile în fază lichidă și în fază solidă, cât și precipitarea proteinelor.

Concentrațiile plasmatice corespunzătoare dozelor terapeutice sunt cuprinse între 4 și 12 de $\mu\text{g/mL}$, iar concentrațiile plasmatice toxice ce pot deveni fatale sunt peste 12 $\mu\text{g/mL}$ (101). Se observă ca metodele pot detecta și cuantifica valori mult mai mici și sunt aplicabile pe plasmă umană și au fost utilizate în următoarele scopuri:

- Determinarea carbamazepinei din forme farmaceutice,
- Monitorizare terapeutică a pacienților la care se administrează fluoxetină,
- Determinarea carbamazepinei și a metabolitului 10,11-epoxid din plasmă.

2.4. Fluoxetina

În urma studierii literaturii de s-a observat utilizarea unor metode RP-HPLC, cu folosirea unor coloane cromatografice cu fază staționară în principal octadecilsilan (C18) dar și octilsilan (C8) (155). Coloana cromatografică poate fi precedată de o precoloană sau un filtru. S-a observat și utilizarea unei metode NP-HPLC (normal-phase high performance liquid chromatography – cromatografie de lichide de înaltă performanță cu faze normale), pentru separarea enantiomerilor R și S-fluoxetină (156).

Fazele mobile, majoritatea polare, utilizează o soluție tampon apoasă, aproape întotdeauna cu un pH în domeniul acid (1,9-5,5), în amestec cu un solvent organic (cel mai des acetonitril). În general sistemul de eluție este izocratic dar există și metode care utilizează gradientul de concentrație (157).

Deteția se realizează prin metode spectrofotometrice (UV), fluorimetrice sau de spectrometrie de masă. În cazul metodelor cu detecție UV, lungimile de undă utilizate sunt în jurul valorii de 230 nm. În cazul detecției de fluorescență lungimile de undă variază astfel – lungimea de undă de excitație λ_{exc} este cuprinsă între 227-230 nm, iar lungimea de undă de emisie $\lambda_{em} = 290 - 312$ nm. Deteția de fluorescență și metodele cu detecție MS se dovedesc a fi cele mai sensibile și specifice, reușind să detecteze și să cuantifice fluoxetina și metabolitul ei la nivele foarte mici (de ordinul ng/mL), în prezența unor substanțe care pot fi administrate concomitent. Datorită sensibilității mai scăzute și a lipsei specificității, detecția UV este mai puțin utilizată în analiza probelor biologice cu fluoxetină.

Metodele folosite pentru prelucrarea probelor biologice (în general plasma) sunt atât extracțiile în fază lichidă și în fază solidă, cât și precipitarea proteinelor.

Nu există date care să ateste o corelație bună între nivelurile plasmatice ale fluoxetinei și ale metabolitului său și efectul terapeutic (88). Totuși concentrațiile plasmatice corespunzătoare dozelor terapeutice se regăsesc în jurul valorii de 0,4 $\mu\text{g/mL}$, fiind cuprinse în general între 0,15-0,5 $\mu\text{g/mL}$ ((157), (158)), iar concentrațiile plasmatice toxice ce pot deveni fatale sunt cuprinse în intervalul 1-6 $\mu\text{g/mL}$ (158), având în vedere că aceste date sunt generate pe baza unui număr redus de cazuri. Se observă ca metodele pot detecta și cuantifica valori mult mai mici și sunt aplicabile pe plasmă umană și au fost utilizate în următoarele scopuri:

- studii de farmacocinetică,
- studii de bioechivalență,
- monitorizare terapeutică a pacienților la care se administrează fluoxetină.

3. Metodele analitice dezvoltate

Pentru validarea metodelor dezvoltate s-au investigat următorii parametri de validare, conform Ghidului ICH Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" și Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, 2013 (Draft Guidance).

- Specificitate,

- Limită de detecție și cuantificare
- Linearitate,
- Acuratete,
- Precizie,
- Robustete,
- Stabilitatea soluțiilor.

Pentru toate metodele sunt prezentate echipamentele și reactivii utilizați.

3.1. Metoda HPLC de dozare a carbamazepinei din plasma umană utilizând nitrazepam ca standard intern

Concentrațiile plasmatice terapeutice relativ ridicate ale carbamazepinei (4-12 $\mu\text{g/mL}$) precum și coeficientul de absorbție mare permit utilizarea metodei de detecție UV pentru determinarea acestei substanțe din plasma umană. Conform literaturii de specialitate carbamazepina prezintă maxime de absorbție la 237 nm și la 285 nm în metanol (6). Se alege lungimea de undă de 285 nm (Figura 1) datorită coeficientului de absorbtivitate mai mare, dar și a posibilității mare reduse de interferență.

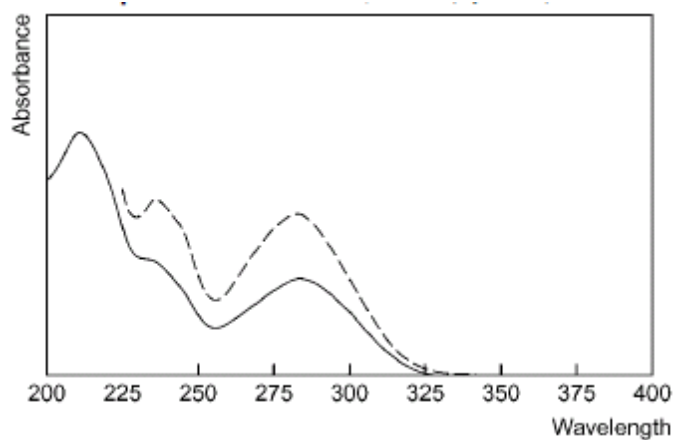


Figura 1. Spectrul UV al carbamazepinei în metanol (6)

Standardul intern ales pentru analiză este nitrazepamul, o substanță cu structură și proprietăți chimice asemănătoare cu carbamazepina. În Figura 2 este prezentată structura chimică a nitrazepamului comparativ cu cea a carbamazepinei, iar în Figura 3 spectrul UV al nitrazepamului în metanol. Maximul de absorbție al nitrazepamului este la 280 nm (6), deci adecvat pentru măsurarea absorbției la 285 nm.

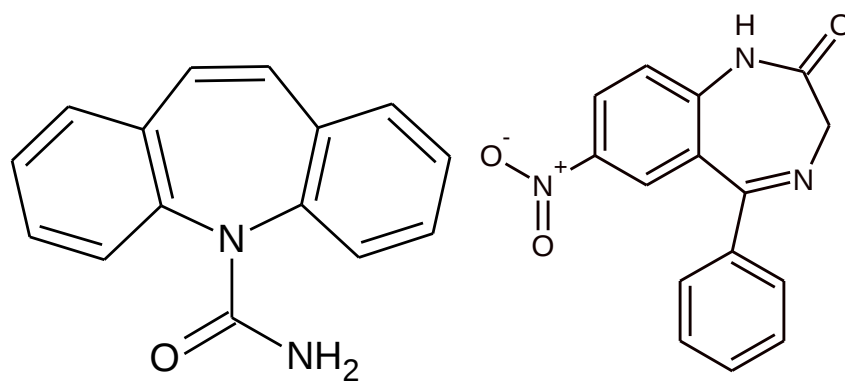


Figura 2. Structurile chimice ale carbamazepinei (stânga) și nitrazepamului (dreapta)

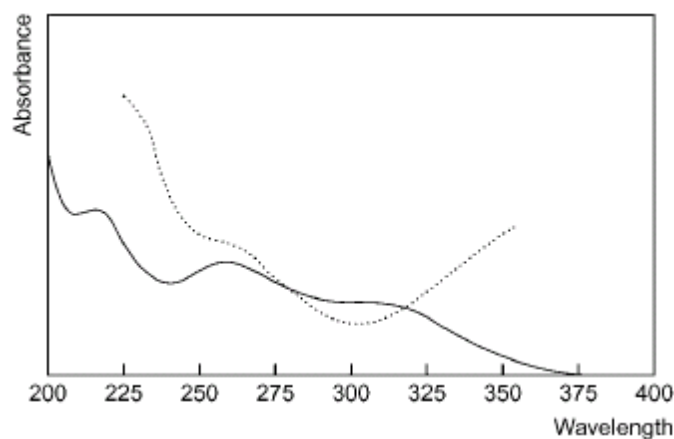


Figura 3. Spectrul UV al nitrazepamului în metanol (6)

Din punct de vedere chimic ambele substanțe au un caracter slab bazic (Carbamazepina prezintă un $pK_a = 7$ iar Nitrazepamul are $pK_{a1} = 3,2$ și $pK_{a2} = 10,8$ (6)) așadar la pH puternic bazic sunt în formă neionizată și vor partiționa în faza organică, nepolară, în contact cu o soluție apoasă.

3.1.1. Dezvoltarea metodei

Pentru stabilirea condițiilor optime de operare au fost variați mai mulți parametrii care influențează eluția carbamazepinei și nitrazepamului: coloana cromatografică, debitul fazei mobile, temperatura și compoziția fazei mobile. Pentru testele de dezvoltare de metodă s-a utilizat soluția de referință și de testare a sistemului cromatografic preparată conform capitoului **Eroare! Fără sursă de referință..**

Fazele mobile testate pentru dezvoltarea metode au avut o componentă apoasă (apă sau acid acetic 0,1% în apă) și o componentă organică (acetonitril sau metanol) în proporții diferite.

Testele inițiale au presupus varierea proporției între faza apoasă și solventul organic pornind de la compoziția apă:acetonitril = 15:85 (v/v). Separare satisfăcătoare s-a obținut la un conținut de 40% apă (v/v). Din acest punct s-au făcut încercări de îmbunătățire a separării, fără a afecta însă simetria picului sau a produce scăderea eficienței (scăderea numărului de talere teoretice).

Au fost testate două coloane cromatografice: Thermo® BDS Hypersil C18 4.6x125 mm 5μm și Merck® Kromasil C18 4,6x150 mm 5 μm. Utilizand coloana BDS Hypersil s-au obținut rezultate mai bune din punct de vedere al rezoluției între cele două picuri, asimetrie și eficiența picului.

Debite mai mari au dus la scăderea rezoluției și a simetriei picului cromatografic. Așadar debitul de 1,0 mL/min s-a ales pentru continuarea studiilor.

S-a încercat adaosul de metanol în faza mobilă în proporție de 5, 10 și 15% (v/v), înlocuind aceeași proporție de apă, păstrând cantitatea de acetonitril neschimbată. Timpul de retenție a scăzut atât pentru carbamazepină cât și pentru nitrazepam, concomitent cu scăderea rezoluției și a simetriei picurilor (Figura 4 și Figura 5).

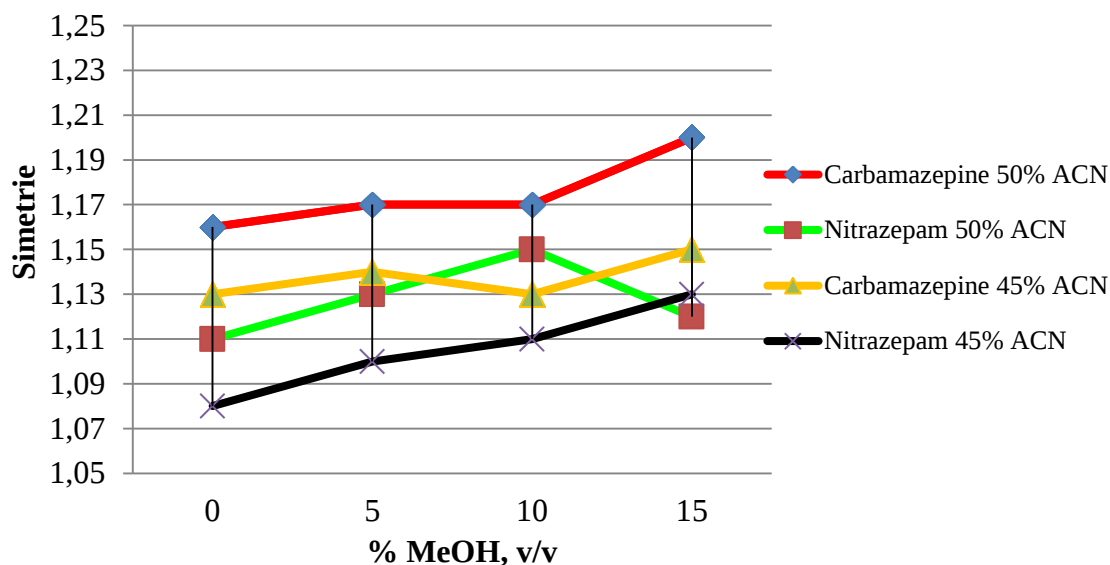


Figura 4. Variația asimetriei cu modificarea procentului de metanol – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

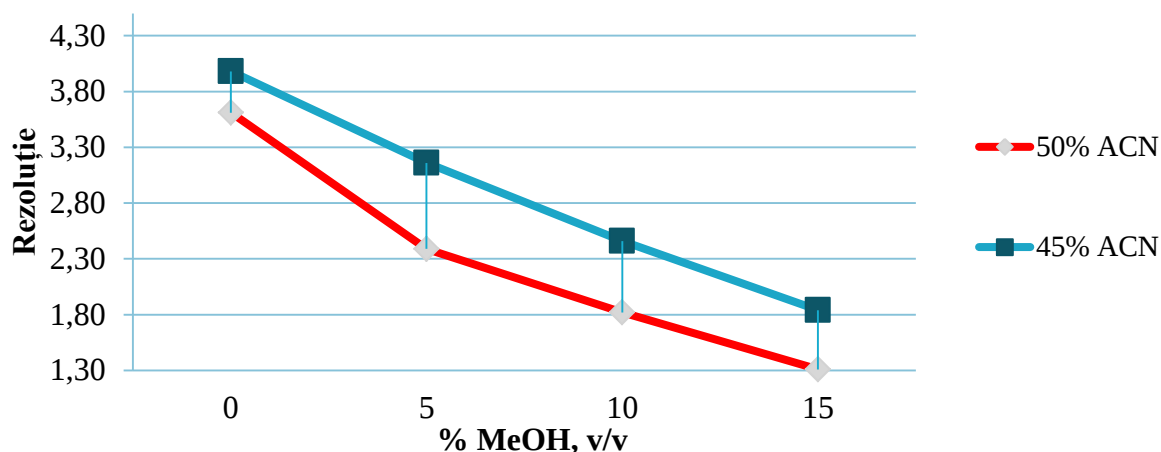


Figura 5. Variația rezoluției cu modificarea procentului de metanol – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

Acetonitrilul a ramas singurul solvent organic utilizat în faza mobilă. Compoziția finală aleasă a fost apă:acetonitril = 55:45 (v/v) deoarece pentru aceasta s-au obținut valori satisfăcătoare pentru parametrii de performanță cromatografici (simetrie, rezoluție, talere teoretice) dar și un timp de analiză redus. Temperatura din compartimentul coloanei, la care are loc procesul de partiție din coloană, a fost setată la 22°C. Temperaturi mai mari au dus la creșterea coeficientului de asimetrie și la scăderea rezoluției (Figura 6 și Figura 7).

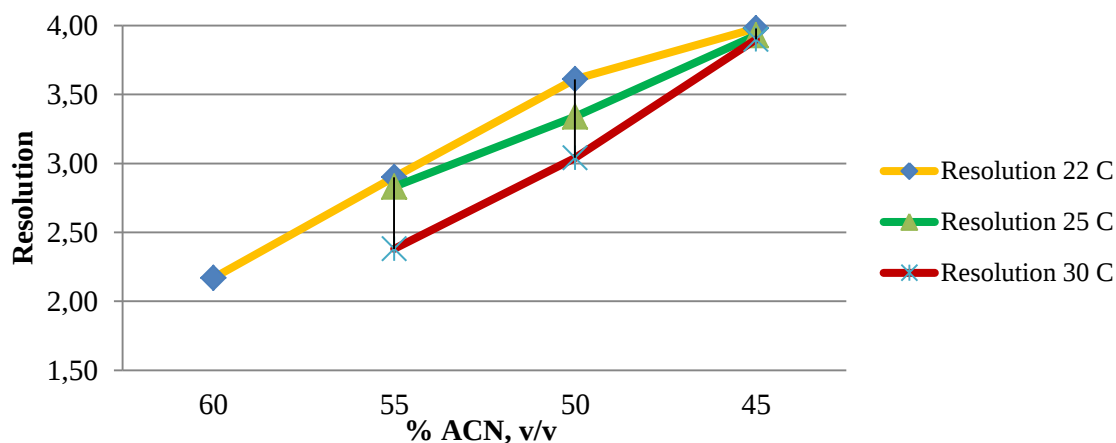


Figura 6. Variația rezoluției cu modificarea temperaturii și a procentului de acetonitril – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

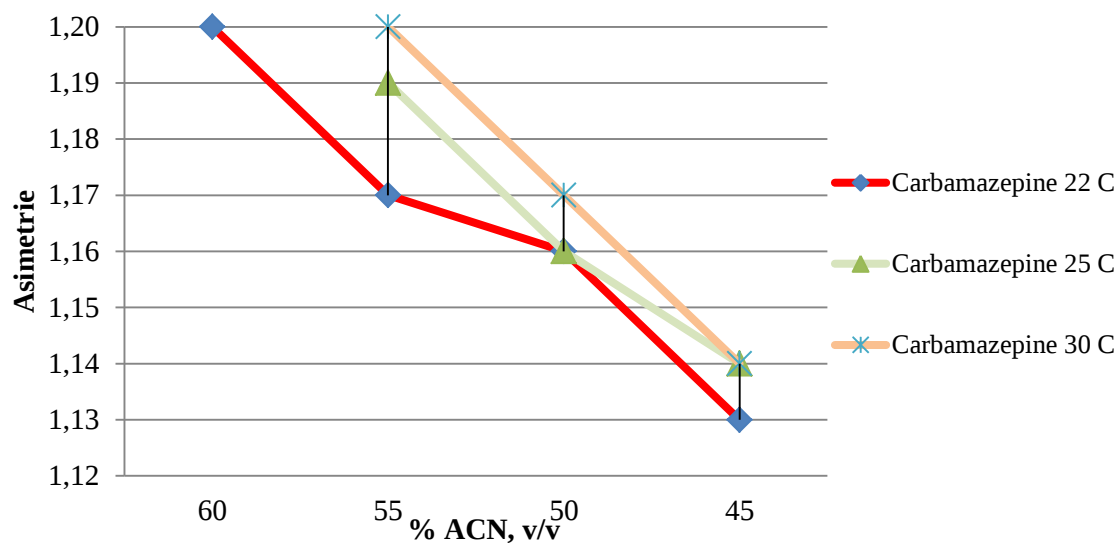


Figura 7. Variația asimetriei cu modificarea temperaturii și a procentului de acetonitril – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

După selectarea parametrilor separării cromatografice s-au făcut teste pentru a determina cea mai bună metodă de extracție. În **Figura 8** se poate vedea o cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă.

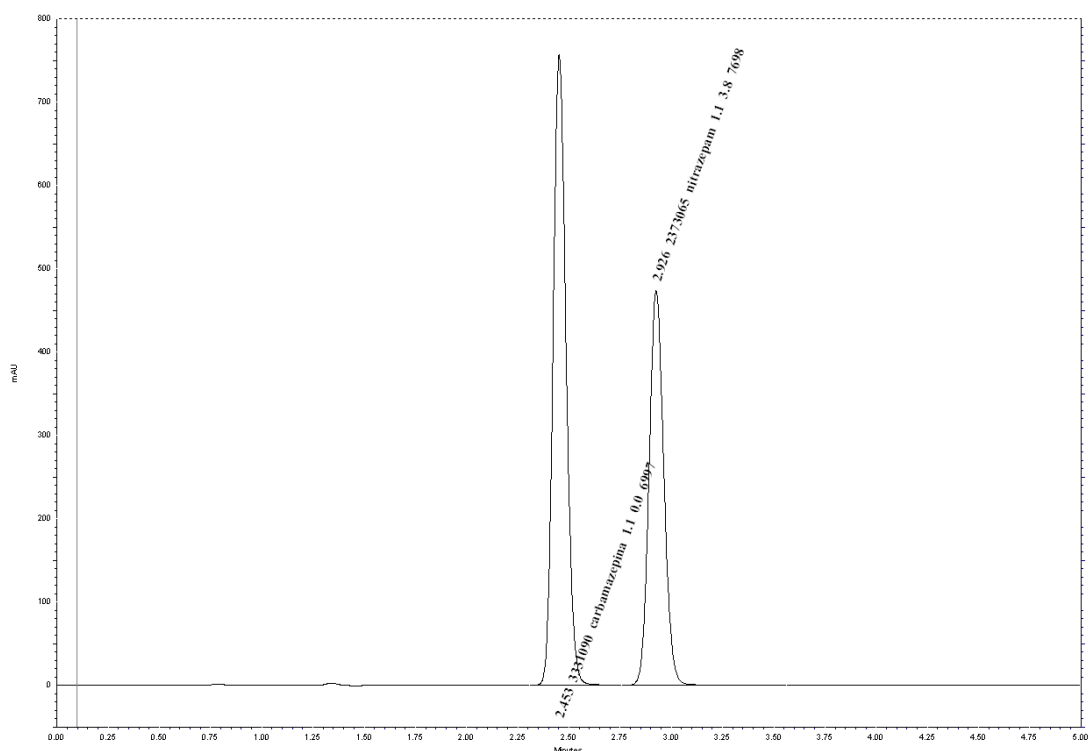


Figura 8. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul.

S-au testat extracții lichid-lichid cu diclormetan și acetat de etil la pH alcalin precum și precipitarea proteinelor cu acetonitril. S-au efectuat câte două probe per condiție. Cele mai bune rezultate privind recuperarea, deviația relativă standard (RSD, %) între probe și aspectul cromatogramei s-a obținut pentru acetat de etil. Astfel metoda de extracție selectată a fost extracția lichid-lichid cu acetat de etil, în mediul bazic (Tabelul 1).

S-a ales utilizarea pH-ului bazic datorita caracterului acido-bazic al celor doi analiți discutat anterior (slab bazic). Forma mai liposolubilă se obține la pH ridicat (bazic) și va partiționa preponderent în faza organică.

Tabelul 1. Teste de extracție pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizând ca standard intern nitrazepamul.

Solvent organic	Recuperare, %	RSD, %
Diclorometan	110,54	34,3
Acetat de etil	96,28	2,6
Acetonitril	95,98	6,9

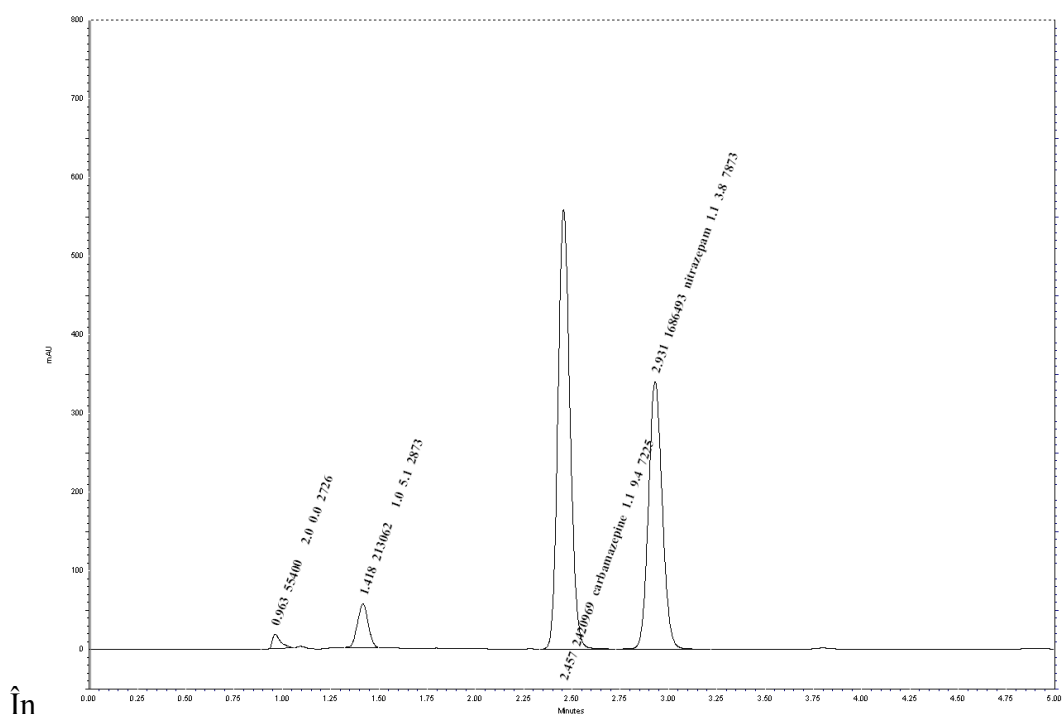


Figura 9, Figura 10 și Figura 11 sunt prezentate cromatograme obținute la testele de extracție.

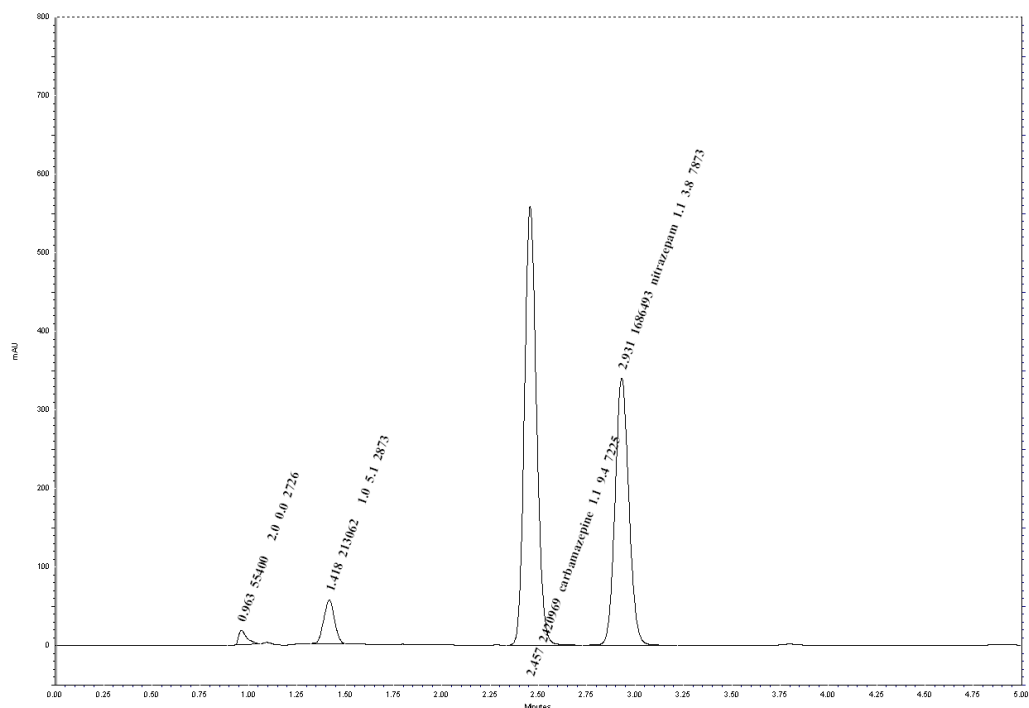


Figura 9. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul – extracție cu acetat de etil/amoniac.

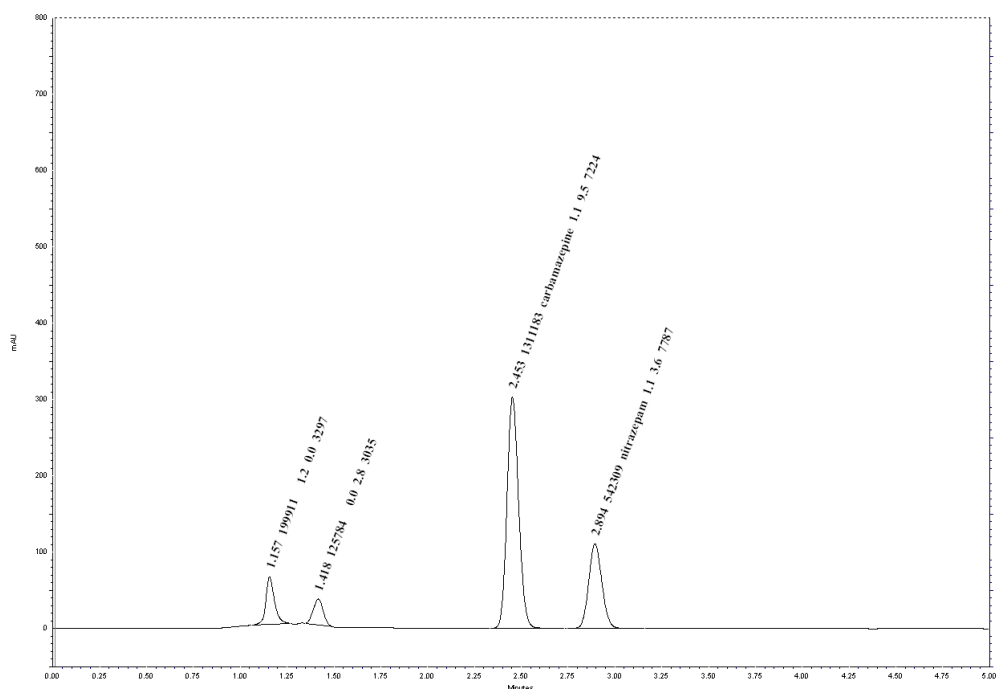


Figura 10. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul – extracție cu diclormetan/amoniac.

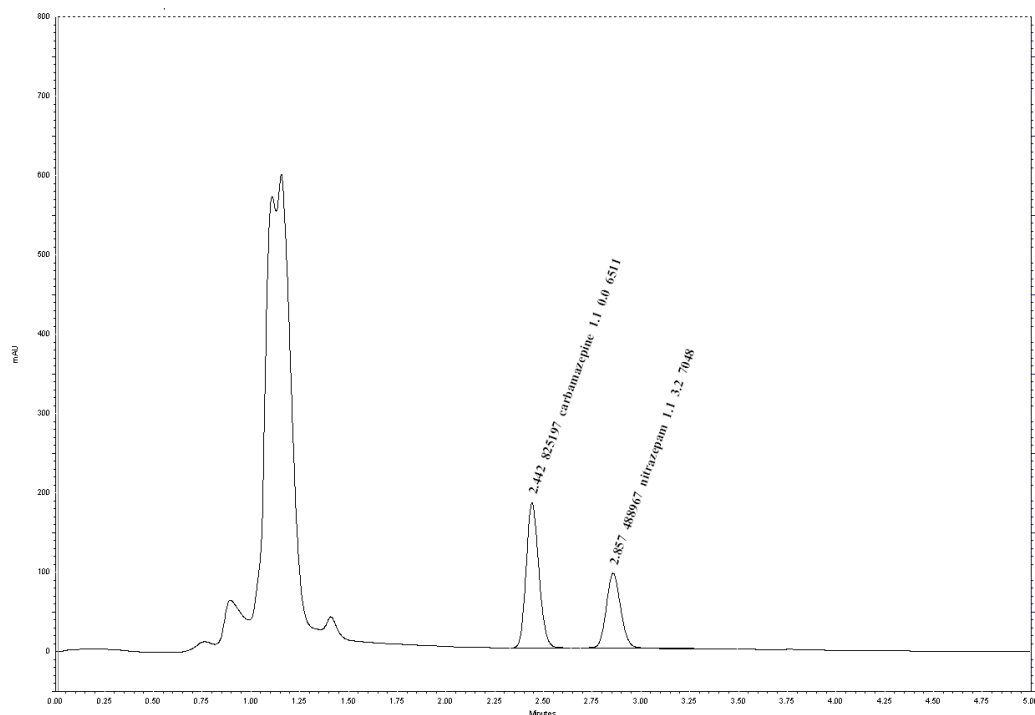


Figura 11. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul – precipitare cu acetonitril.

3.1.2. Validarea metodei analitice

3.1.2.1. Specificitate / selectivitate

Cromatogramele obținute pentru soluțiile testate au evidențiat faptul ca nu există componente în plasmă care să interfere cu cei doi analiți. De asemenea cromatograma soluției extrase din plasmă cu adaos de standard intern arată lipsa interferențelor cu carbamazepina, analitul principal.

Carbamazepina se administrează în monoterapie așadar nu este nevoie de testarea altor substanțe pentru interferențe. Cu toate acestea dacă pacienții testați sunt sub tratament pentru alte afecțiuni, posibilitatea interferențelor trebuie testată de la caz la caz.

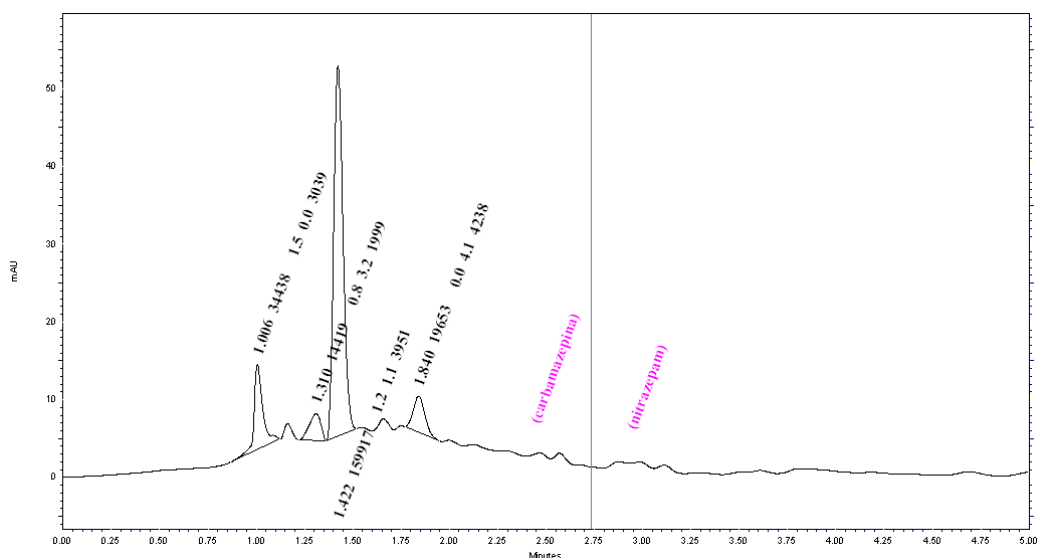


Figura 12. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă (soluția martor M1) – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

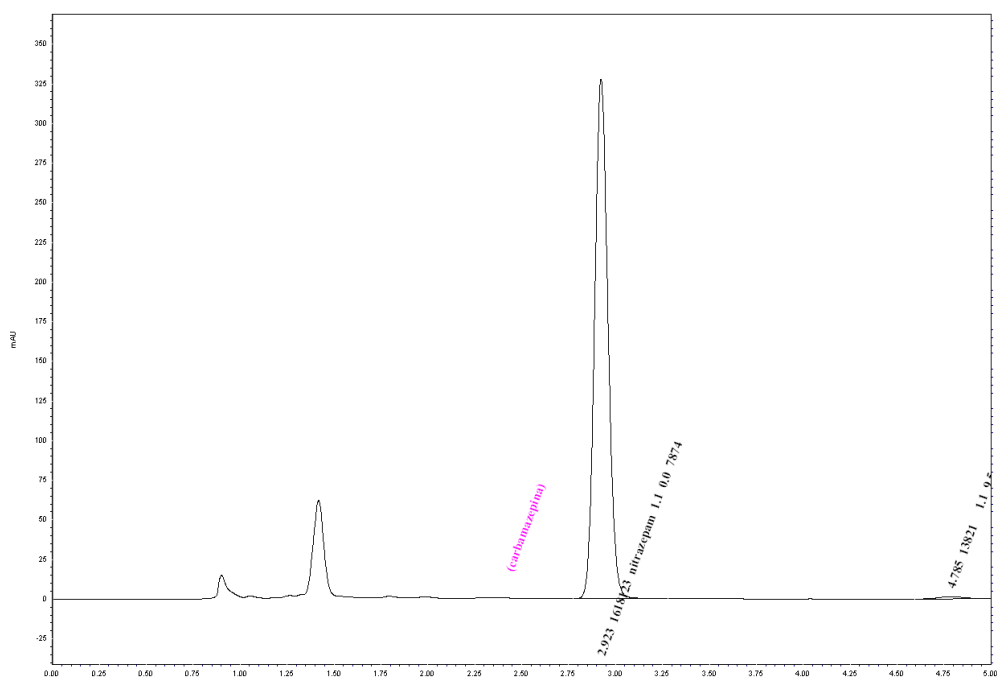


Figura 13. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă cu standard intern - nitrazepam (soluția martor M2) – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

3.1.2.2. Liniaritate

Coeficientul de corelație obținut este mai mare decât 0,99, criteriul de acceptabilitate pentru liniaritate, respectiv 0,9995.

În **Figura 15** sunt prezentate cromatogramele suprapuse pentru fiecare soluție preparată pentru parametrul liniaritate.

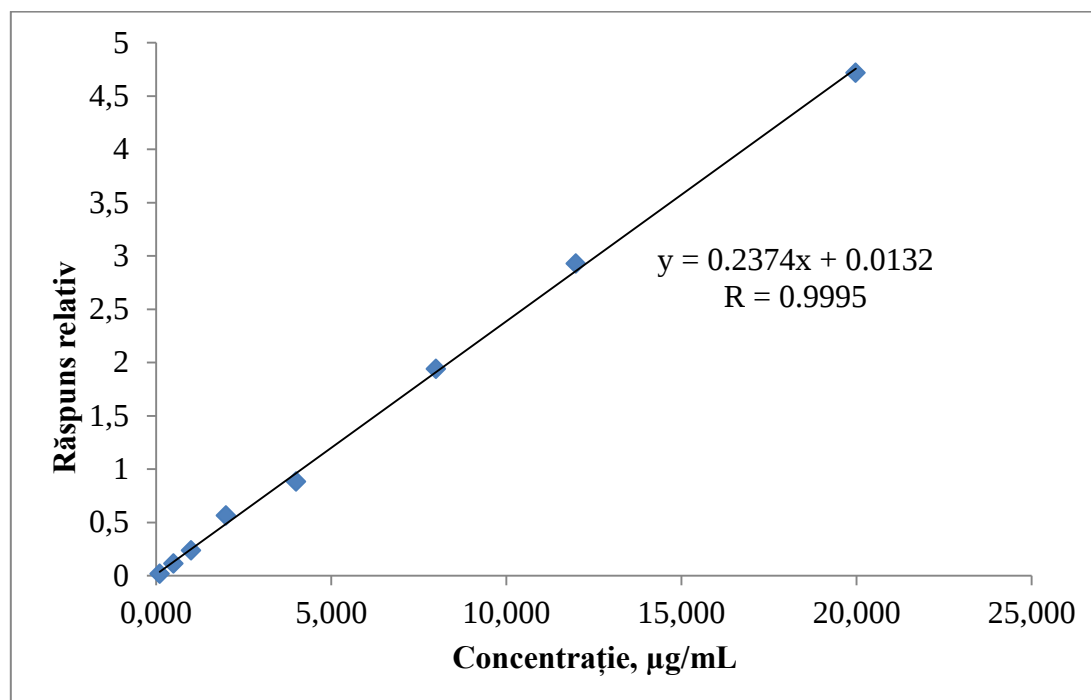


Figura 14. Curba de calibrare pentru carbamazepină (0.1-20.0 μg carbamazepina/mL) – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

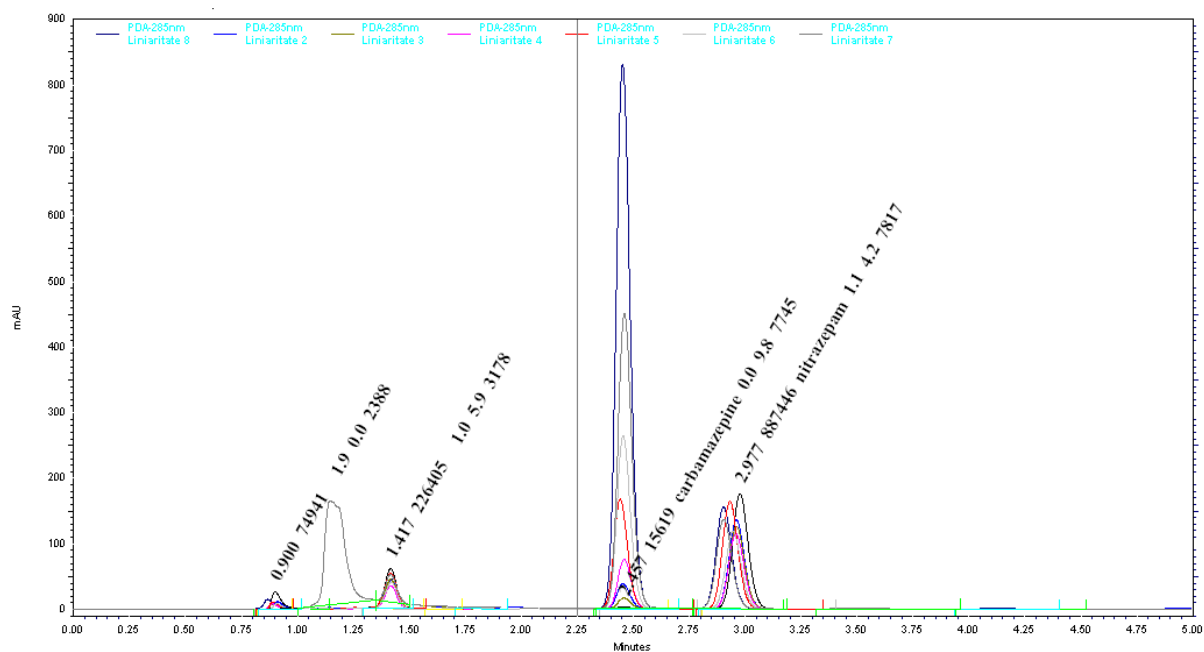


Figura 15. Cromatograme reprezentative (suprapuse) preparate pentru parametrul liniaritate (0.1-20.0 μg carbamazepina/mL) – metoda de analiză a carbamazepinei, utilizând ca standard intern nitrazepam

3.1.2.3. Acuratețe și precizie

Tabelul 2. Rezultatele obținute pentru parametrii precizie și acuratețe – validarea metodei de dozare a carbamazepinei utilizând ca standard intern nitrazepamul

	Concentrație, $\mu\text{g/mL}$		Recuperare, %	Deviație relativă standard, %
	Reală	Obținută (media pentru cele cinci probe)		
Ziua 1	0,100	0,104	104,0	7,2
	11,988	12,591	105,0	2,7
	19,980	19,742	98,8	0,9
Ziua 2	0,102	0,091	89,2	12,2
	12,228	12,179	99,6	3,7
	20,155	21,344	105,9	2,1

În **Figura 16**, **Figura 17** și **Figura 18** sunt prezente cromatograme reprezentative pentru parametrii precizie și acuratețe.

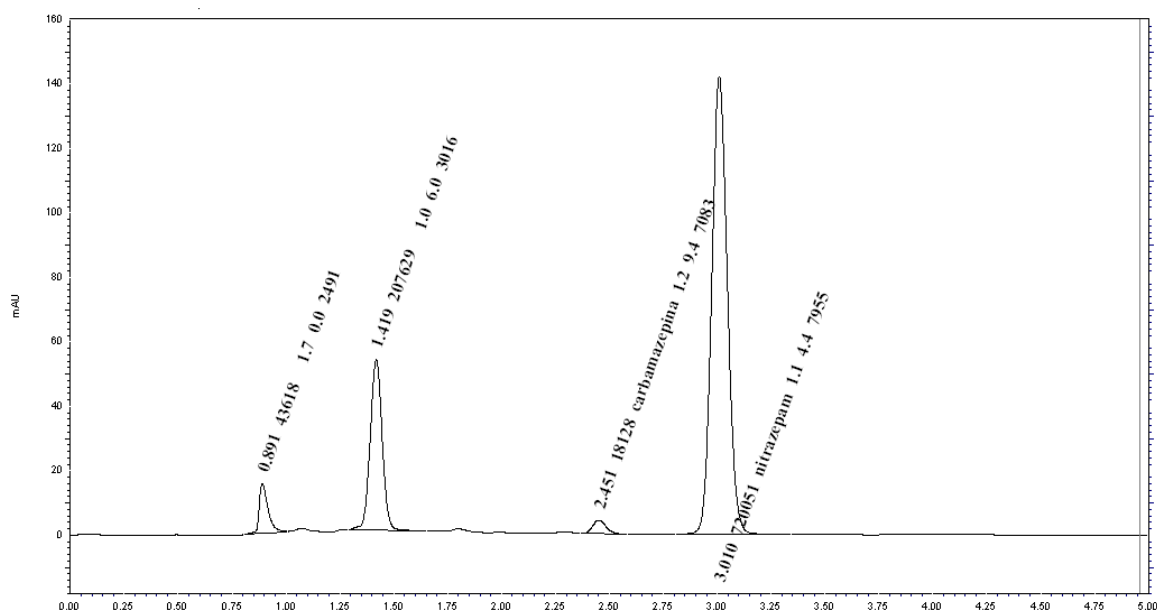


Figura 16. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 0.1 μg carbamazepina/mL – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

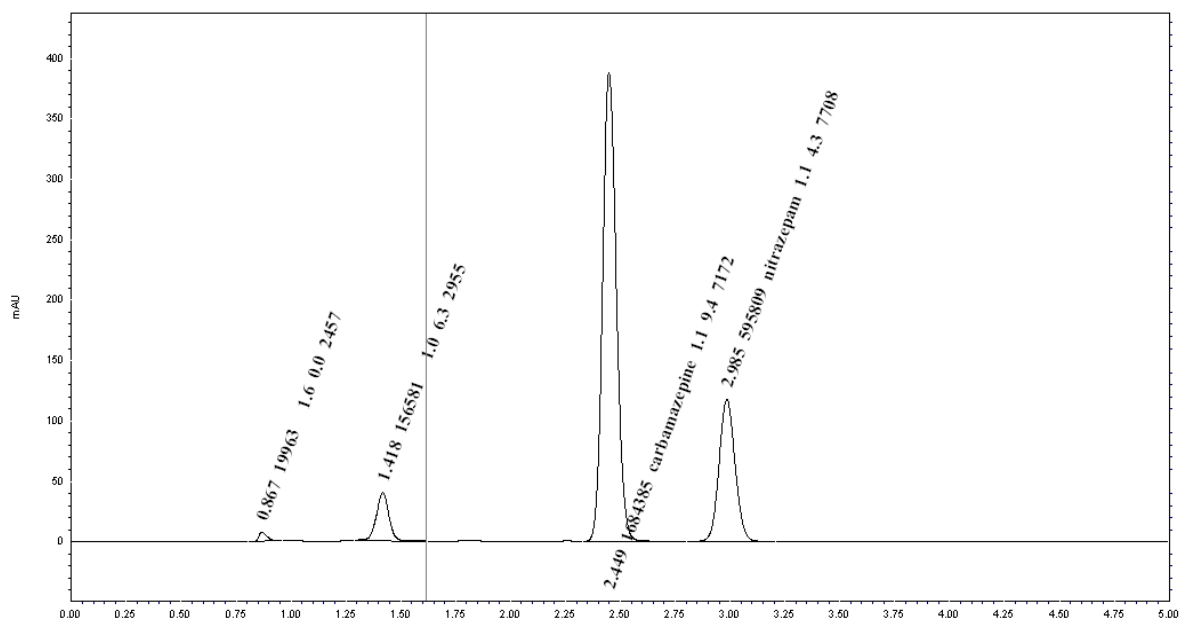


Figura 17. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 12 µg carbamazepina/mL – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

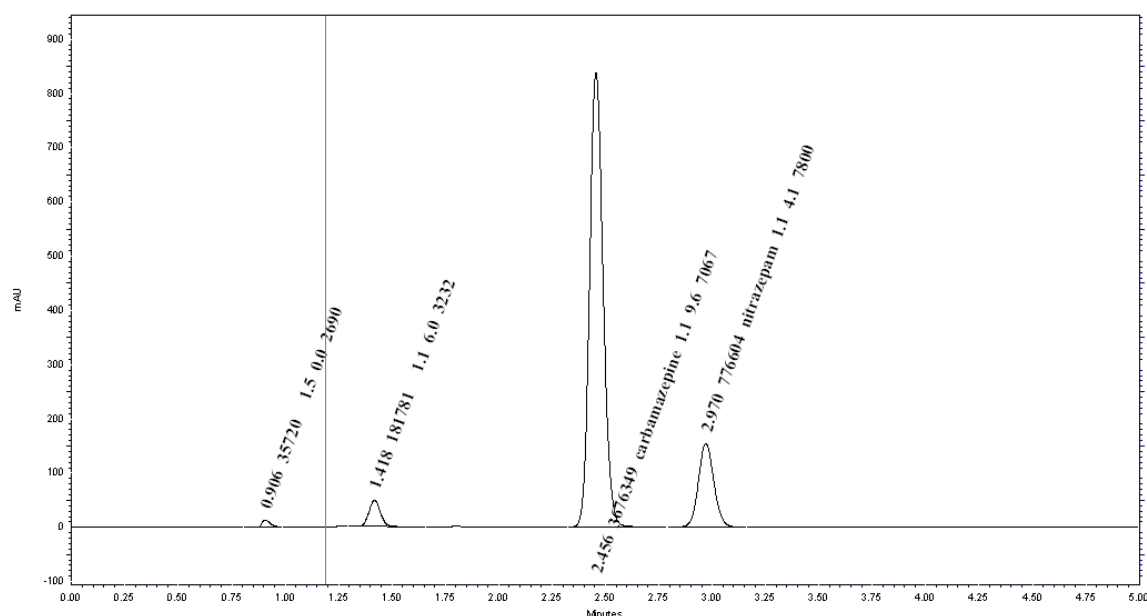


Figura 18. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 20 µg carbamazepina/mL – metoda de determinare a carbamazepinei din plasmă utilizând ca standard intern nitrazepamul

3.1.2.4. Limita de cuantificare

S-au preparat diferite diluții din soluția stoc de carbamazepină pentru a obține un pic cu raportul semnal/zgomot de aproximativ 10. Concentrația astfel determinată (0,1 µg carbamazepină/mL) a fost confirmată prin testele de liniaritate, acuratețe și precizie.

Cromatograma reprezentativă - **Figura 16.**

3.1.3. Concluzii

Metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă a fost dezvoltată ținând cont de proprietățile analiților, de necesitatea unui timp scurt de analiză și de obținerea unor indici de performanță cromatografici cu valori adecvate. S-a determinat astfel că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică BDS Hypersil C18, 125*4.6 mm, 5 μm cu faza mobilă formată din apă și acetonitril în proporția 55:45 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 22°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 5 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu acetat de etil și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – nitrazepamul.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,1 μg/mL și 20 μg/mL, interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C și compoziția fazei mobile apă:acetonitril între 50:50 (v/v) și 60:40 (v/v).

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (5 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapid.

3.2. Metoda HPLC de dozare a carbamazepinei din plasma umana utilizand trimipramină ca standard intern

Pentru această metodă s-a selectat trimipramina ca standard intern. Maximul de absorbție al trimipraminei este 250 nm (Figura 19). La această lungime de undă carbamazepina are un minim de absorbție (Figura 1), dar datorită coeficientului mare de

absorbție în UV, se poate folosi și această lungime de undă pentru obținerea unui răspuns analitic stabil și reproductibil, fără a afecta sensibilitatea metodei.

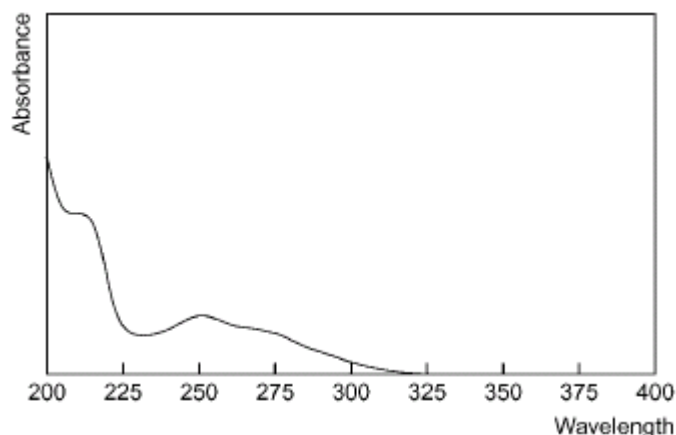


Figura 19. Spectrul UV al trimipraminei în (soluție apoasă, acidă) (6)

Din punct de vedere chimic, trimipramina are o structură similară cu carbamazepina (Figura 19). Ambele substanțe au un caracter slab bazic (Carbamazepina prezintă un $pK_a = 7$ iar Trimipramina $pK_a = 7,7$ (1)) așadar la pH puternic bazic sunt în formă neionizată și vor partiționa în faza organică, nepolară, în contact cu o soluție apoasă.

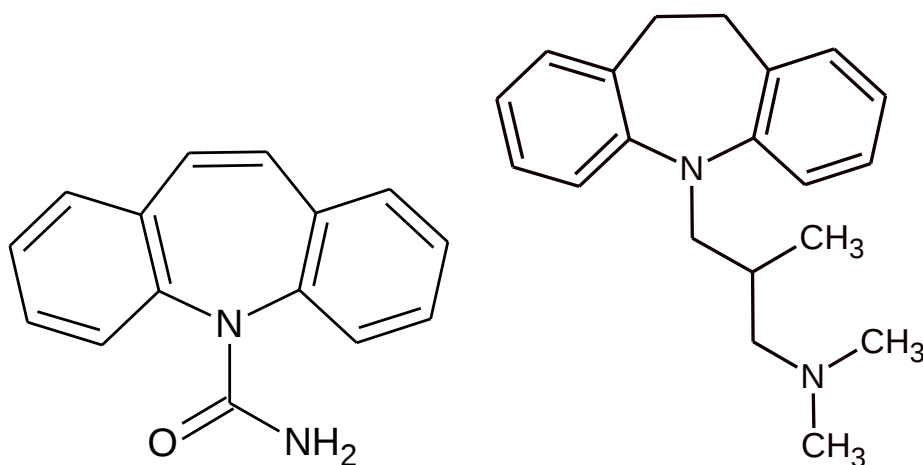


Figura 20. Structurile chimice ale carbamazepinei (stânga) și trimipraminei (dreapta)

3.2.1. Dezvoltarea metodei

Pentru stabilirea condițiilor optime de operare au fost variați mai mulți parametri care influențează eluția carbamazepinei și trimipraminei: coloana cromatografică, debitul fazei mobile, temperatura și compoziția fazei mobile. Pentru aceste teste s-a utilizat soluția de referință și de testare a sistemului cromatografic preparată conform capitoului **Eroare! Fără sursă de referință..**

Dacă se utilizează o fază mobilă simplă formată din apă și acetonitril trimipramina pare că nu eluează. De fapt retenția compusului pe coloană este atât de puternică încât nu se poate detecta semnalul datorită unui fenomen numit "band broadening" care este foarte accentuat în acest caz și produce eluția în câteva minute. Astfel picul este foarte lat și cu o înălțime așa de mică încât se confundă cu linia de bază.

Astfel trebuie modificată faza mobilă astfel încât să crească afinitatea trimipraminei pentru aceasta și echilibrul cromatografic se deplaseze dinspre faza staționară.

S-a testat ca fază apoasă acid acetic 0,1% (pH aproximativ 2,5) împreună cu acetonitril dar nu s-au obținut picuri cu asimetrie corespunzătoare. La adăos de trietilamină însă s-au obținut picuri cu o formă adecvată și cu simetrie și eficiență crescute. Acest lucru se datorează și faptului că trietilamina, pe lângă creșterea tăriei ionice și asigurarea pH-ului fazei apoase, are și rolul de formator de perechi de ioni ducând la modificarea retenției trimipraminei prin blocarea grupelor silanol libere din coloana cromatografică.

S-a ales ca fază mobilă apoasă trietilamină (TEA) 10 mM ajustată la pH 2,4 cu acid fosforic. S-au testat două coloane cromatografice: Thermo[®] BDS Hypersil C18 4,6x125 mm, 5μm și Merck[®] Kromasil C18 4,6x150 mm, 5 μm. Dintre cele două coloane, cu BDS Hypersil s-au obținut rezultate mai bune din punct de vedere al simetriei picului trimipraminei, dar și al carbamazepinei și din punct de vedere al rezoluției.

Dezvoltarea metodei a continuat prin creșterea treptată procentului fazei apoase pornind de la procentul inițial de fază apoasă : acetonitril = 15:85 (v/v). Separare satisfăcătoare s-a obținut la un conținut de 60% fază apoasă (v/v). Acetonitrilul s-a ales ca solvent organic deoarece prezintă rezultate mai bune privind timpul de retenție, simetria picurilor și eficiența.

Creșterea temperaturii coloanei cromatografice și a debitului fazei mobile influențează negativ analiza cromatografică din punct de vedere al rezoluției. Debitul crescut poate îmbunătăți simetria picului de trimipramină, însă efectul este neglijabil. Temperatura crescută afectează de asemenea simetria picurilor. Grafice care prezintă variația unor parametri de performanță în funcție de parametri de operare cromatografici sunt prezentate în Figura 21, Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 și Figura 26.

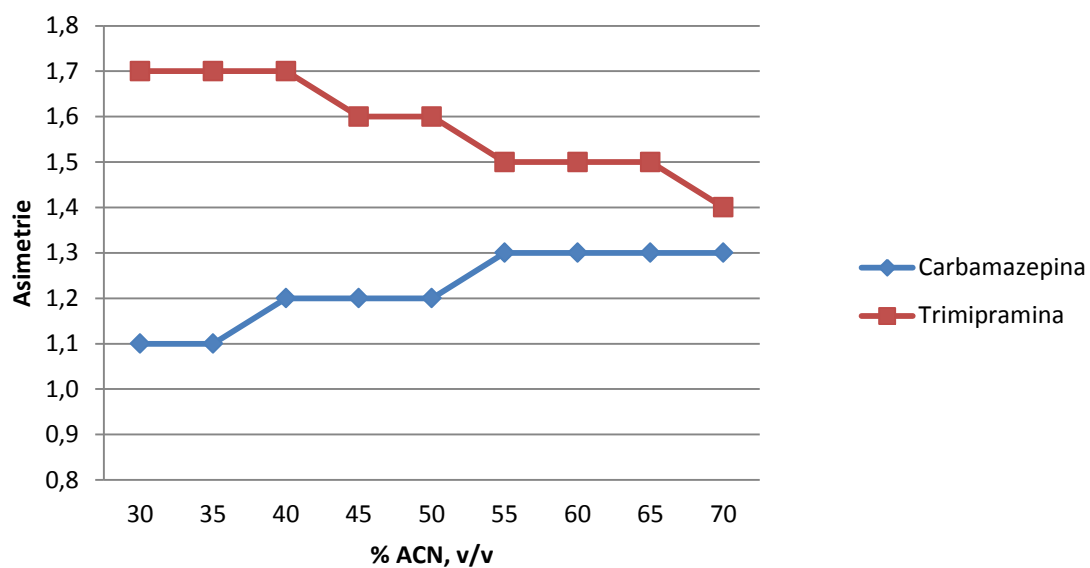


Figura 21. Variația asimetriei cu modificarea procentului de acetonitril la 22°C temperatură pe coloană și debit de 1 mL/min – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

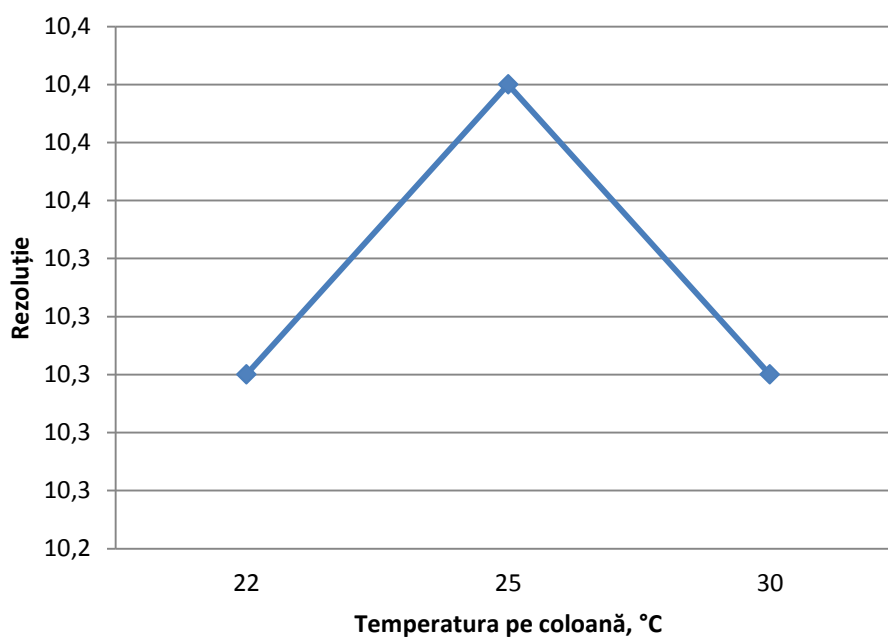


Figura 22. Variația rezoluției cu temperatura pentru un procent de 40% acetonitril (v/v) și un debit de 1 mL/min – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

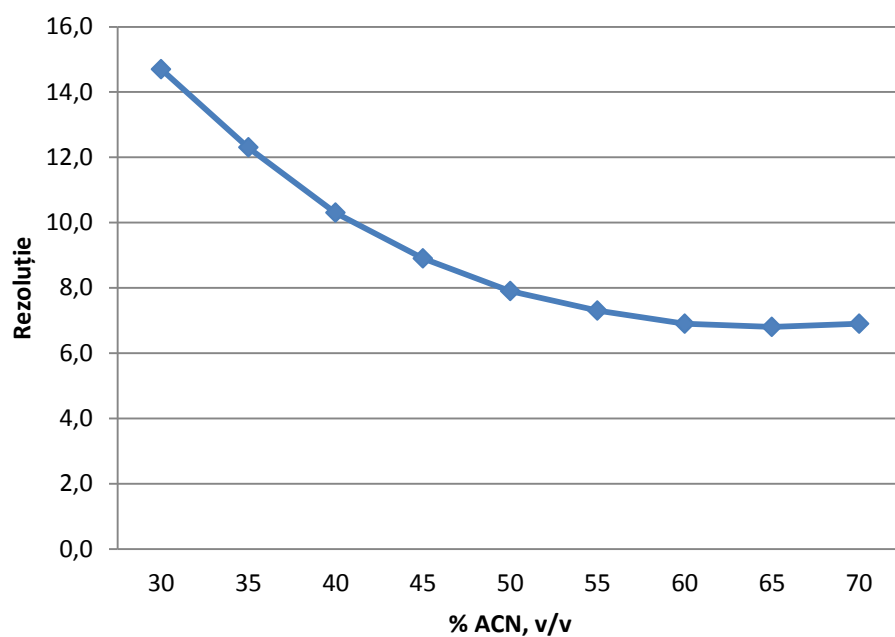


Figura 23. Variația rezoluției cu procentul de acetonitril la 22°C temperatură pe coloană și debit de 1 mL/min – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

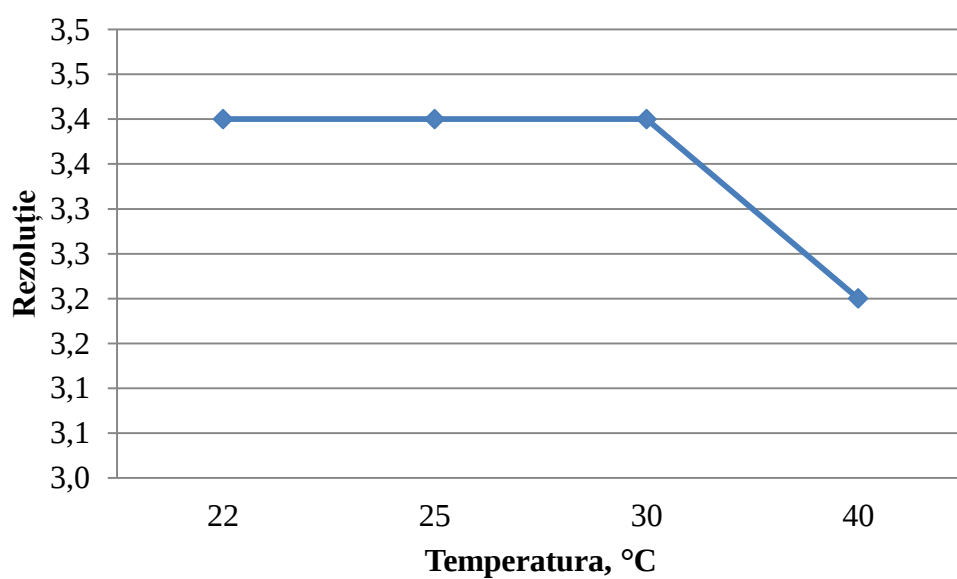


Figura 24. Variația rezoluției cu modificarea temperaturii la un debit de 1 mL/min și procent the 50% v/v acetonitril – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

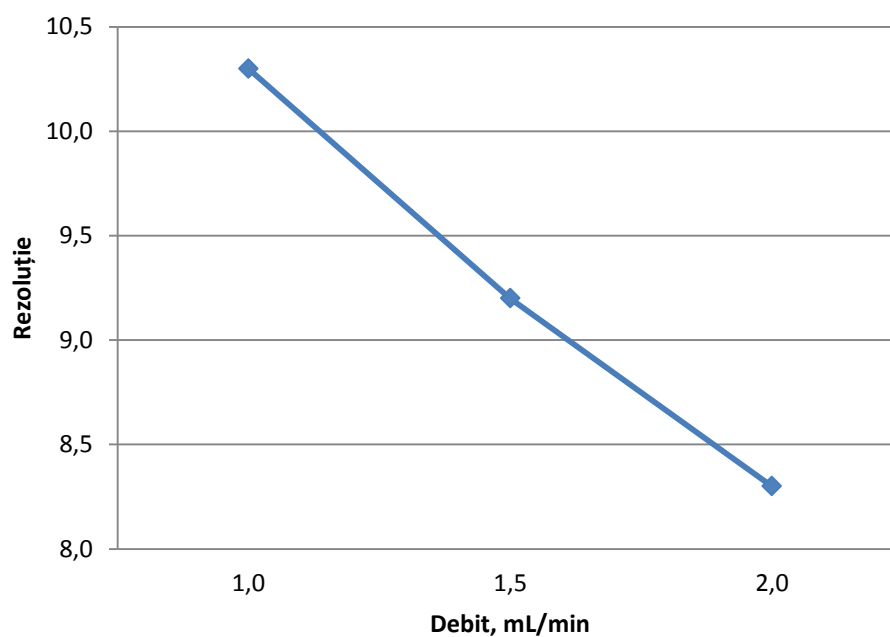


Figura 25. Variația rezoluției cu modificarea debitului la temperatura de 22°C și procent the 40% v/v acetonitril – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

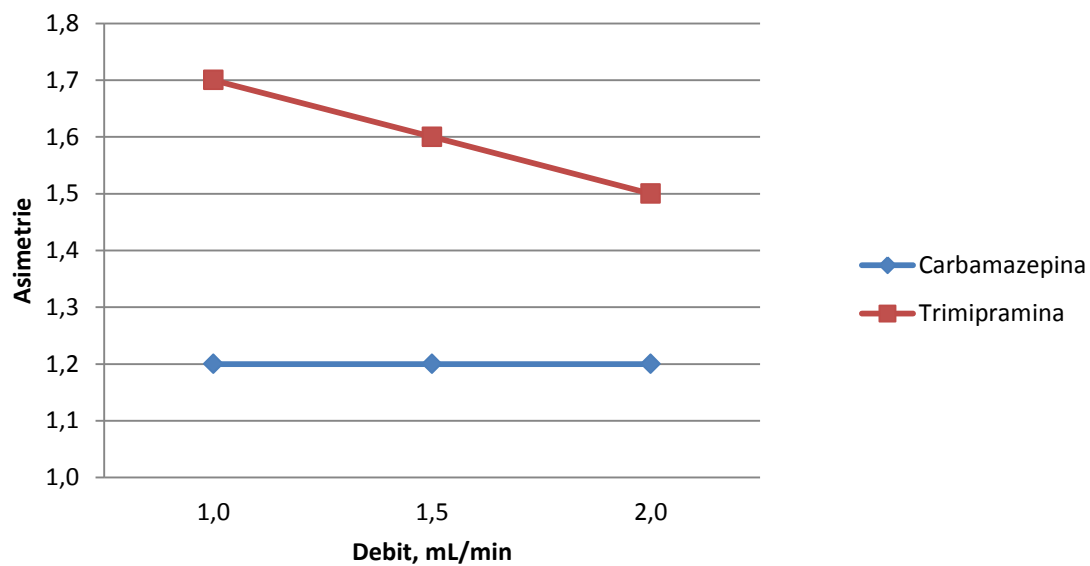


Figura 26. Variația asimetriei cu modificarea debitului la temperatura de 22°C și procent the 40% v/v acetonitril – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

În Figura 27 se poate vedea o cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă.

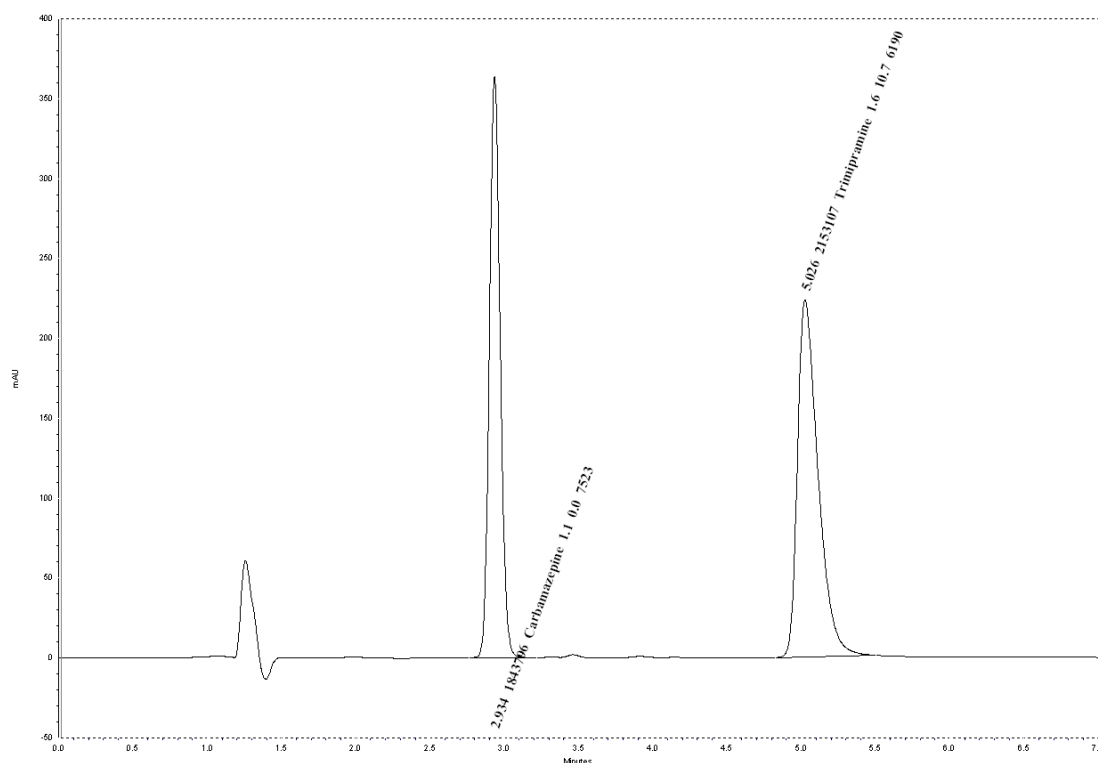


Figura 27. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina.

S-au testat extracții lichid-lichid cu n-hexan și acetat de etil la pH alcalin asigurat de amoniac sau carbonat acid de sodiu. S-au efectuat câte două probe per condiție. Cele mai bune rezultate privind recuperarea, deviația relativă standard (RSD, %) între probe și aspectul cromatogramei s-a obținut pentru acetat de etil cu amoniac. Astfel metoda de extracție selectată a fost extracția lichid-lichid cu acetat de etil, în mediul bazic (Tabelul 3).

S-a ales utilizarea pH-ului bazic datorita caracterului acido-bazic al celor doi analiți discutat anterior (slab bazic). Forma mai liposolubilă se obține la pH ridicat (bazic) și va partiționa preponderent în faza organică.

Tabelul 3. Teste de extracție pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizând ca standard intern trimipramina

Solvent organic	Agent alcalinizant	Recuperare, %	RSD, %
n-Hexan	Amoniac	100,88	8,7
Acetat de etil	Amoniac	101,79	1,5
n-Hexan	Carbonat acid de sodiu	96,32	0,6
Acetat de etil	Carbonat acid de sodiu	100,72	2,8

În **Figura 28**, **Figura 29**, **Figura 30** și **Figura 31** sunt prezentate cromatograme obținute la testele de extracție.

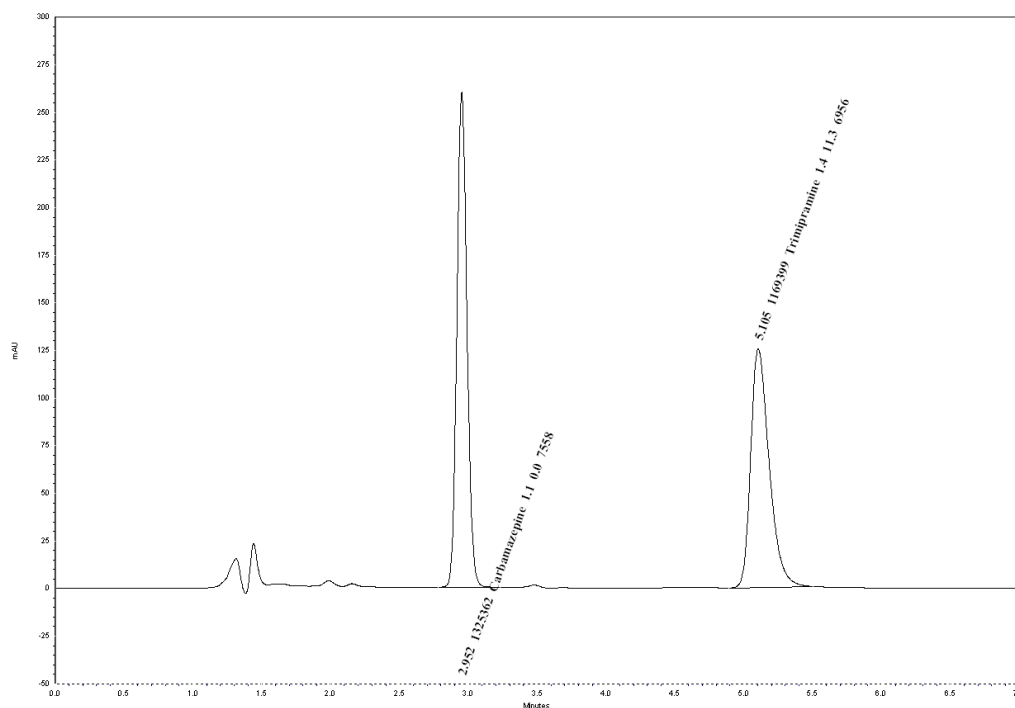


Figura 28. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu acetat de etil/amoniac.

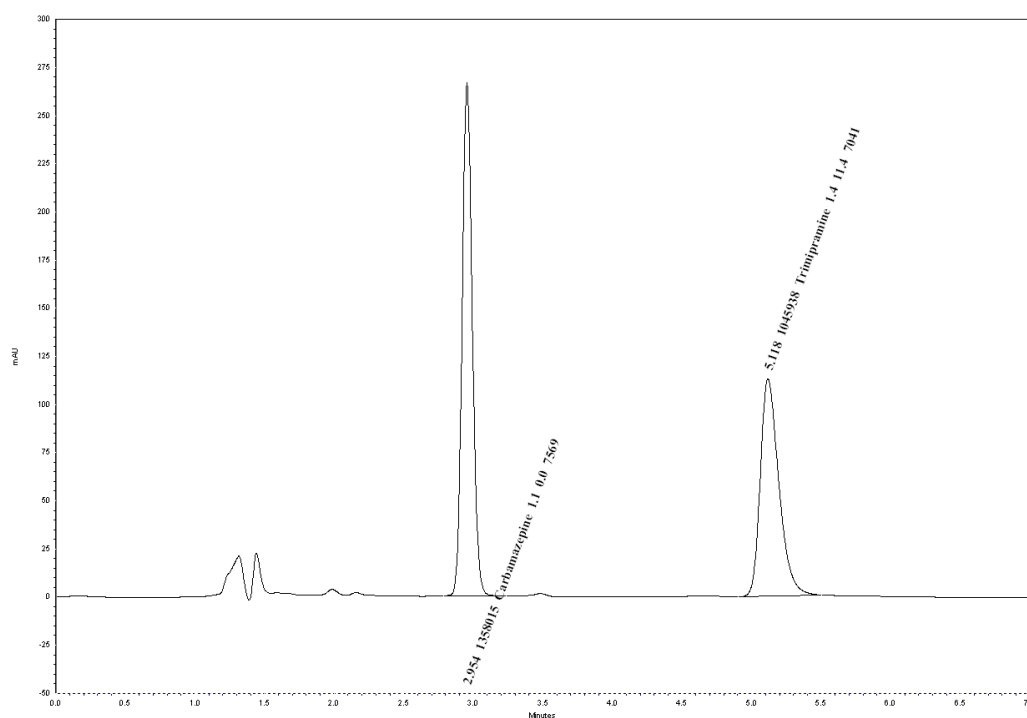


Figura 29. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu acetat de etil/carbonat acid de sodiu.

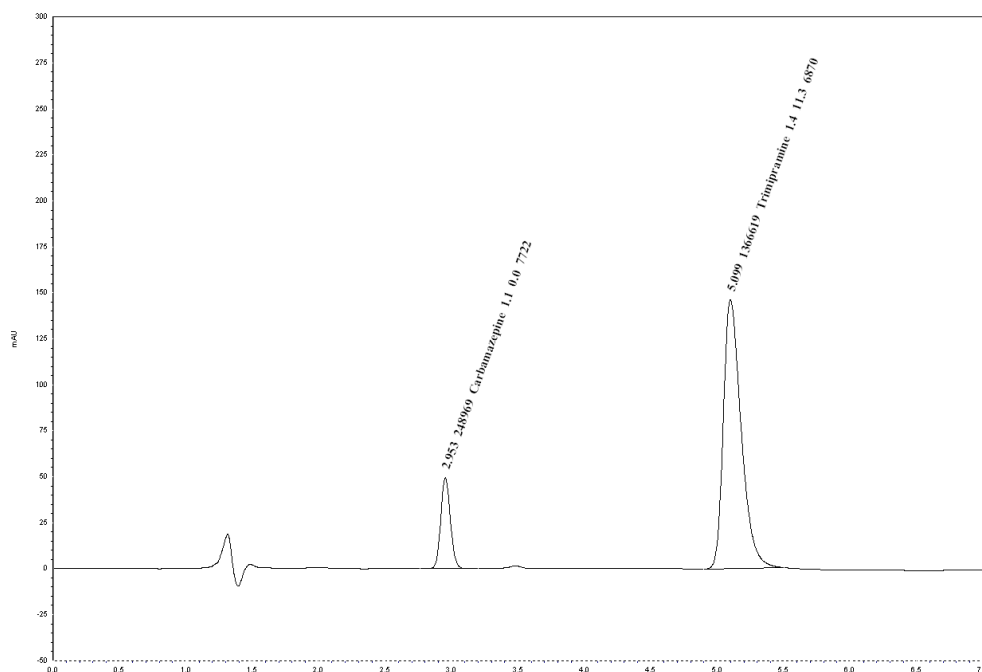


Figura 30. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu n-hexan/amoniac.

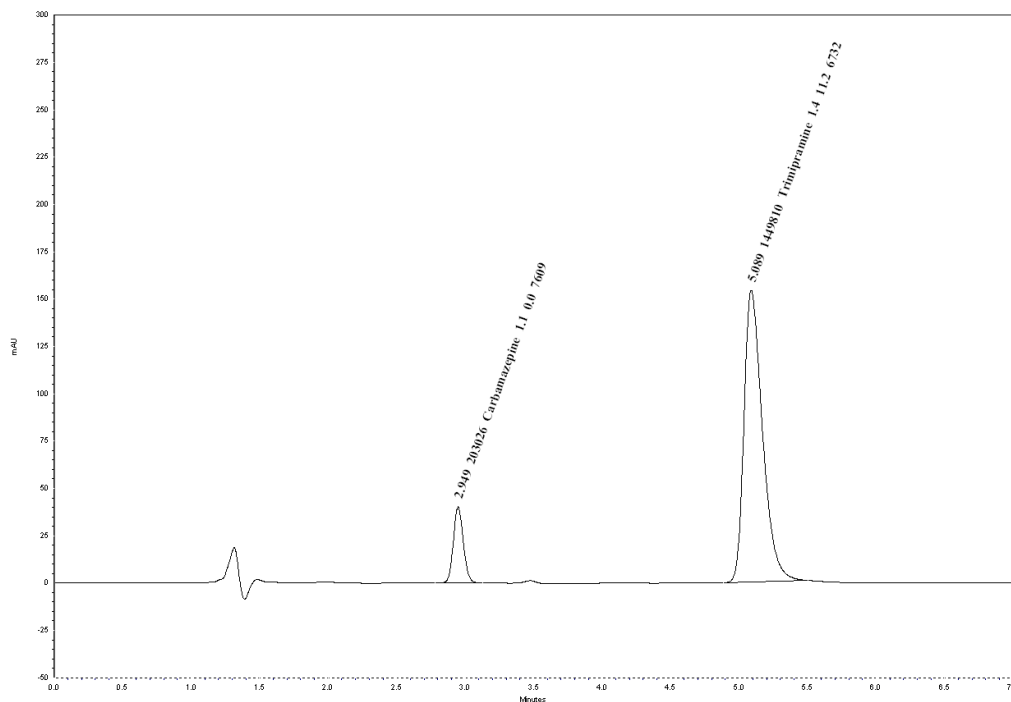


Figura 31. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu n-hexan/carbonat acid de amoniu.

3.2.2. Validarea metodei analitice

3.2.2.1. Specificitate / selectivitate

Cromatogramele obținute pentru soluțiile testate au evidențiat faptul ca nu există componente în plasmă care să interfere cu cei doi analiți. De asemenea cromatograma soluției extrase din plasmă cu adaos de standard intern arată lipsa interferențelor cu carbamazepina, analitul principal.

Carbamazepina se administrează în monoterapie așadar nu este nevoie de testarea altor substanțe pentru interferențe. Cu toate acestea dacă pacienții testați sunt sub tratament pentru alte afecțiuni, posibilitatea interferențelor trebuie testată de la caz la caz.

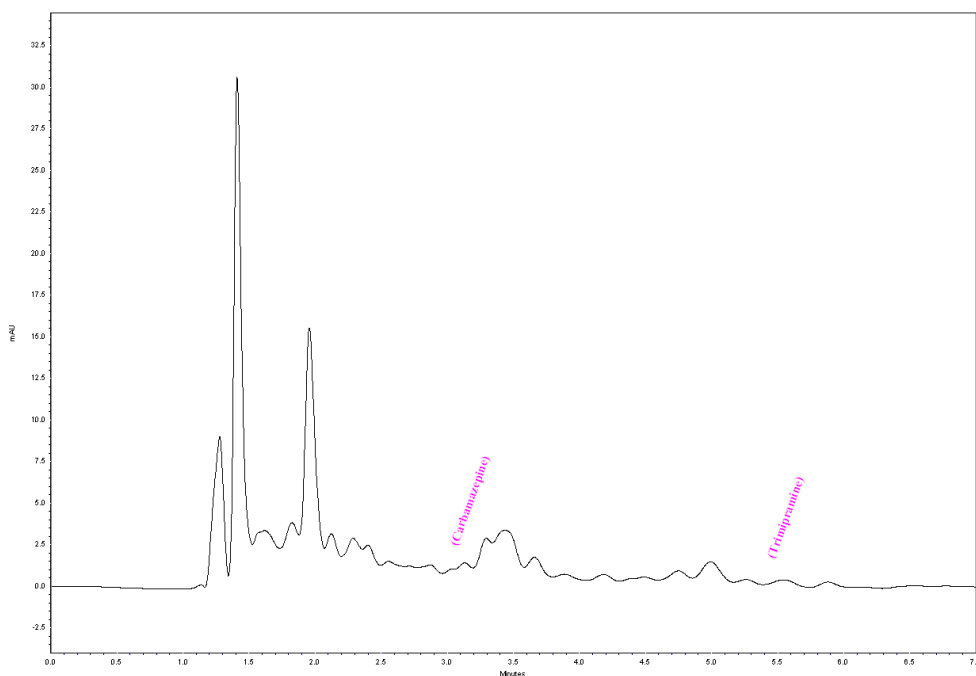


Figura 32. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă (soluția martor M1) – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

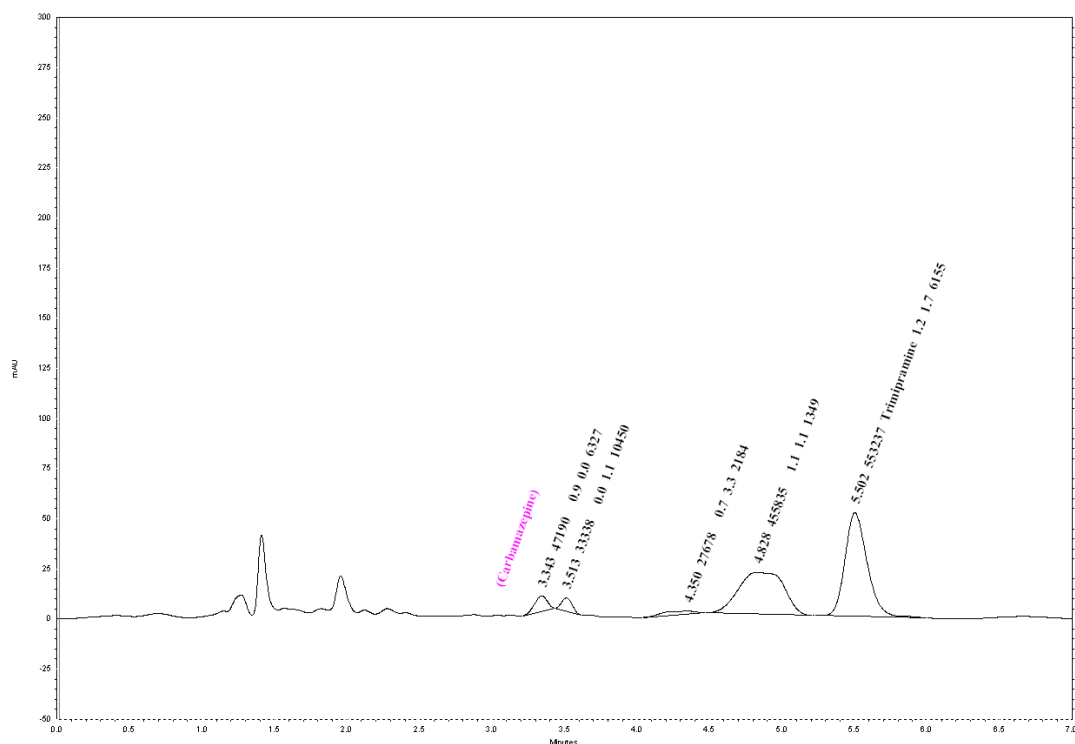


Figura 33. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă cu standard intern - trimipramina (soluția martor M2) – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.2.2.2. Liniaritate

Coeficientul de corelație obținut este mai mare decât 0,99, criteriul de acceptabilitate pentru liniaritate, respectiv 0,9999.

În **Figura 35** sunt prezentate cromatogramele suprapuse pentru fiecare soluție preparată pentru parametrul liniaritate.

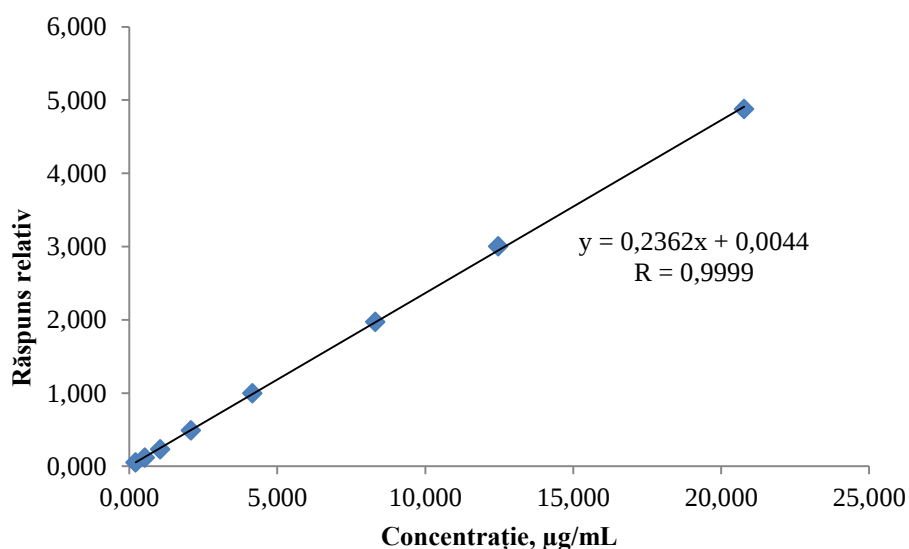


Figura 34. Curba de calibrare pentru carbamazepină (0.2-20.0 µg carbamazepină/mL) – metoda de analiză a carbamazepinei, utilizând ca standard intern trimipramina

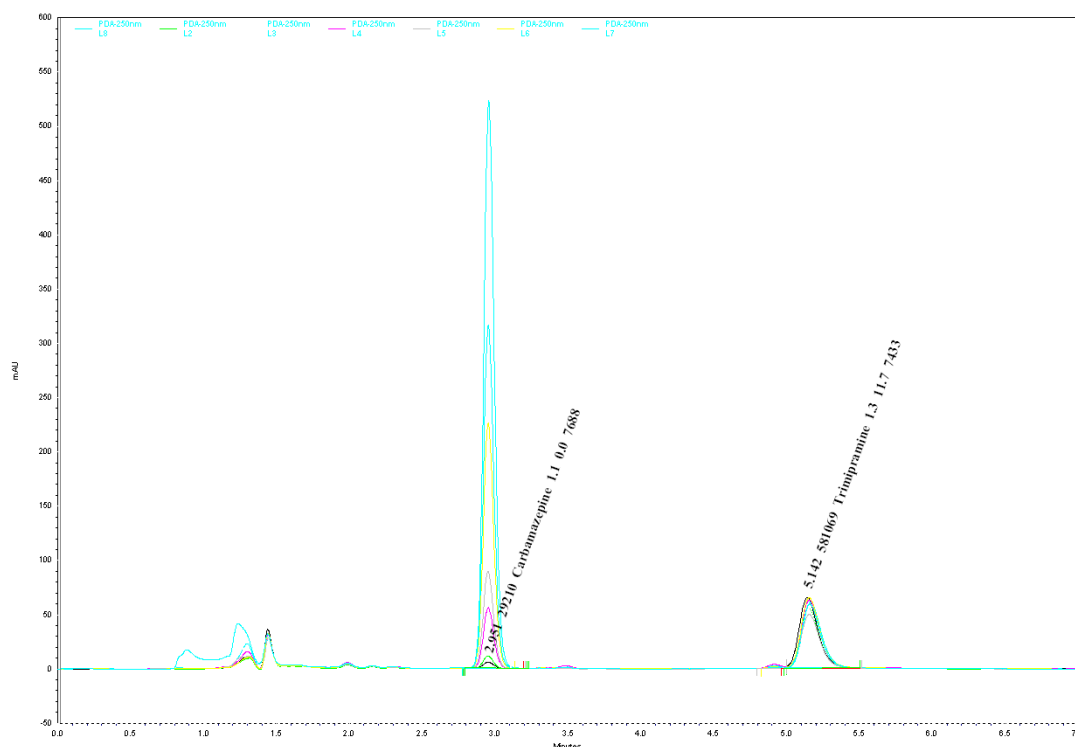


Figura 35. Cromatograme reprezentative (suprapuse) preparate pentru parametrul liniaritate (0.2-20.0 µg carbamazepina/mL) – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.2.2.3. Acuratețe și precizie

Tabelul 4. Rezultatele obținute pentru parametrii precizie și acuratețe – validarea metodei de dozare a carbamazepinei, utilizând trimipramina ca standard intern

	Concentrație, µg/mL		Recuperare, %	Deviație relativă standard, %
	Reală	Obținută (media pentru cele cinci probe)		
Ziua 1	0,204	0,211	103,4	7,8
	12,200	12,660	103,8	2,0
	20,400	22,420	109,9	5,7
Ziua 2	0,204	0,215	105,4	14,4
	12,200	11,100	91,0	5,2
	20,400	21,840	107,1	1,5

În **Figura 36**, **Figura 37** și **Figura 38** sunt prezente cromatograme reprezentative pentru parametrii precizie și acuratețe.

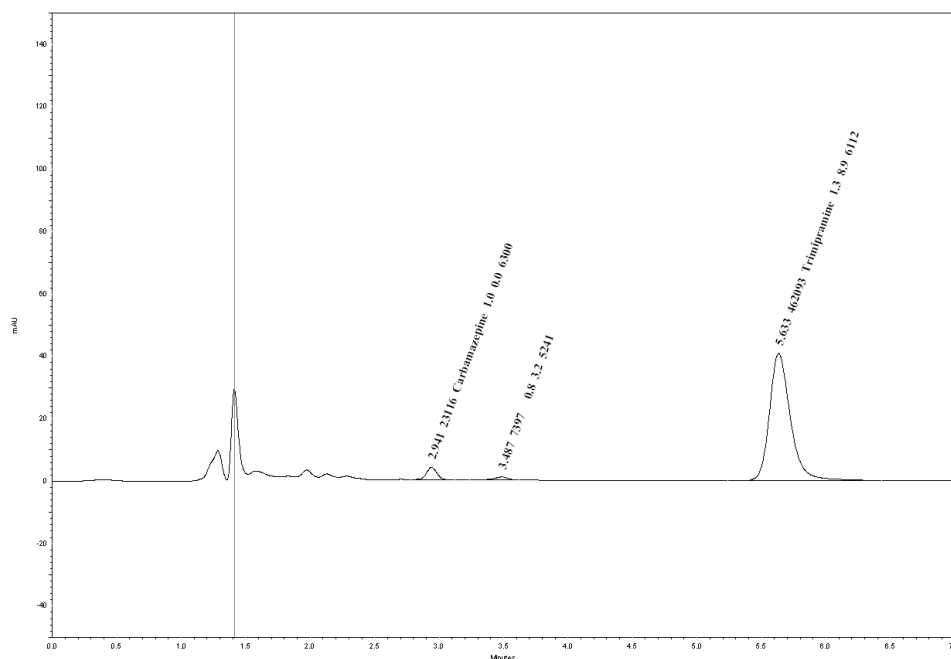


Figura 36. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 0.1 µg carbamazepina/mL – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

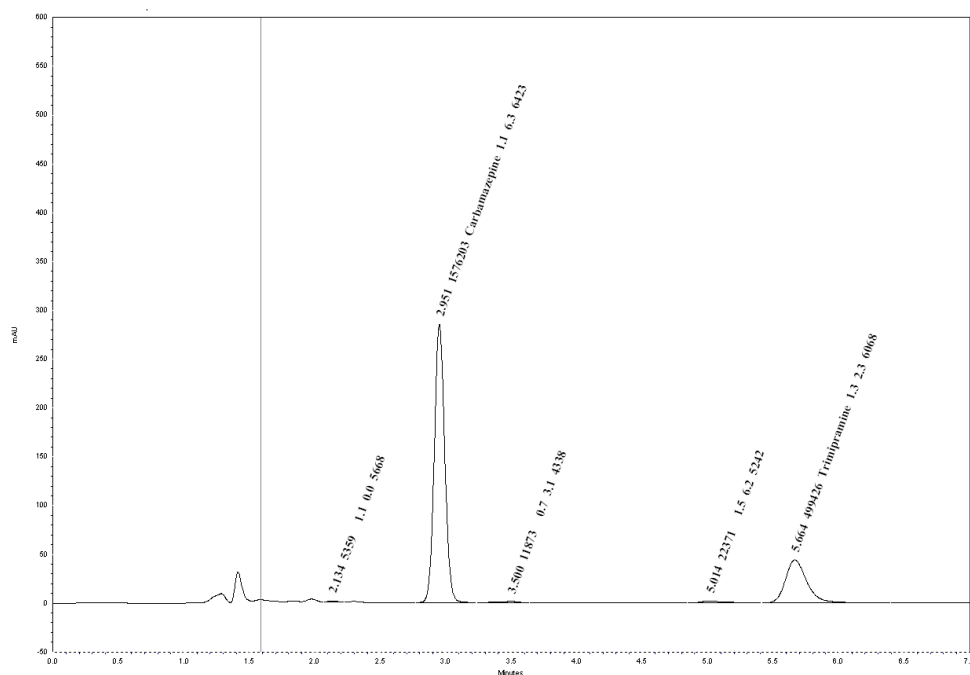


Figura 37. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 12 µg carbamazepina/mL – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

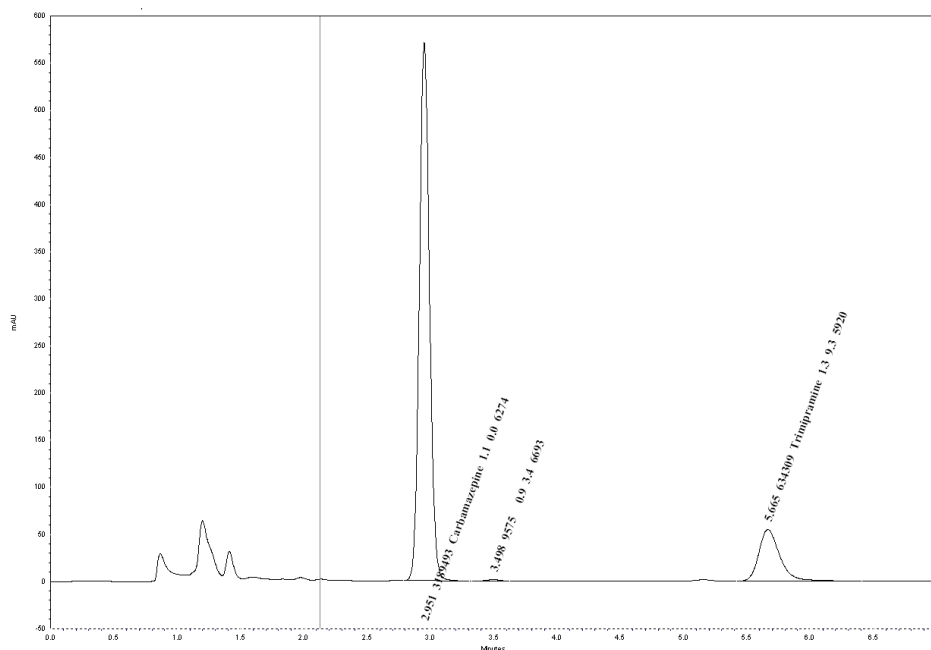


Figura 38. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 20 μg carbamazepina/mL – metoda de dozare a carbamazepinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.2.2.4. Limita of cuantificare

S-au preparat diferite diluții din soluția stoc de carbamazepină pentru a obține un pic cu raportul semnal/zgomot de aproximativ 10. Concentrația astfel determinată (0,2 μg carbamazepină/mL) a fost confirmată prin testele de liniaritate, acuratețe și precizie.

Cromatograma reprezentativă – **Figura 36.**

3.2.3. Concluzii

Metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă a fost dezvoltată ținând cont de proprietățile analiților, de necesitatea unui timp scurt de analiză și de obținerea unor indici de performanță cromatografici cu valori adecvate. S-a determinat astfel că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică BDS Hypersil C18, 125*4.6 mm, 5 μm cu faza mobilă formată din soluție tampon fosfat de trietilamoniu pH 2,4 și acetonitril în proporția 60:40 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 25°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 7 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu acetat de etil și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – trimipramina.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,2 $\mu\text{g/mL}$ și 20 $\mu\text{g/mL}$, interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C și compoziția fazei mobile apoase (soluția tampon): acetonitril între 62:38 (v/v) și 55:45 (v/v).

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (7 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapid.

Metoda poate fi aplicată așadar pentru monitorizarea terapeutică, studii de farmacocinetică sau studii clinice.

3.3. Metoda de dozare a fluoxetinei din plasma umana utilizand trimipramina ca standard intern

Eficacitatea terapeutică a fluoxetinei se obține, conform literaturii de specialitate la concentrații cuprinse în general între 0,15 $\mu\text{g/mL}$ și 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Aceste concentrații sunt mult prea mici, iar acest lucru cuplat cu coeficientul mic de absorbție al substanței duce la imposibilitatea utilizării detecției UV. Fluoxetina prezintă însă fluorescență cu excitație la 230 nm și emisie la 290 nm. Așadar pentru a putea folosi detecția de fluorescență trebuie utilizat un standard intern care să aibă aceleași proprietăți. Datele de literatură arată că imipramina are lungimea de undă de excitație la 240 nm și emisie la 370 nm. Ca standard intern s-a utilizat un compus foarte similar structural și anume trimipramina.

Fluoxetina și trimipramina sunt asemănătoare din punct de vedere al structurii chimice (Figura 39). Amandouă sunt substanțe cu caracter slab bazic (fluoxetina are un pK_a estimat la 9,8 (173) iar trimipramina are $\text{pK}_a = 7,7$ (6)). La pH puternic bazic amandouă substanțele vor fi în forma neionizată și vor partiționa în faza organică, nepolară, la contactul cu faza apoasă.

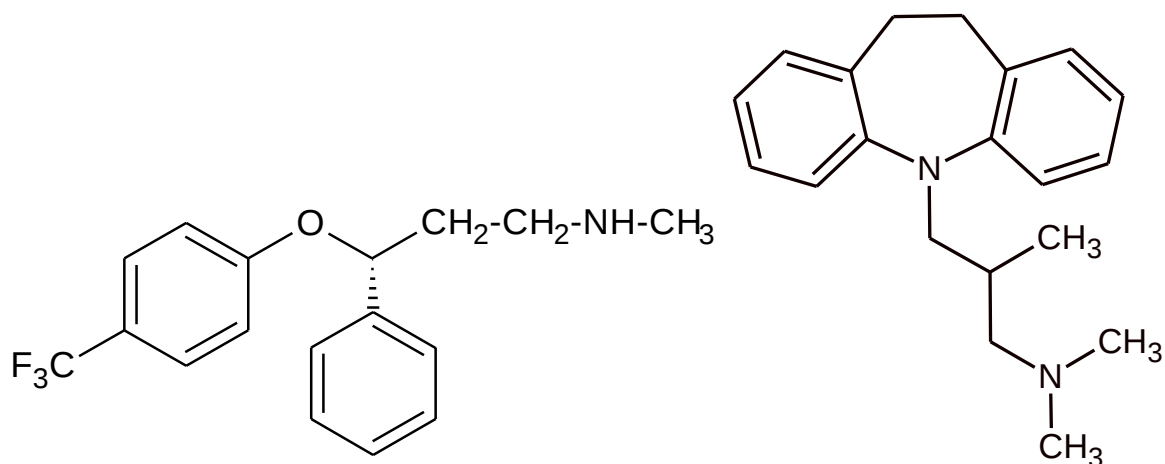


Figura 39. Structurile chimice ale fluoxetinei (stânga) și trimipraminei (dreapta)

3.3.1. Dezvoltarea metodei

Pentru stabilirea condițiilor optime de operare au fost variați mai mulți parametrii care influențează eluția celor doi compuși: coloana cromatografică, debitul fazei mobile, temperatura și compoziția fazei mobile. S-a pus accent pe o separare foarte bună datorită necesității detecției fluorescente diferențiate.

S-a încercat utilizarea a două faze apoase la pH acid (amandoi compușii sunt în forma ionizată și au astfel o retenție mai redusă, ducând la obținerea unui timp de analiză mai scurt și de asemenea se prelungește și durata de viață a coloanei care este mai rezistentă la pH-uri mici, acide) și a doi solvenți organici: metanol și acetonitril. Fazele apoase sunt acid acetic 0,1% (pH aproximativ 2,5) și trietilamină 10 mM ajustată la pH 2,4 cu acid fosforic.

Observațiile privind eluția trimipraminei discutate la Capitolul 3.2.1 se aplică și în acest caz. S-a ales ca fază mobilă apoasă trietilamină (TEA) 10 mM ajustată la pH 2,7 cu acid fosforic. Faza apoasă cu acid acetic (acid carboxilic) a prezentat interferențe cu detecția de fluorescență. S-au testat patru coloane cromatografice: Thermo® BDS Hypersil C18 4,6x125 mm, 5μm, Thermo® Hypersil Gold 4,6x150 mm 5μm, Agilent® Zorbax Extend C18 4,6x250 mm 5μm și Merck® Kromasil C18 4,6x150 mm, 5 μm

Dintre coloanele testate, Hypersil Gold a obținut rezultate mai bune din punct de vedere al simetriei picurilor, dar și al rezoluției și eficienței..

Dezvoltarea metodei a continuat prin creșterea treptată procentului fazei apoase pornind de la procentul inițial de fază apoasă : acetonitril = 15:85 (v/v). Separare satisfăcătoare s-a obținut la un conținut de 65% fază apoasă (v/v). Acetonitrilul s-a ales ca

solvent organic deoarece prezintă rezultate mai bune privind timpul de retenție, simetria picurilor și eficiența (Figura 40 și Figura 41).

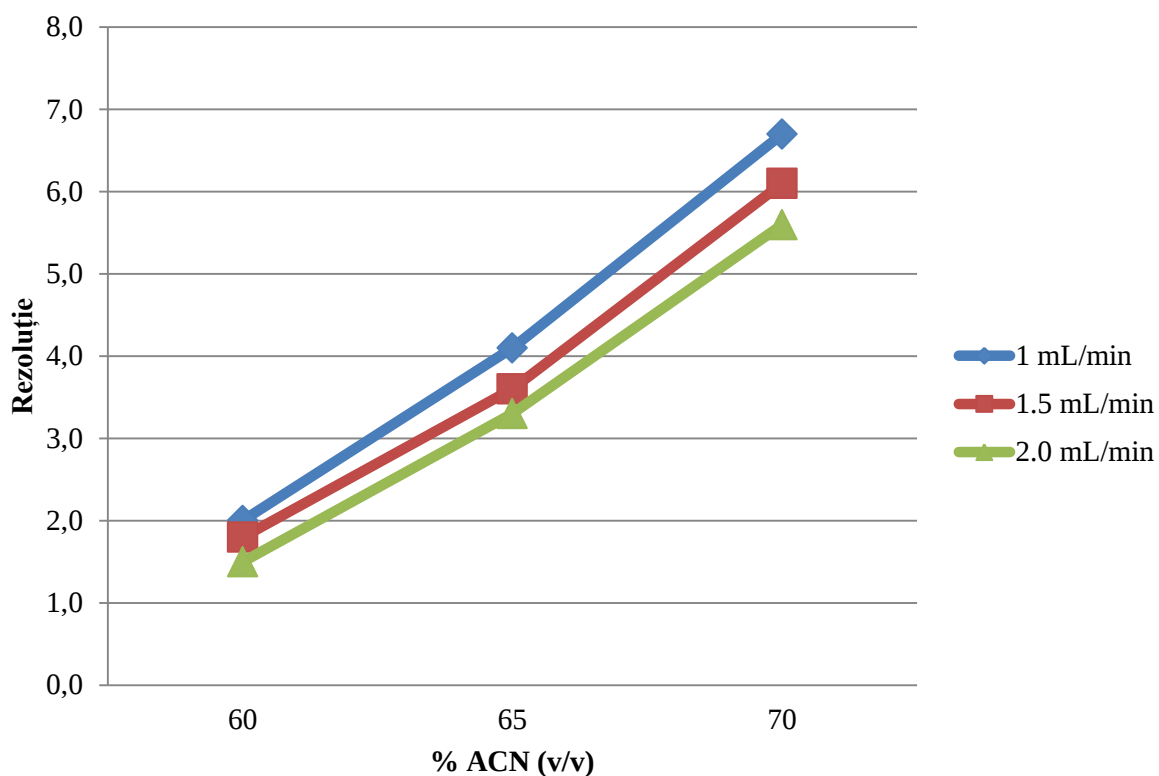


Figura 40. Variația rezoluției cu modificarea procentului de acetonitril și cu debitul – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

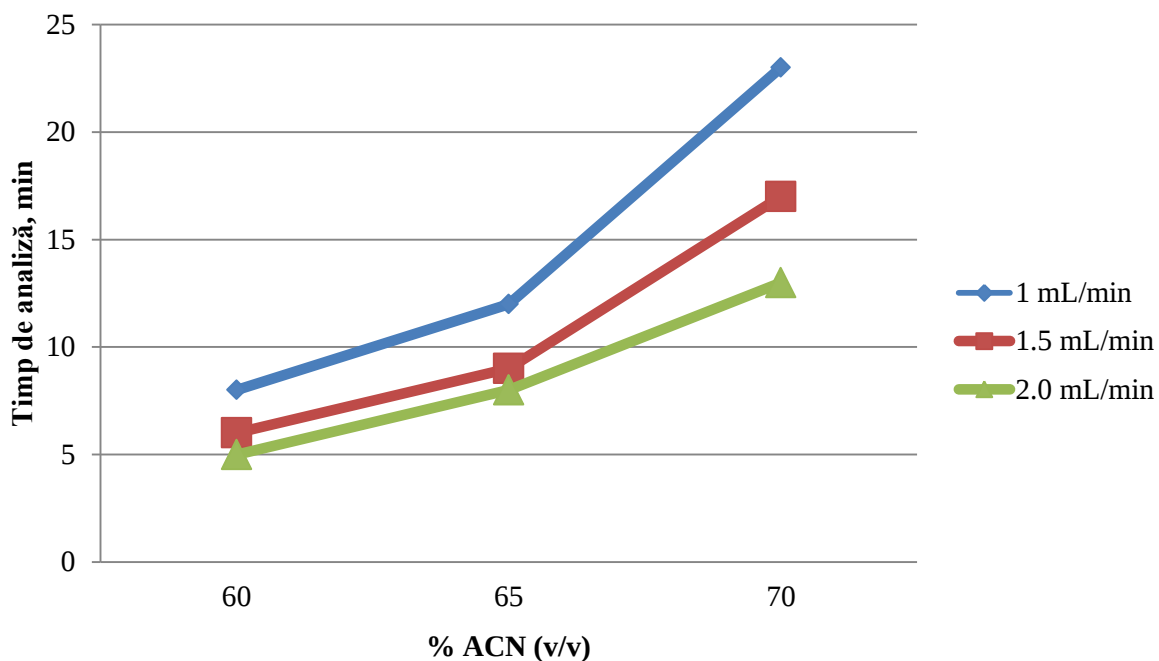


Figura 41. Variația timpului de analiză cu modificarea procentului de acetonitril și cu debitul – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

Pentru setarea condițiilor optime s-a ținut cont atât de rezoluția dintre cele două picuri care să permită detecția de fluorescență diferită dar și un timp de analiză redus care să permită testarea unui număr mare de probe. Astfel, deși la un procent mai mare de faza apoasă separarea este mai bună are loc și creșterea substanțială a timpului de analiză (la fiecare 5% în plus la faza mobilă apoasă, timpul de analiză practic se dublează). Astfel se alege procentul de 65% de fază mobilă apoasă unde separarea este suficientă, la un timp de analiză rezonabil (12 minute).

Se observă că o creștere a debitului duce la obținerea unui timp de analiză redus, așa cum era de altfel de așteptat dar produce de asemenea scăderea rezoluției între cele două picuri. De asemenea creșterea debitului duce la scăderea eficienței.

Creșterea temperaturii nu are efecte semnificative asupra analizei cromatografice (Figura 43) cu excepția reducerii ne semnificative a timpului de analiză.

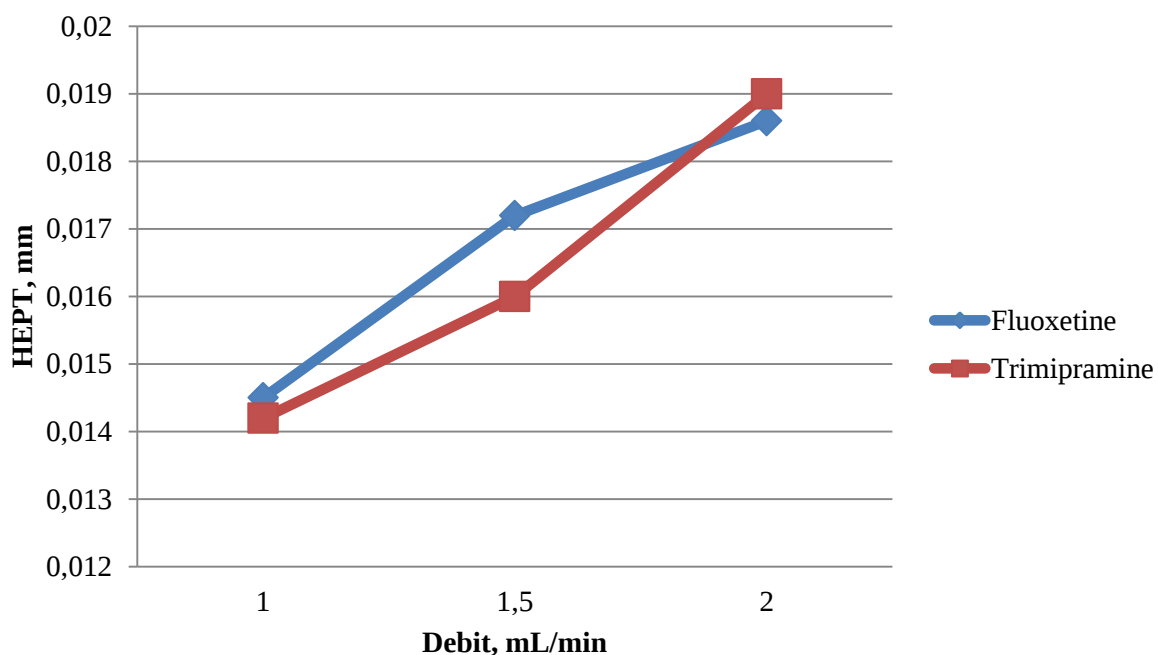


Figura 42. Variația HEPT cu debitul pentru fluoxetină și trimipramină – metoda de dozare a fluoxetinei utilizând ca standard intern trimipramina

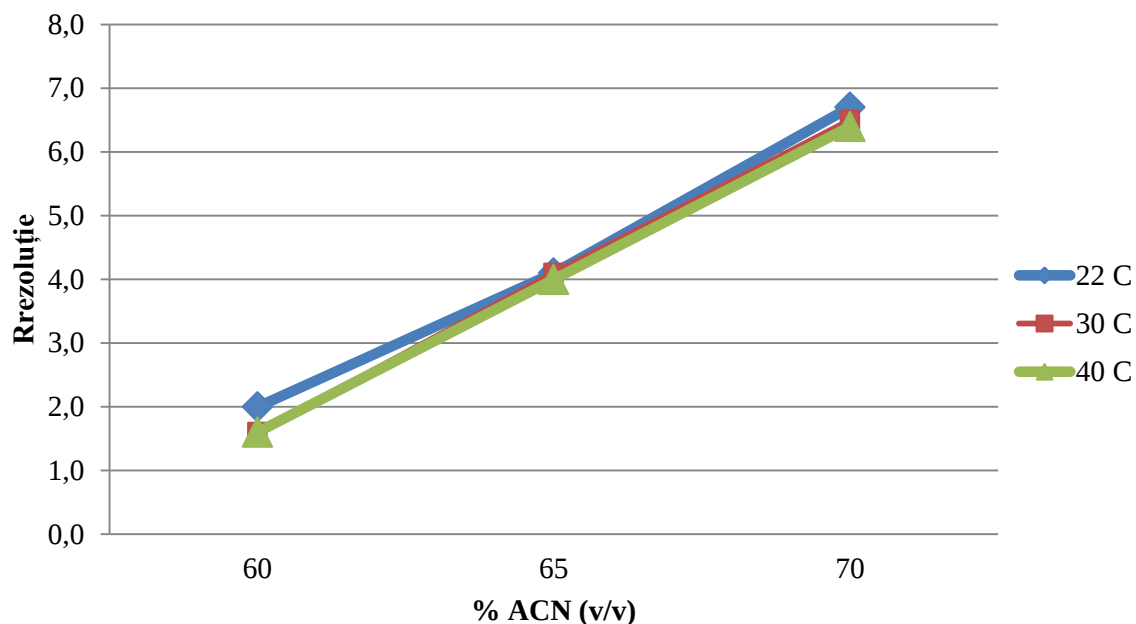


Figura 43. Variația rezoluției cu modificarea procentului de acetonitril și cu temperatura – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

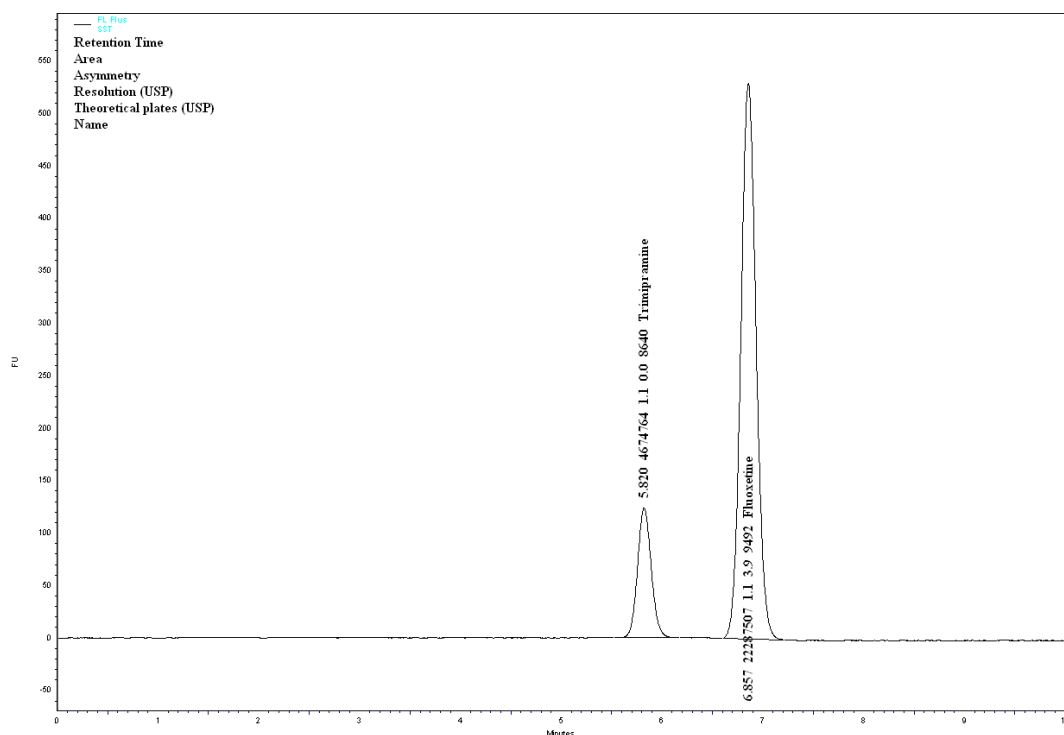


Figura 44. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru determinarea fluoxetinei utilizând ca standard intern trimipramina.

S-au testat extracții lichid-lichid cu n-hexan, acetat de etil, diclorometan și cloroform la pH alcalin asigurat de amoniac sau carbonat acid de sodiu. S-au efectuat câte două probe per condiție. Cele mai bune rezultate privind recuperarea, deviația relativă standard (RSD, %)

între probe și aspectul cromatogramei s-a obținut pentru n-hexan cu amoniac. Restul solvenților fie au prezentat interferențe cu compușii analizați, fie au prezentat rezultate aberante ale recuperării. De asemenea alcalinizarea cu carbonat acid de sodiu a prezentat rezultate mai slabe din punct de vedere al recuperării.

Astfel metoda de extracție selectată a fost extracția lichid-lichid cu n-hexan, în mediul bazic asigurat de amoniac. În **Figura 45**, **Figura 46**, **Figura 47**, **Figura 48** și **Figura 49** sunt prezentate cromatograme obținute la testele de extracție.

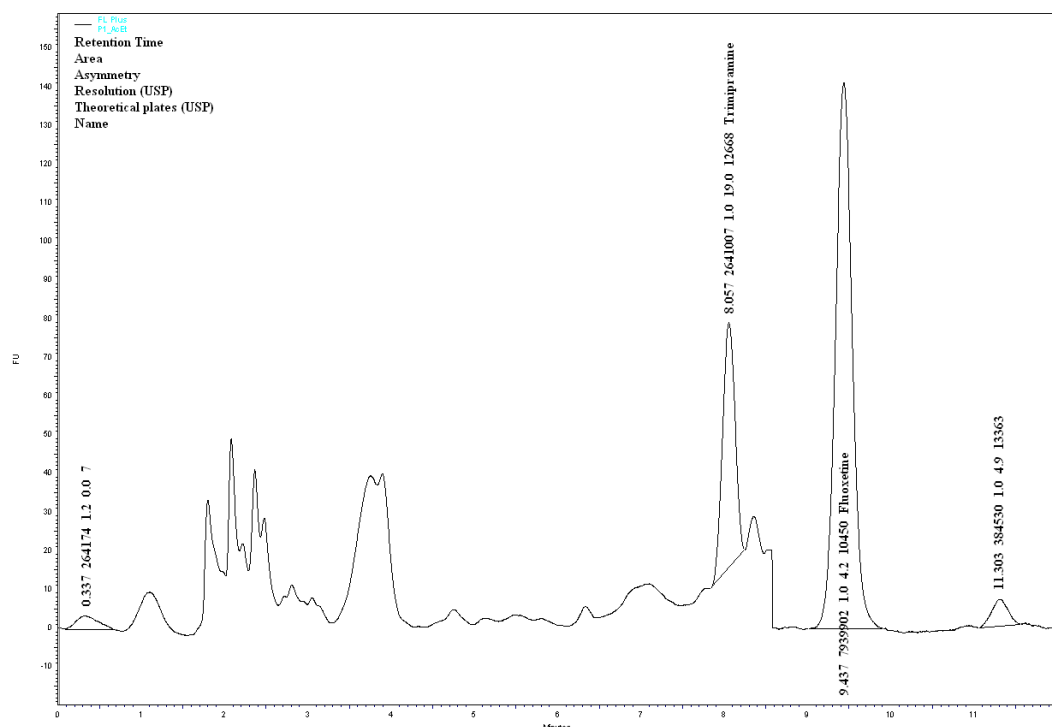


Figura 45. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu acetat de etil/amoniac.

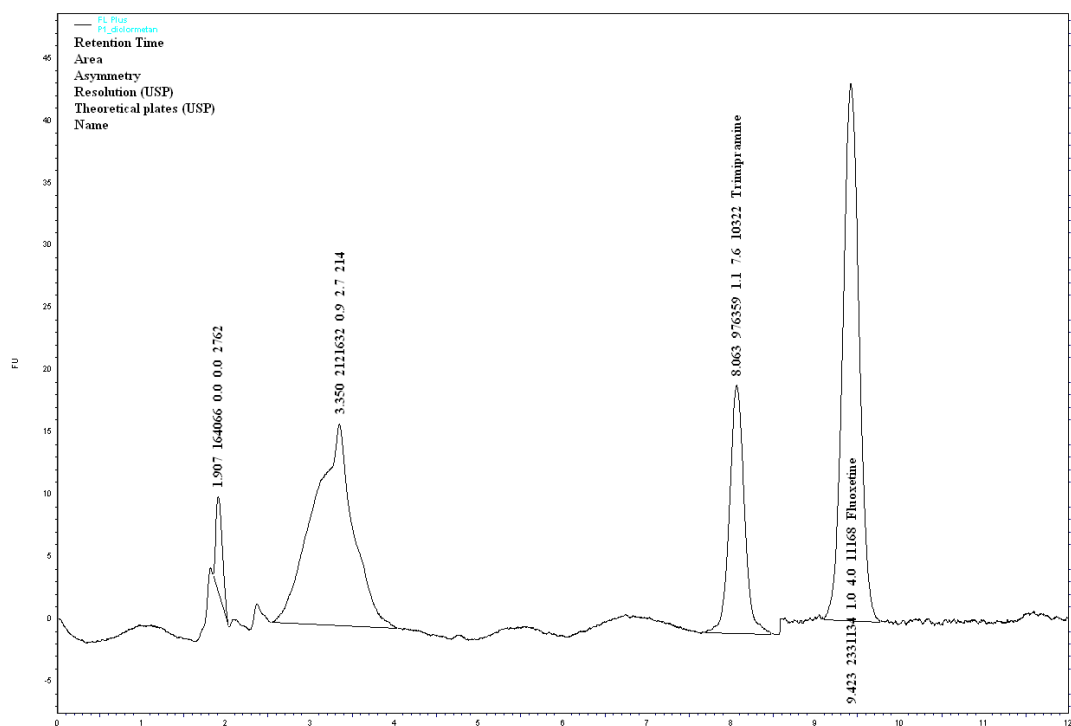


Figura 46. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu diclormetan/amoniac.

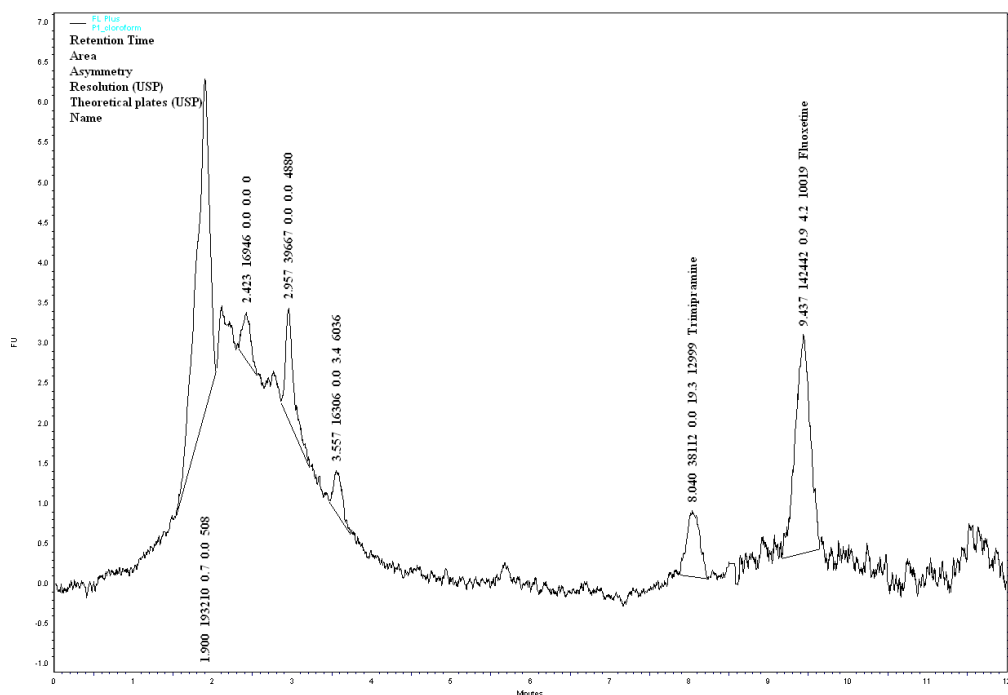


Figura 47. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu cloroform/amoniac.

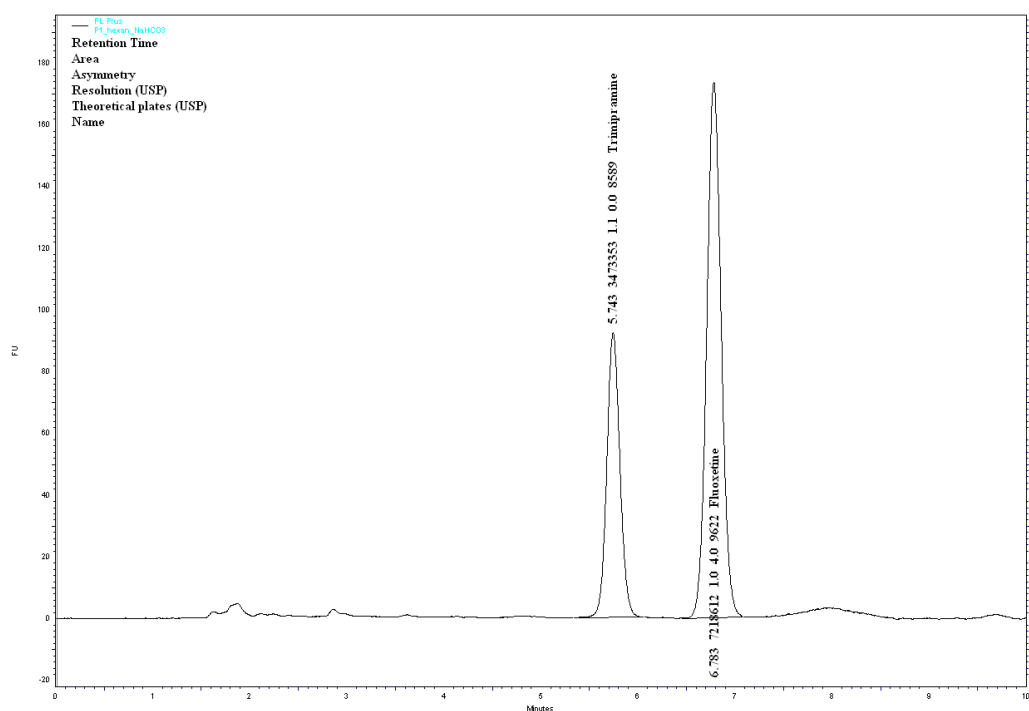


Figura 48. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu n-hexan/carbonat acid de sodiu.

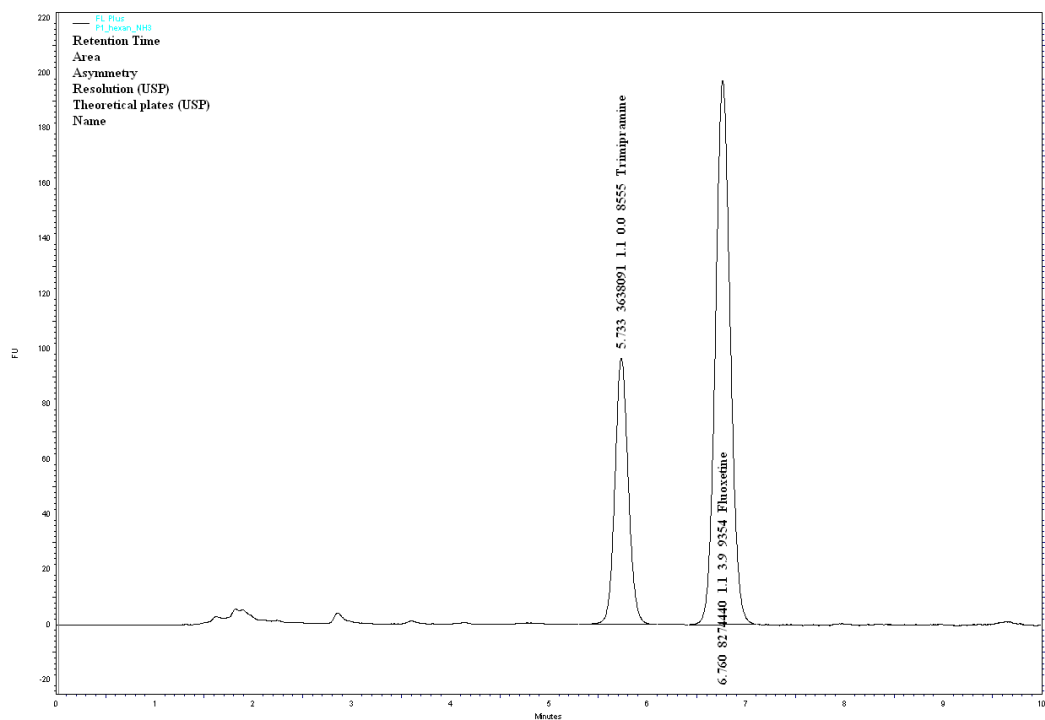


Figura 49. Cromatogramă reprezentativă pentru metoda aleasă pentru metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina – extracție cu n-hexan/amoniac.

3.3.2. Validarea metodei analitice

3.3.2.1. Specificitate / selectivitate

Cromatogramele obținute pentru soluțiile testate au evidențiat faptul ca nu există componente în plasmă care să interfere cu cei doi analiți. De asemenea cromatograma soluției extrase din plasmă cu adaos de standard intern arată lipsa interferențelor cu fluoxetina, analitul principal.

Fluoxetina se administrează în monoterapie așadar nu este nevoie de testarea altor substanțe pentru interferențe. Cu toate acestea dacă pacienții testați sunt sub tratament pentru alte afecțiuni, posibilitatea interferențelor trebuie testată de la caz la caz. Avantajul acestei metode este foarte vizibil în acest caz datorită specificității sale. Este foarte puțin probabil ca o substanță să prezinte aceleași lungimi de undă de excitație și de emisie astfel încât să poată interfera cu analiții.

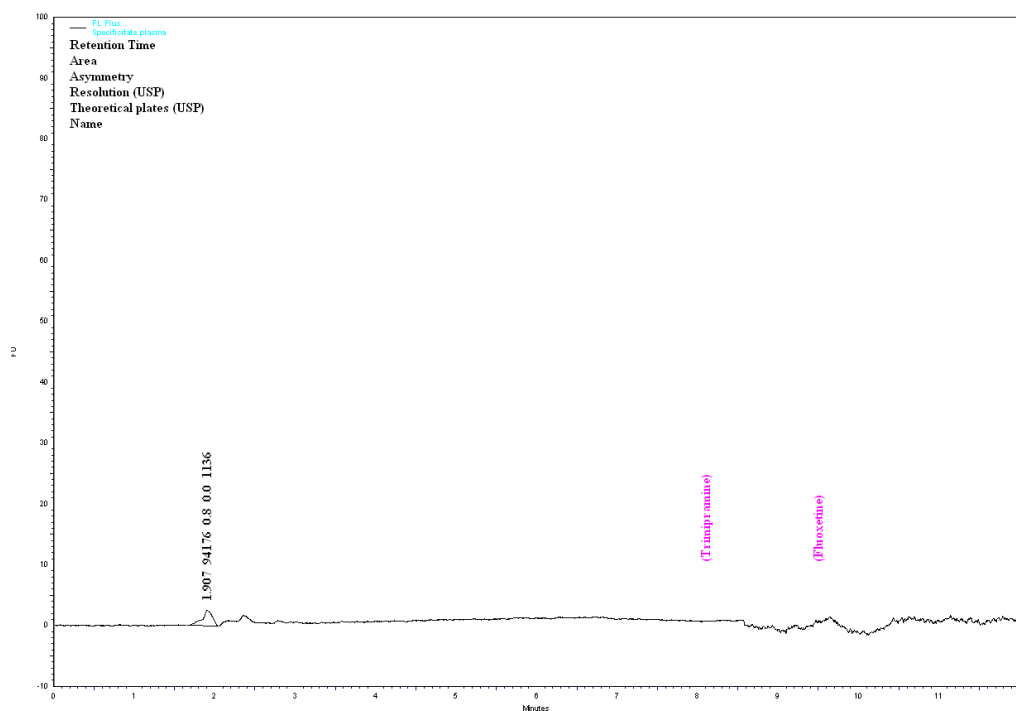


Figura 50. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă (soluția martor M1) – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

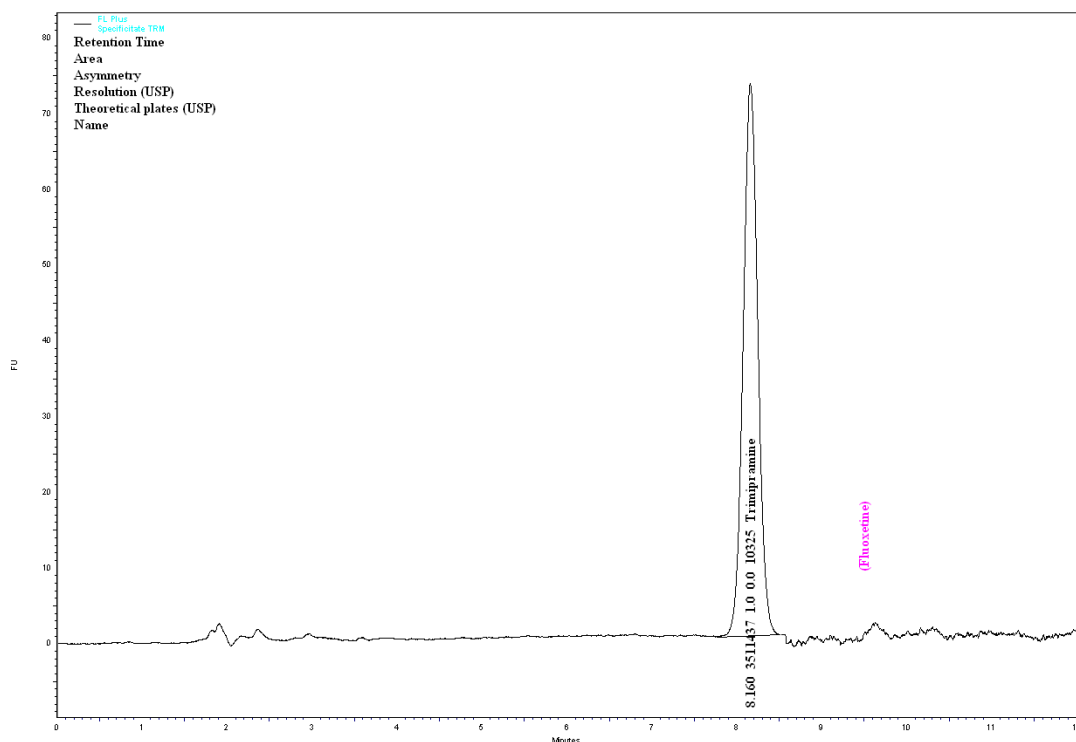


Figura 51. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă cu standard intern - trimipramină (soluția martor M2) – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

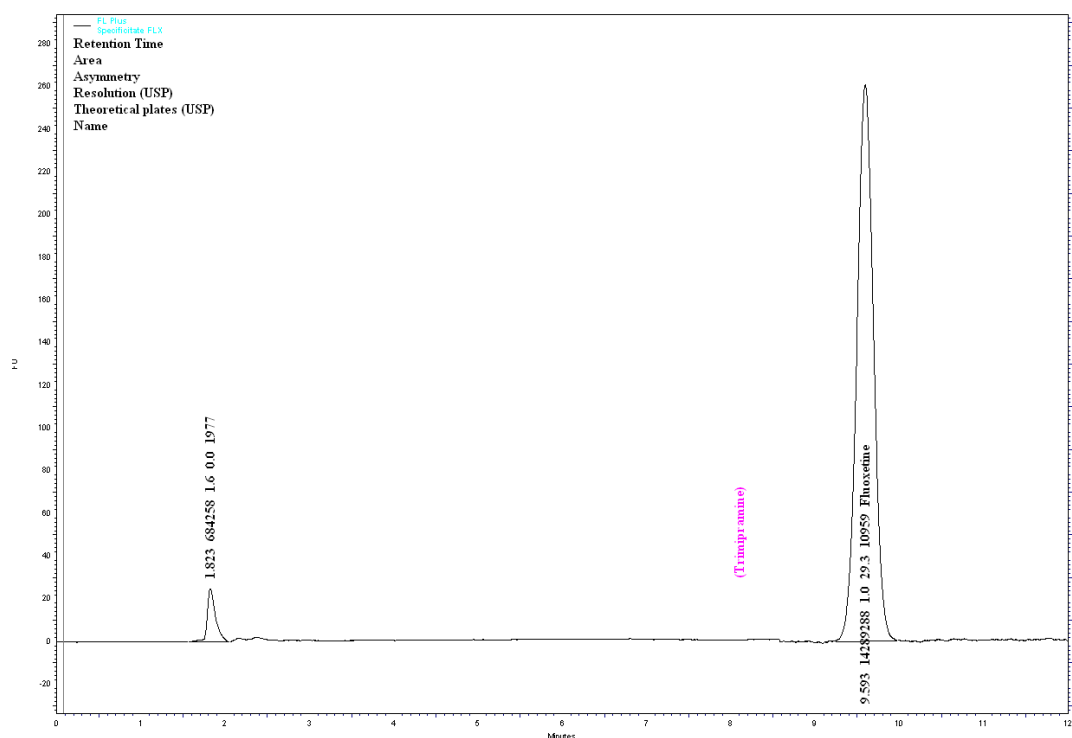


Figura 52. Cromatograma reprezentativa pentru soluția extrasă din plasmă îmbogățită cu fluoxetina la 1000 ng/mL fără standard intern (soluția martor M3) – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.3.2.2. Liniaritate

Coeficientul de corelație obținut este mai mare decât 0,99, criteriul de acceptabilitate pentru liniaritate respectiv 0,9961.

În **Figura 54** sunt prezentate cromatogramele suprapuse pentru fiecare soluție preparată pentru parametrul liniaritate.

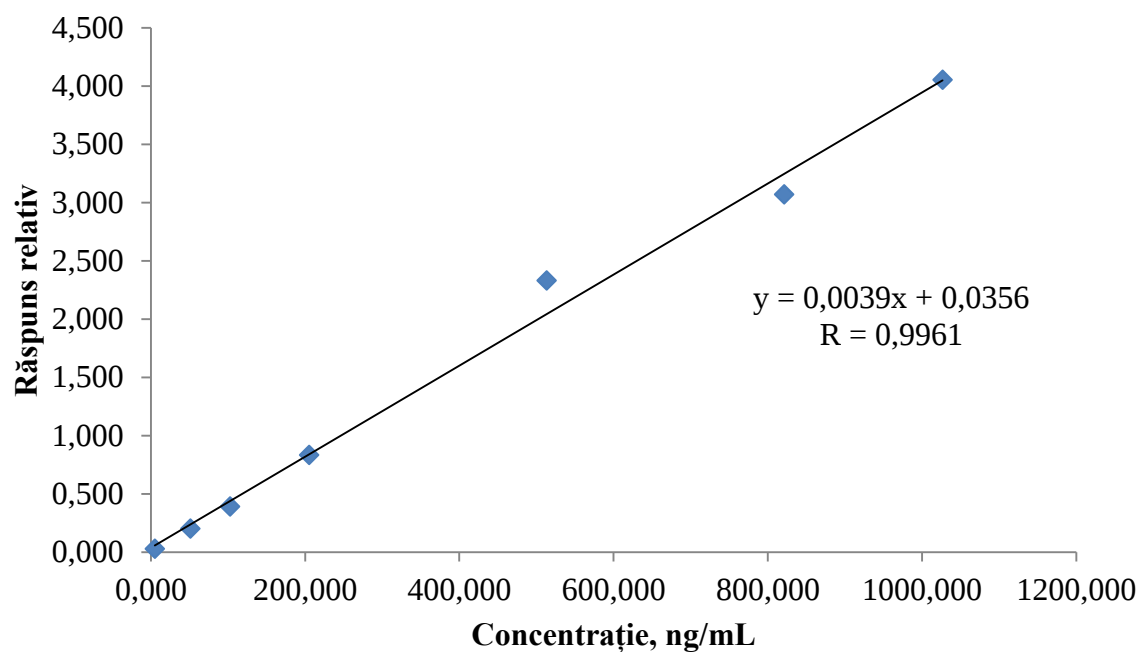


Figura 53. Curba de calibrare pentru fluoxetină (5,0-1000 ng fluoxetină/mL) – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

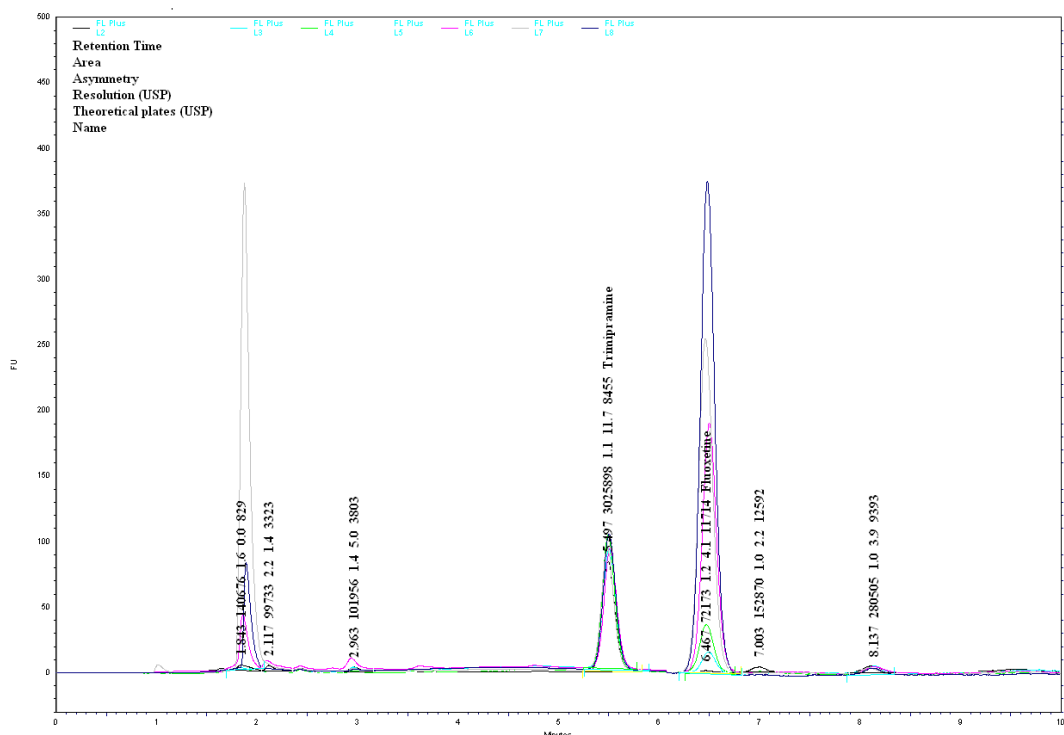


Figura 54. Cromatograme reprezentative (suprapuse) preparate pentru parametrul liniaritate (5,0-1000 ng fluoxetină/mL) – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.3.2.3. Acuratețe și precizie

Tabelul 5. Rezultatele obținute pentru parametrii precizie și acuratețe – validarea metodei de dozare a fluoxetinei, utilizând trimipramină ca standard intern

	Concentrație, ng/mL		Recuperare, %	Deviație relativă standard, %
	Reală	Obținută (media pentru cele cinci probe)		
Ziua 1	10,019	10,630	106,1	8,1
	100,191	104,804	104,6	5,4
	500,954	469,982	93,8	4,8
	1001,908	1029,948	102,8	2,0
Ziua 2	10,019	10,644	106,2	8,3
	100,191	102,817	102,6	8,7
	500,954	458,633	91,6	3,0
	1001,908	1106,599	110,4	2,9

În **Figura 55**, **Figura 56**, **Figura 57** și **Figura 58** sunt prezente cromatograme reprezentative pentru parametrii precizie și acuratețe.

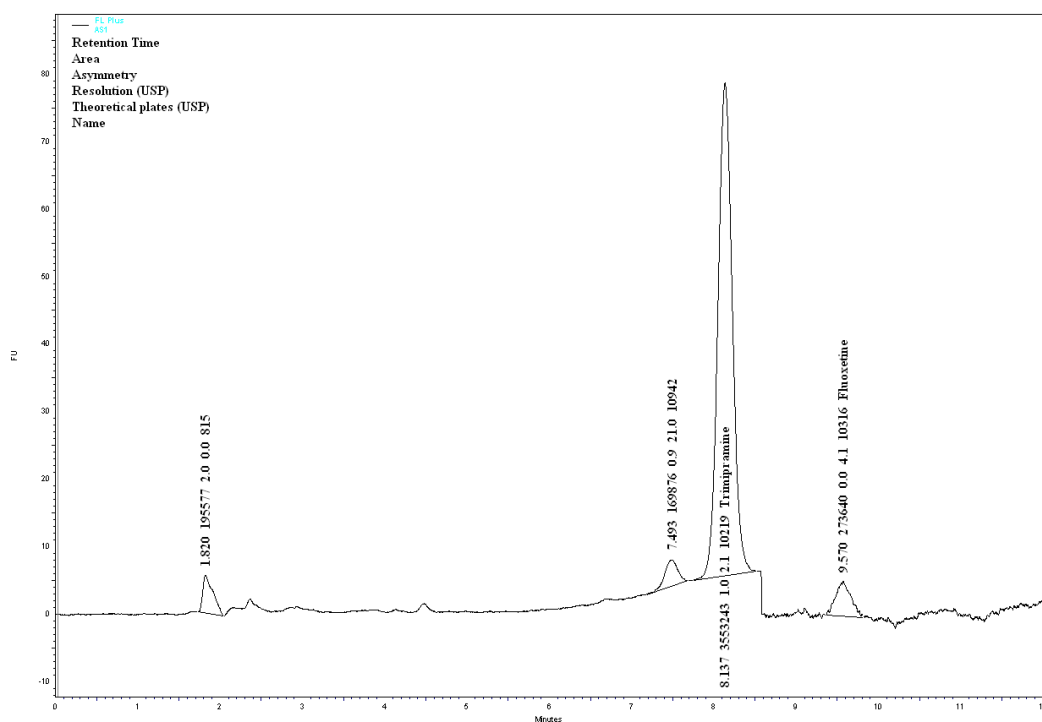


Figura 55. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 10 ng fluoxetină/mL – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

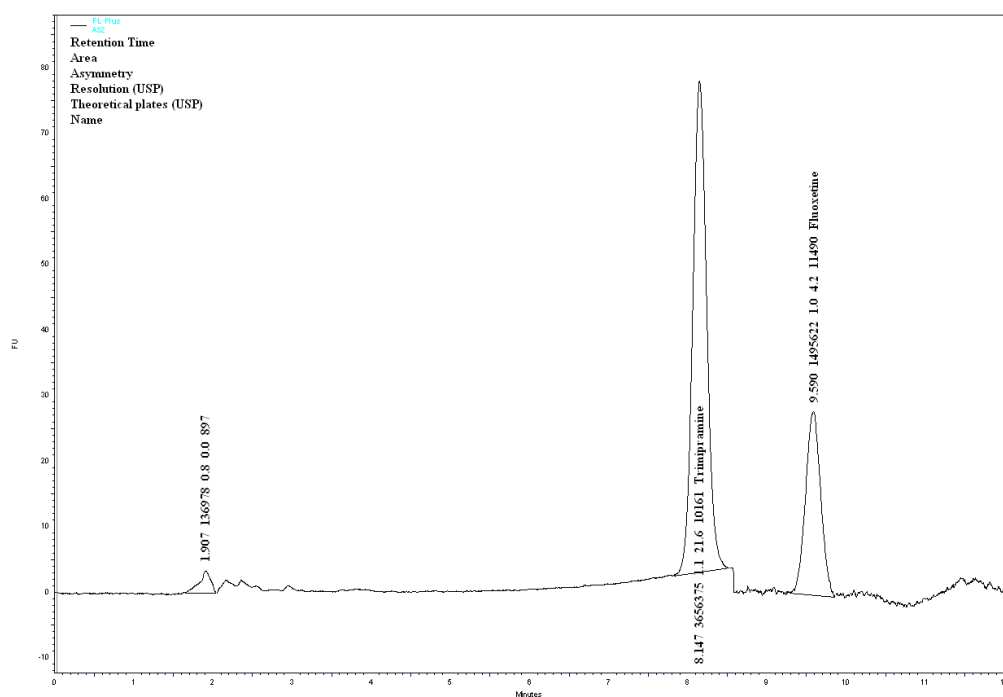


Figura 56. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 100 ng fluoxetină/mL – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

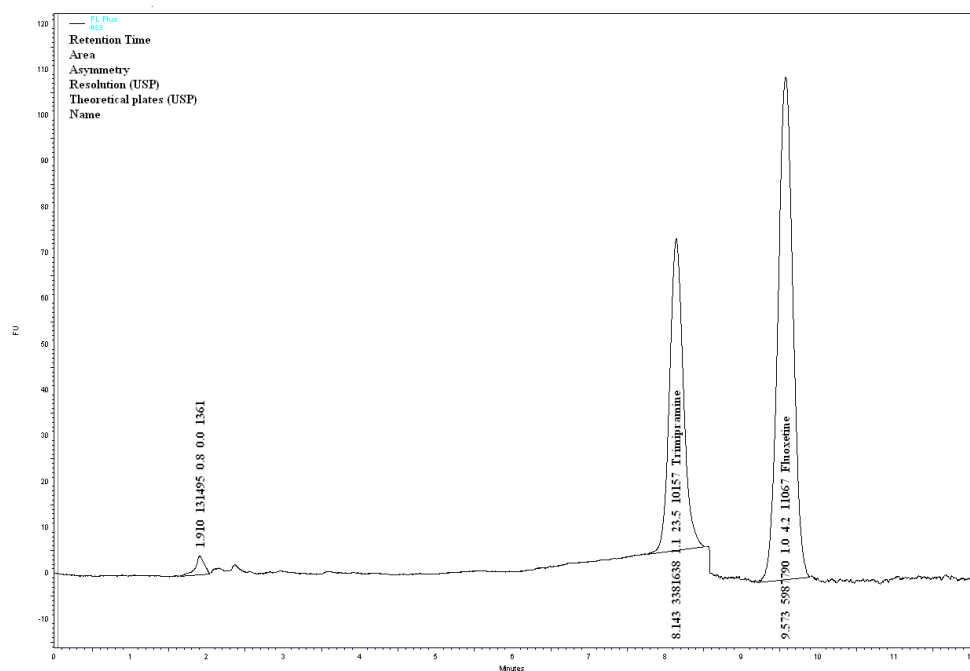


Figura 57. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 500 ng fluoxetină/mL – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

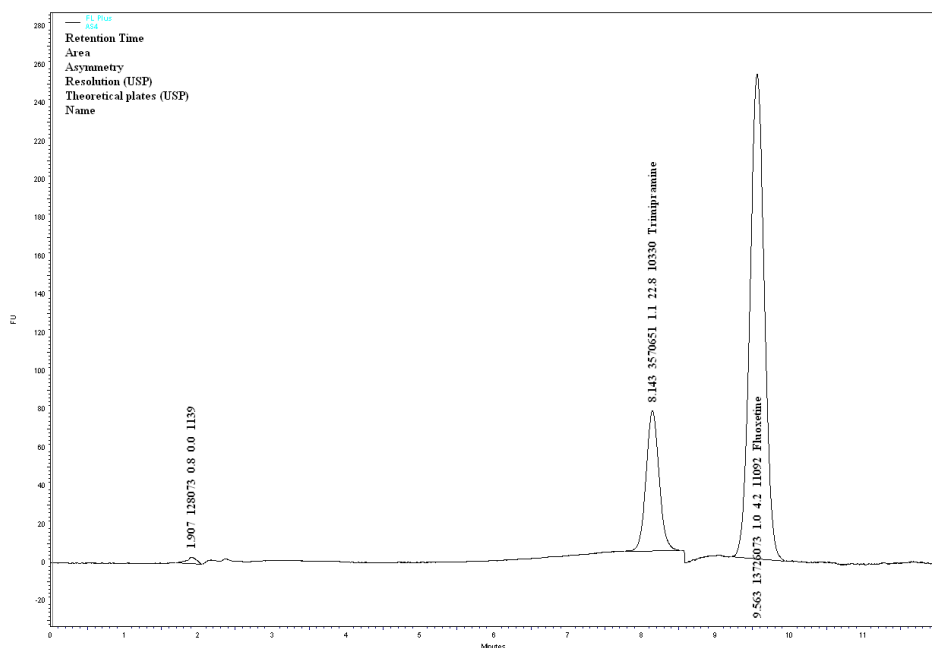


Figura 58. Cromatogramă reprezentativă pentru soluția de acuratețe/precizie de concentrația 1000 ng fluoxetină/mL – metoda de dozare a fluoxetinei utilizand ca standard intern trimipramina

3.3.2.4. Limita of cuantificare

S-au preparat diferite diluții din soluția stoc de fluoxetină pentru a obține un pic cu raportul semnal/zgomot de aproximativ 10. Concentrația astfel determinată (10 ng fluoxetină/mL) a fost confirmată prin testele de liniaritate, acuratețe și precizie.

Cromatograma reprezentativă - **Figura 55**.

3.3.3. Concluzii

Metoda de dozare a fluoxetinei din plasmă a fost dezvoltată ținând cont de proprietățile analiților, de necesitatea unui timp scurt de analiză și de obținerea unor indici de performanță cromatografici cu valori adecvate. S-a determinat astfel că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică Hypersil Gold, 150x4.6 mm, 5 μ m cu faza mobilă formată din soluție tampon fosfat de trietilamoniu pH 2,4 și acetonitril în proporția 65:35 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 25°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 12 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu n-hexan și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – trimipramina.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,01 μ g/mL (10 ng/mL) și 1 μ g/mL (1000 ng/mL), interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă. Specificitatea sporită a metodei este datorată metodei de detecție prin fluorescență, lungimile de undă fiind specifice pentru analiții de interes.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C, compoziția fazei mobile soluție tampon:acetonitril între 66:34 (v/v) și 64:36 (v/v) și pH-ul soluției tampon între 2,24 și 2,34.

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (12 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapid.

Metoda poate fi aplicată așadar pentru monitorizarea terapeutică, studii de farmacocinetică sau studii clinice.

4. Analiza unor probe de plasmă provenite de la pacienți tratați cu carbamazepină de la Spitalul de Psihiatrie "Sfânta Maria" Vedeia

Pentru aceste evaluări s-a utilizat metoda de dozare a carbamazepinei din plasmă utilizând trimipramina ca standard intern.

Date referitoare la pacienții testați se regăsesc în **Tabelul 6**, **Tabelul 7** și **Tabelul 8**.

Tabelul 6. Date referitoare la pacienții de la Spitalul de Psihiatrie "Sfânta Maria" Vedeia

Pacient	Vârstă	Sex	Diagnostic	Doză Carbamazepina (200 mg/administrare) D+P+S
1	45	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
2	50	M	SP	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)
3	47	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
4	31	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
5	29	M	SP	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)
6	27	M	RMS	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
7	49	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
8	56	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
9	61	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
10	67	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
11	63	M	RMS/TC	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
12	42	M	RM	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
13	42	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
14	58	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
15	47	F	RM	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)
16	56	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
17	45	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
18	61	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
19	34	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
20	47	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
21	47	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
22	77	F	SP	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)

Pacient	Vârstă	Sex	Diagnostic	Doză Carbamazepina (200 mg/administrare) D+P+S
23	64	M	TOP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
24	60	M	TOP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
25	57	M	TOP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
26	64	M	TOP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
27	50	M	Demență	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)
28	38	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
29	44	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
30	58	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
31	43	M	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
32	39	F	RM	0,5 + 0,5 + 1 (400 mg/zi)
33	42	M	SP	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)
34	50	F	SP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
35	59	F	SP	0 + 0 + 1 (200 mg/zi)
36	45	M	TOP	1 + 0 + 1 (400 mg/zi)
37	46	M	SP	1 + 1 + 1 (600 mg/zi)

SP – schizofrenie paranoida

RM(S) – retard mintal (sever)

TC – tulburare de comportament

TOP – tulburare organică de personalitate

Tabelul 7. Rezultate obținute pentru pacienții testați (1-27)

Pacient	Carbamazepină, µg/mL				
	03-04.04.2017	10-11.04.2017	18.04.2017	02.05.2017	09.05.2017
1	5,9	10,3	-	6,9	3,7
2	7,8	15,2	-	10,3	11,2
3	6,2	13,9	-	6,8	5,8
4	7,7	11,8	-	8,6	11,5
5	8,6	11,5	-	8,6	9,1
6	8,3	8,6	-	6,2	6,2
7	6,1	7,7	-	7,1	6,8
8	10,4	11,2	-	7,3	6,1
9	8,7	12,0	-	8,1	8,6
10	6,9	9,7	-	7,8	9,1
11	8,4	15,3	-	10,6	5,7
12	10,3	13,2	-	8,8	13,6
13	5,5	8,2	-	6,0	6,8
14	8,7	12,0	-	9,2	9,0
15	6,0	11,7	-	8,7	4,9

Pacient	Carbamazepină, µg/mL				
	03-04.04.2017	10-11.04.2017	18.04.2017	02.05.2017	09.05.2017
16	5,1	8,8	-	5,6	6,1
17	11,8	13,3	-	10,9	9,4
18	4,4	10,1	-	6,2	8,4
19	7,4	11,5	-	5,2	5,2
20	8,5	11,3	-	7,5	8,6
21	4,4	6,5	-	0,8	3,5
22	7,7	-	-	-	-
23	-	12,3	7,7	-	-
24	-	5,3	-	-	-
25	-	10,3	-	-	-
26	-	7,5	9,4	-	-
27	-	10,8	13,4	-	-

Tabelul 8. Rezultate obținute pentru pacienții testați (28-37)

Pacient	Carbamazepină, µg/mL	
	25.05.2017	01.06.2017
28	7,9	7,2
29	5,4	6,6
30	7,0	7,2
31	8,1	7,5
32	6,3	7,2
33	5,0	5,1
34	9,0	6,7
35	5,3	5,3
36	7,4	7,5
37	4,3	4,9

Probele au fost prelevate de la diferiți pacienți la mai multe intervale de timp conform protocolului agreed. Au existat condiții datorită cărora nu s-a putut preleva proba de sânge. Reprezentarea grafică a variației concentrației plasmatice a pacienților în funcție de timp este prezentată în **Figura 59**, **Figura 60** și **Figura 61**. Cromatograme reprezentative sunt prezentate în **Figura 62**, **Figura 63**, **Figura 64** și **Figura 65**

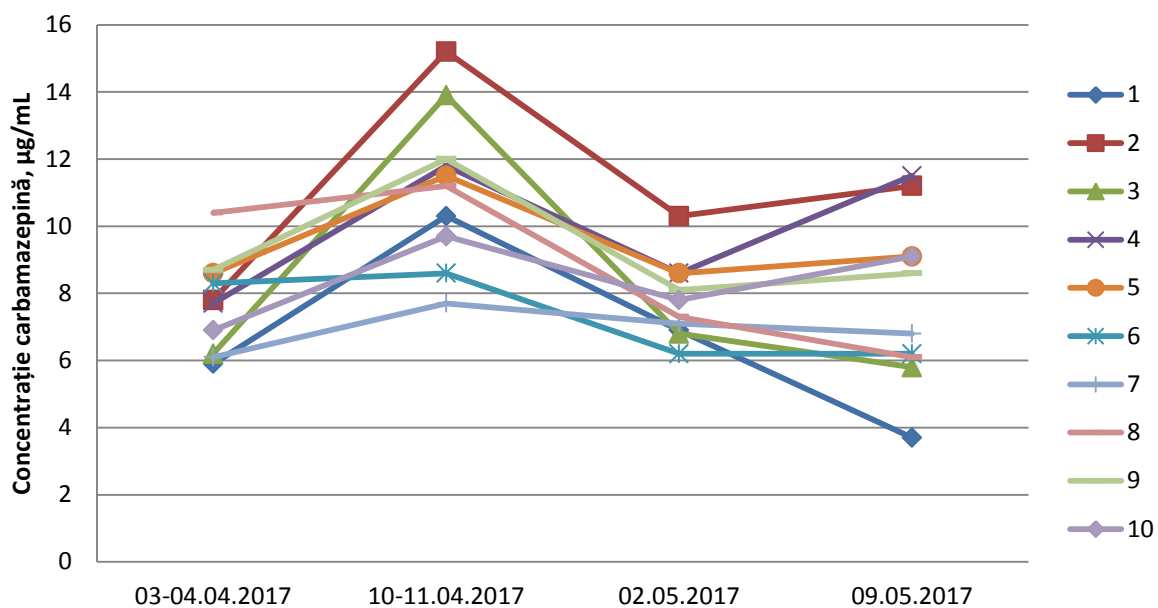


Figura 59. Variația concentrației plasmatice în timp pentru pacienții 1-10

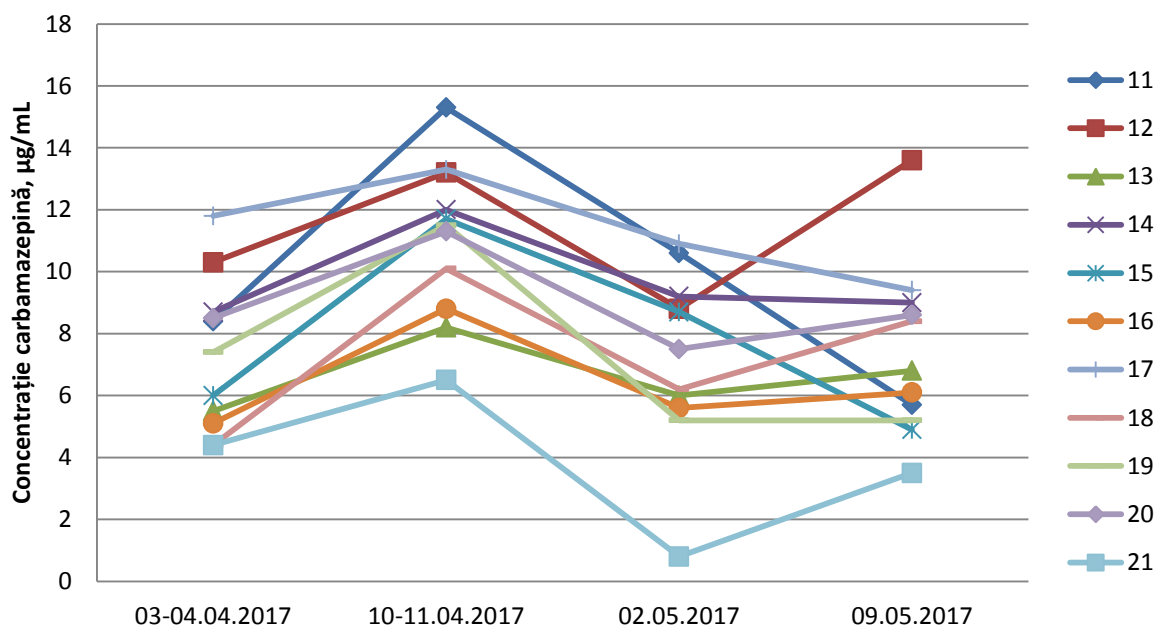


Figura 60. Variația concentrației plasmatice în timp pentru pacienții 11-21

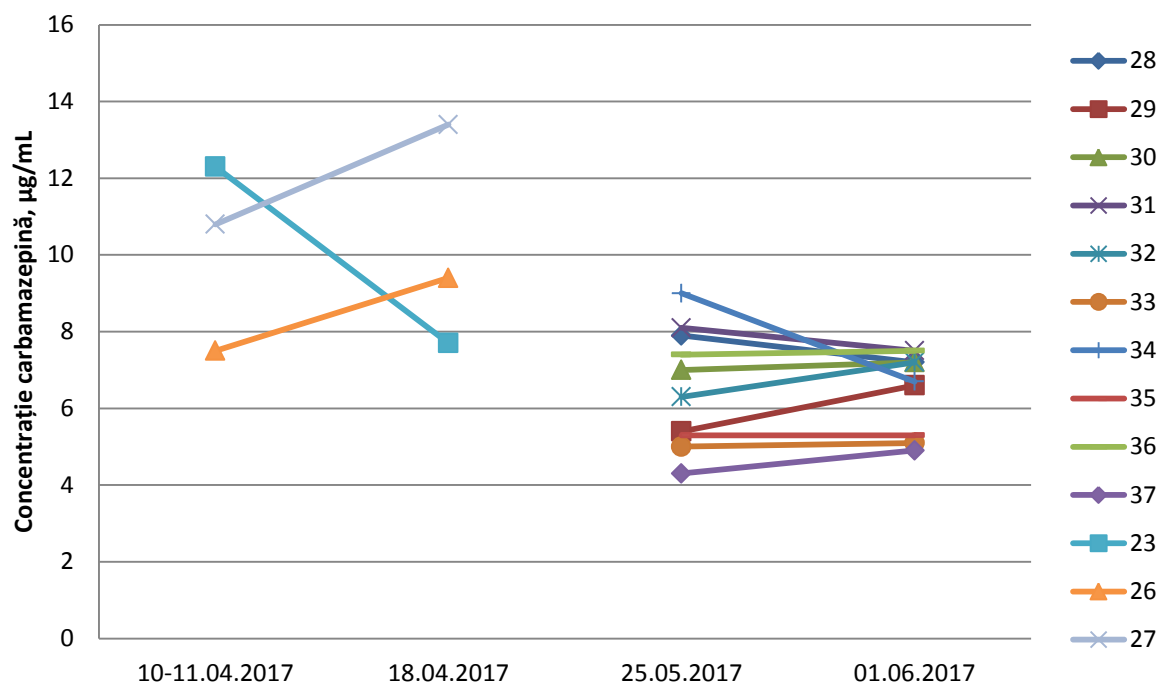


Figura 61. Variația concentrației plasmatice în timp pentru pacienții 23 și 26-37

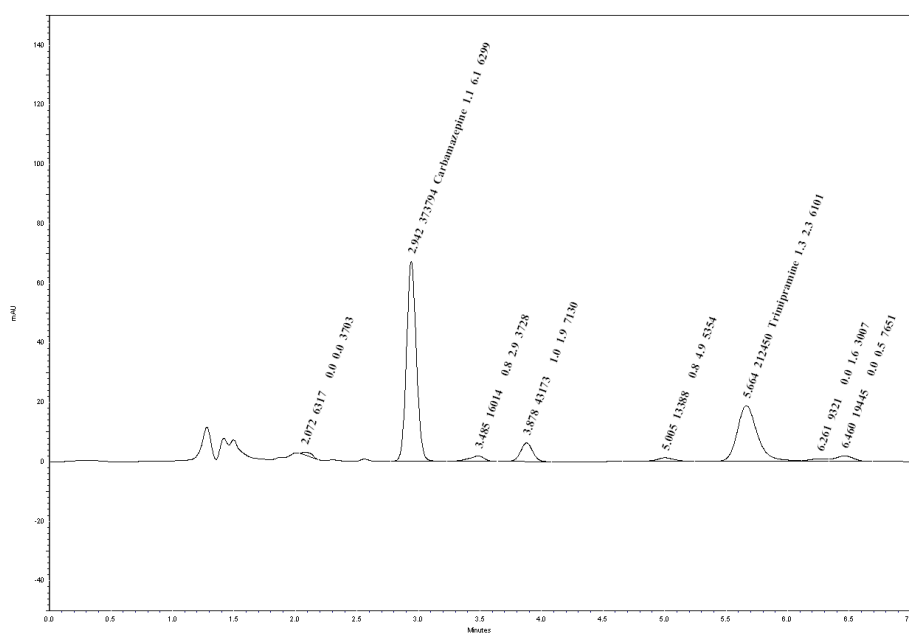


Figura 62. Cromatogramă obținută pentru determinarea carbamazepinei din plasma umană, utilizând ca standard intern trimipramina – pacientul 1 – 03.04.2017

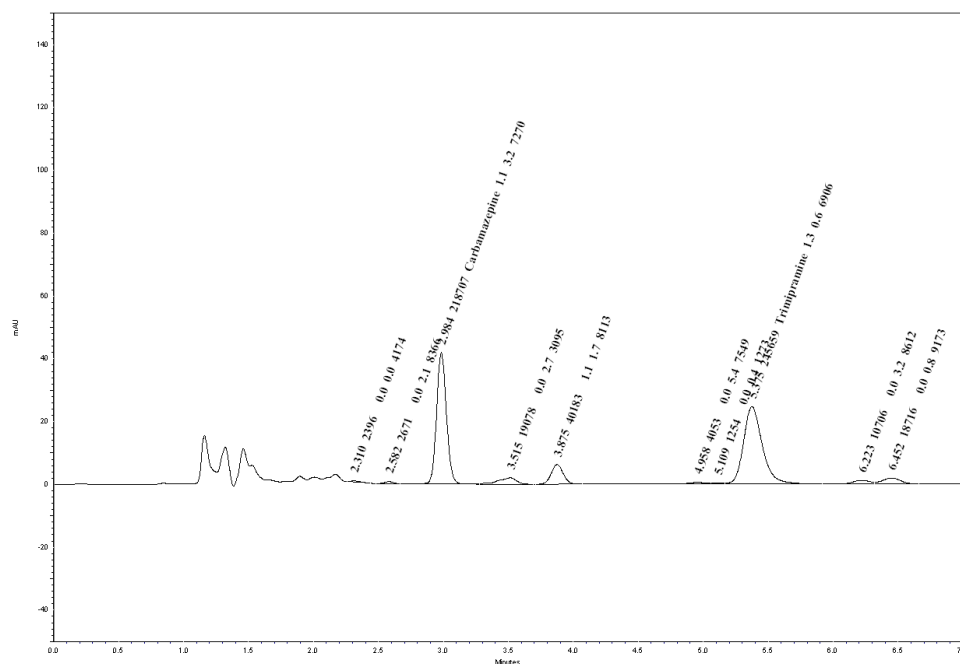


Figura 63. Cromatogramă obținută pentru determinarea carbamazepinei din plasma umană, utilizând ca standard intern trimipramina – pacientul 1 – 09.05.2017

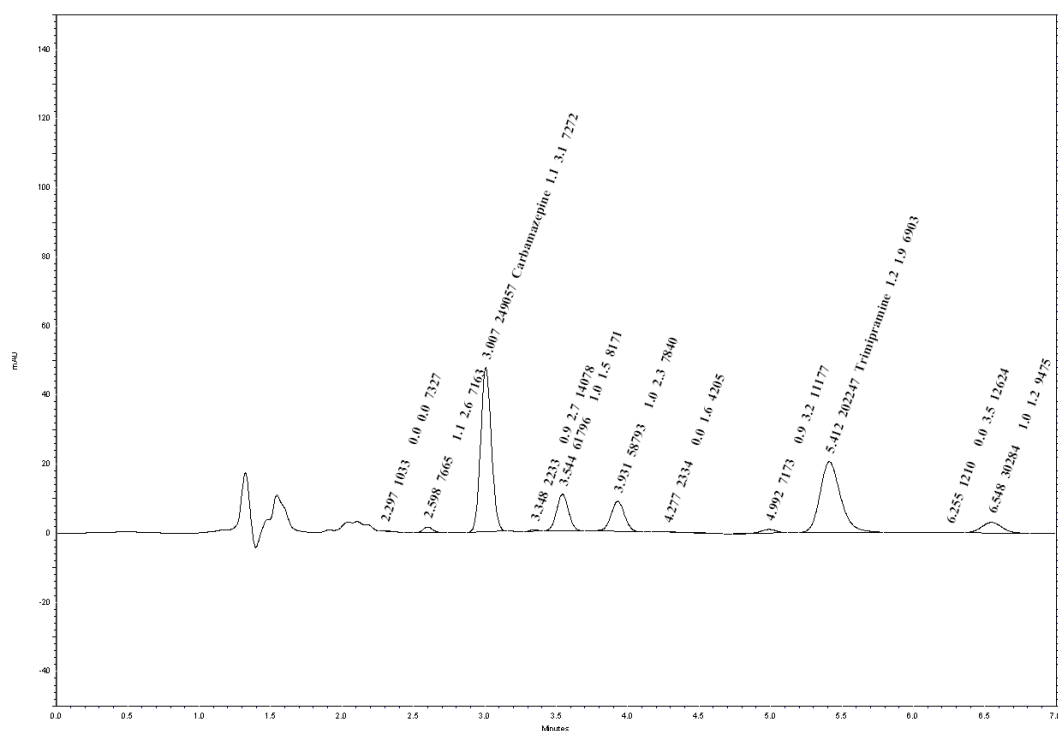


Figura 64. Cromatogramă obținută pentru determinarea carbamazepinei din plasma umană, utilizând ca standard intern trimipramina – pacientul 33 – 25.05.2017

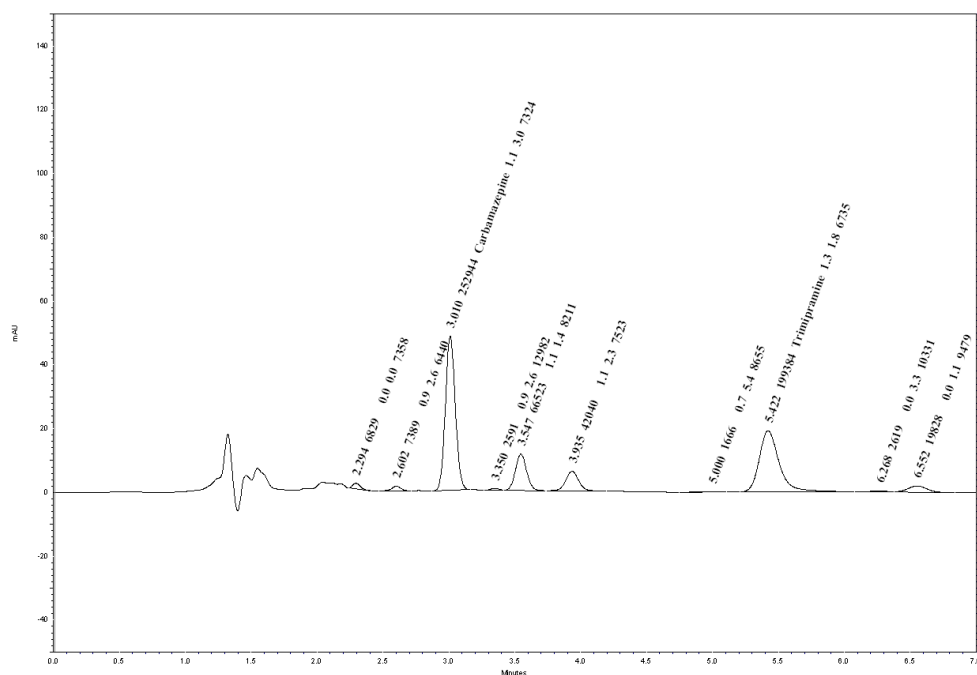


Figura 65. Cromatogramă obținută pentru determinarea carbamazepinei din plasma umană, utilizând ca standard intern trimipramina – pacientul 33 – 01.06.2017

4.1. Concluzii

Datele disponibile arată că majoritatea valorilor sunt cuprinse între 4 și 12 $\mu\text{g/mL}$, adică în intervalul terapeutic, cu 6 valori peste 12 $\mu\text{g/mL}$ și 3 valori sub 4 $\mu\text{g/mL}$, din totalul de 115 determinări.

Este demonstrată așadar aplicabilitatea metodei analitice pentru determinarea carbamazepinei din plasmă utilizând trimipramina ca standard intern pentru analizarea probelor de la pacienți, în vederea monitorizării terapeutice.

Studiul privind determinarea concentrațiilor plasmatice ale carbamazepinei arată atât o variabilitate individuală semnificativă, cât și intraindividuală. Concentrațiile plasmatice variază independent de doză. Nu se poate realiza o corelare clară între doză, sex, vârstă sau schemă de tratament. Se poate constata însă că pacienții primesc dozele corespunzătoare, iar puținele cazuri în care sunt observate ieșiri din concentrațiile plasmatice terapeutice nu sunt semnificative.

Existența unei variabilități individuale semnificative precum și lipsa corelării cu doza evidențiază importanța monitorizării terapiei prin determinarea concentrațiilor plasmatice ale medicamentului, pentru reducerea incidenței și gravității efectelor toxice.

5. Concluziile generale

În această lucrare am abordat o temă de importanță semnificativă pentru conceptul de individualizare a terapiei și anume monitorizarea terapeutică prin dezvoltarea și validarea a trei metode de dozare din plasmă a unor compuși care se pretează unei astfel de practici.

Așadar în Capitolul 3 am dezvoltat o metodă de dozare a carbamazepinei din plasmă cu un timp scurt de analiză și cu obținerea unor indici de performanță cromatografici cu valori adecvate.

S-a determinat astfel că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică BDS Hypersil C18, 125*4.6 mm, 5 μ m cu faza mobilă formată din apă și acetonitril în proporția 55:45 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 22°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 5 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu acetat de etil și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – nitrazepamul.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,1 μ g/mL și 20 μ g/mL, interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C și compoziția fazei mobile apă:acetonitril între 50:50 (v/v) și 60:40 (v/v).

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (5 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapid.

În Capitolul 3.2 am prezentat dezvoltarea celei de-a doua metode de dozare a carbamazepinei din plasmă, utilizând alt standard intern. S-a determinat că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică BDS Hypersil C18, 125*4.6 mm, 5 μ m cu faza mobilă formată din soluție tampon fosfat de trietilamoniu pH 2,4 și acetonitril în proporția

60:40 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 25°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 7 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu acetat de etil și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – trimipramina.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,2 µg/mL și 20 µg/mL, interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C și compoziția fazei mobile apoase (soluția tampon): acetonitril între 62:38 (v/v) și 55:45 (v/v).

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (7 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapide.

Metoda poate fi aplicată așadar pentru monitorizarea terapeutică, studii de farmacocinetică sau studii clinice.

În Capitolul 3.3 **Eroare! Fără sursă de referință.** am prezentat dezvoltarea metodei de dozare a fluoxetinei din plasmă. S-a determinat astfel că analiza optimă se desfășoară utilizând coloana cromatografică Hypersil Gold, 150x4.6 mm, 5 µm cu faza mobilă formată din soluție tampon fosfat de trietilamoniu pH 2,4 și acetonitril în proporția 65:35 (v/v), eluție izocratică, temperatura de 25°C și debit de 1 mL/min. Timpul de analiză este de 12 minute.

Metoda de extracție optimă este extracția lichid-lichid cu n-hexan și alcalinizare cu amoniac 25%. Standardul intern ales este o substanță cu structură chimică similară carbamazepinei – trimipramina.

Metoda analitică astfel dezvoltată a fost validată cu succes, fiind îndeplinite toate criteriile de acceptabilitate.

Domeniul de concentrații în care metoda poate fi utilizată cu acuratețe și precizie adecvată este cuprins între 0,01 µg/mL (10 ng/mL) și 1 µg/mL (1000 ng/mL), interval ce cuprinde intervalul terapeutic.

Metoda este specifică, fără interferențe din plasmă. Specificitatea sporită a metodei este datorată metodei de detecție prin fluorescență, lungimile de undă fiind specifice pentru analiții de interes.

Robustețea metodei a fost demonstrată pentru variații obișnuite ale parametrilor de lucru astfel: debitul între 0,9 mL/min și 1,1 mL/min, temperatura de separare (din coloana cromatografică între 20°C și 30°C, compoziția fazei mobile soluție tampon: acetonitril între 66:34 (v/v) și 64:36 (v/v) și pH-ul soluției tampon între 2,24 și 2,34.

Soluțiile sunt stabile într-un interval rezonabil de timp fapt ce permite analiza ulterioară a probelor în cazul în care apar situații neprevăzute (oprirea echipamentului, erori de sistem etc.) sau dacă probele nu pot fi analizate imediat.

Metoda de analiză este scurtă (12 minute) permițând determinarea unui număr mare de probe într-un timp relativ scurt. Se pot obține astfel rezultate foarte rapide.

Metoda poate fi aplicată așadar pentru monitorizarea terapeutică, studii de farmacocinetică sau studii clinice.

Ulterior am urmărit testarea aplicabilității metodelor dezvoltate. Astfel am contactat un spital de psihiatrie și am obținut, în urma încheierii unui protocol de lucru, a unor probe de plasmă de la pacienți care urmează tratament cronic cu carbamazepină. În Capitolul 4 am prezentat rezultatele acestui studiu precum și o testare preliminară pe proba de plasmă obținută de la un pacient care urmează tratament cronic cu carbamazepină

Datele obținute în urma analizei probelor arată că majoritatea valorilor sunt cuprinse între 4 și 12 $\mu\text{g/mL}$, adică în intervalul terapeutic, cu 6 valori peste 12 $\mu\text{g/mL}$ și 3 valori sub 4 $\mu\text{g/mL}$, din totalul de 115 determinări.

Este demonstrată așadar aplicabilitatea metodei analitice pentru determinarea carbamazepinei din plasmă utilizând trimipramina ca standard intern pentru analizarea probelor de la pacienți, în vederea monitorizării terapeutice.

Studiul privind determinarea concentrațiilor plasmatice ale carbamazepinei arată atât o variabilitate interindividuală semnificativă, cât și intraindividuală. Concentrațiile plasmatice variază independent de doză. Nu se poate realiza o corelare clară între doză, sex, vârstă sau schemă de tratament. Se poate constata însă că pacienții primesc dozele corespunzătoare, iar puținele cazuri în care sunt observate ieșiri din concentrațiile plasmatice terapeutice nu sunt semnificative.

Existența unei variabilități individuale semnificative precum și lipsa corelării cu doza evidențiază importanța monitorizării terapiei prin determinarea concentrațiilor plasmatice ale medicamentului, pentru reducerea incidenței și gravității efectelor toxice.

Este demonstrată aşadar posibilitatea utilizării metodelor utilizate pentru dozarea acestor compuşi din plasmă. Metodele de dozare pot fi aplicate sau adaptate şi pentru alte probe biologice, dar utilizarea în acest sens trebuie precedată de validare analitică. Metodele pot fi aplicate cu succes în monitorizarea terapeutică dar pot fi utilizate în orice aplicaţii care necesită dozarea principiilor active din probe biologice (studii clinice, studii de farmacocinetică, etc.)

Lucrarea de faţă sustine, aşadar, atât din punct de vedere teoretic, cât şi practic, conceptul de individualizare şi monitorizare farmacocinetică a terapiei cu carbamazepină sau fluoxetină, fiind un punct de plecare în dezvoltarea unei metode care să determine în paralel, în cazul carbamazepinei, fracţia de carbamazepină legată de proteinele plasmatice şi fracţia liberă activă, precum şi nivelurile plasmatice al metaboliţilor activi, epoxidul (carbamazepină) sau norfluoxetina (fluoxetină).

Teza aduce o serie de contribuţii originale şi cu aplicabilitate practică. Acestea se referă la perfecţionarea şi diversificarea metodologiei de analiză toxicologică a carbamazepinei şi fluoxetinei.

6. Bibliografie

1. **FDA.** Prozac® - Highlights of Prescribing Information.
2. **Rossi, A., Barraco, A. şi Donda, P.** Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Annals of General Hospital Psychiatry*. 2004, Vol. 3, 2.
3. Rezumatul caracteristicilor produsului Rofluxin 20 mg.
4. **Suchard, Jeffrey R.** Fluoxetine Overdose-Induced Seizure. *West J Emerg Med*. 2008, Vol. 9, 3, pg. 154-156.
5. **Basalingappa, S.; Sharma, A.; Amarnath, S.** Basic Concepts of Therapeutic Drug Monitoring. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*. 2014, Vol. 5, 4, pg. 70-75.
6. **Moffat, Anthony C, Osselton, David M şi Widdop, Brian.** *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 4th edition*. 2011.
7. **Gross, Annette S.** Best practice in therapeutic drug monitoring. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2001, Vol. 52, pg. 5S-10S.
8. **Llorente Fernandez, E. ; Pares, L.; Ajuria, I.; Bandres, F; Castanyer B.; Campos, F; Farre, C.; Pou, L.; Queralto, J.M.; To-Figueras J.** State of the art in therapeutic drug monitoring. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2010, Vol. 48, 4, pg. 437-446.
9. **Oellerich, M.; Kanzow, P.; Walson, P.D.** Therapeutic drug monitoring – Key to personalized pharmacotherapy. *Clinical Biochemistry*. 2017, Vol. 50, pg. 375-379.
10. *Therapeutic Monitoring of Psychotropic Drugs - An Outline of the AGNP-TDM Expert Group Consensus Guideline.* **Baumann, P.; Hiemke, C.; Ulrich, S.; Gaertner, I.; Rao, M.L.; Eckermann, G.; Gerlach, M.;**

Kuss, H.-J.; Laux, G.; Muller-Oerlinghausen, B.; Riederer, P.; Zernig, G. 2, s.l. : Lippincott Williams and Wilkins, April 2004, Therapeutic Drug Monitoring, Vol. 26, pg. 167-170.

11. **Eltayeb, Sara A.I. și Ibrahim, Alnada A. M.** Therapeutic Drug Monitoring of Digoxin. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2015, Vol. 4, 6, pg. 96-111.

12. **Dasgupta A.** Clinical utility of free drug monitoring. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2002, Vol. 40, pg. 986-993.

13. **Chan, K.; Beran, R.G.** Value of therapeutic drug level monitoring and unbound (free) levels. *Seizure*. 2008, Vol. 17, pg. 572-575.

14. **Sproule, B.; Nava-Ocampo, A.A.; Kapur, B.** Measuring unbound versus total valproate concentrations for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006, Vol. 28, pg. 714-715.

15. **Sproule, B.; Nava-Ocampo, A.A.; Kapur, B.;** Measuring unbound versus total valproate concentrations for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006, Vol. 28, pg. 714-715.

16. **Boffito, M.; Back, D.J.; Blaschke, T.F.; Rowland, M.; Bertz, R.J.; Gerber, J.G.; Miller, V.** Protein binding in antiretroviral therapies. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2003, Vol. 19, pg. 825-835.

17. **Dasgupta A.** Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. *Clinical Chemistry Acta*. 2007, Vol. 377, pg. 1-13.

18. **Valdes, R. Jr; Jortani, SA; Gheorghide, M.** Standards of laboratory practice: cardiac drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. *Clinical Chemistry*. 1998, Vol. 44, pg. 1096-1109.

19. **George, S.; Braithwaite, R.A.; Hughes E.A.** Digoxin measurements following plasma ultrafiltration in two patients with digoxin toxicity treated with specific Fab fragments. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1994, Vol. 31, pg. 380-382.

20. **The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. Baumann, Pierre; Ulrich, Sven; Eckermann, Gabriel; Gerlach, Manfred; Kuss, Hans-Joachim; Laux, Gerd; Muller-Oerlinghausen, Bruno; Rao, Marie Luise; Rederer, Peter; Zerning, Gerald; Hiemke, Christoph.** 2005, Dialogues Clinical Neuroscience, pg. 231-247.

21. **Amitai, Y.; Kennedy, E.J.; DeSandre, P.; Frischer, H.** Distribution of amitriptyline and nortriptyline in blood: role of alpha-1-glycoprotein. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1993, Vol. 15, pg. 267-273.

22. **Dasgupta, A.; Yared, M.A.; Wells, A.** Time-dependent absorption of therapeutic drugs by the gel of the Greiner Vacuette blood collection tube. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2000, Vol. 22, pg. 427-431.

23. **Janknegt, R.; Lohman, J.J.; Hooymans, P.M.; Merkus, F.W.** Do evacuated blood collection tubes interfere with therapeutic drug monitoring? *Pharm Weekbl Sci*. 1983, Vol. 5, pg. 287-290.

24. **Karppi, J.; Akerman, K.K.; Parviainen, M.** Suitability of collection tubes with separator gels for collecting and storing blood samples for therapeutic drug monitoring (TDM). *Clinical Chemistry*. 2000, Vol. 38, pg. 313-320.

25. **Boeynaems, J.M.; De Leener, A.; Dessars, B.; Villa-Lobos, H.R.; Aubry, J.C.; Cotton, F.; Thiry, P.** Evaluation of a new generation of plastic evacuated blood-collection tubes in clinical chemistry, therapeutic drug monitoring, hormone and trace metal analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2004, Vol. 42, pg. 67-71.

26. **Warner, A.; Privitera, M.; Bates, D.** Standards of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. *Clinical chemistry*. 1998, Vol. 44, pg. 1086-1095.

27. **Godolphin, W.; Trepanier, J.; Farrell, K.** Serum and plasma for total and free anticonvulsant drug analyses: effects on EMIT assays and ultrafiltration devices. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1983, Vol. 5, pg. 319-323.
28. **Hammett-Stabler, C.A.; Dasgupta, A.** *Therapeutic drug monitoring data. A concise guide*. 2007.
29. **Shaw, L.M.; Nicholls, A.; Hale, M.; Armstrong, V.W.; Oellerich, M.; Yatscoff, R.; Morris, R.E.; Holt, D.W.; Venkataramanan, R.; Haley, J.; Halloran, P.; Ettenger, R.; Keown, P.; Morris, R.G.** Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clinical Biochemistry*. 1998, Vol. 31, pg. 317-322.
30. **Shaw, L.M.; Holt, D.W.; Oellerich, M.; Meiser, B.; van Gelder, T.** Current issues in therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: report of a roundtable discussion. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2001, Vol. 23, pg. 305-315.
31. **Mordasini, Mara R.; Krahenbuhl, Stephan; Schlenger, Raymond G.** Appropriateness of digoxin level monitoring. *Swiss Medical Weekly*. 2002, Vol. 132, pg. 506-512.
32. **Mann, K.; Hiemke, C.; Schmidt, L.G.; Bates, DW.** Appropriateness of therapeutic drug monitoring for antidepressants in routine psychiatric inpatient care. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006, Vol. 28, pg. 83-88.
33. **Hammett-Stabler, C.A.; Johns, T.** Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. National Academy of Clinical Biochemistry. *Clinical Chemistry*. 1998, Vol. 44, pg. 1129-1140.
34. **Linder, M.W.; Keck, P.E. Jr.** Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. National Academy of Clinical Biochemistry. *Clinical Chemistry*. 1998, Vol. 44, pg. 1073-1084.
35. **Levy, GA.** C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the neoral formulation. *Biodrugs*. 2001, Vol. 15, pg. 279-290.
36. **Langers, P.; Press, R.R.; den Hartigh, J.; Cremers, S.C.; Baranski, A.G.; Lamers, C.B.; Hommes, D.W.; van Hoek, B.** Flexible limited sampling model for monitoring tacrolimus in stable patients having undergone liver transplantation with samples 4 to 6 hours after dosing is superior to trough concentration. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2008, Vol. 30, pg. 456-461.
37. **van Gelder, T.; Le Meur, Y.; Shaw, L.M.; Oellerich, M.; DeNofrio, D.; Holt, C.; Holt, D.W.; Kaplan, B.; Kuypers, D.; Meiser, B.; Toenshoff, B.; Mamelok, R.D.** Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006, Vol. 28, pg. 145-154.
38. **Wallemacq, P.; Armstrong, V.W.; Brunet, M.; Haufroid, V.; Holt, D.W.; Johnston, A.; Kuypers, D.; Le Meur, Y.; Marquet, P.; Oellerich, M.; Thervet, E.; Toenshoff, B.; Undre, N.; Weber, L.T.; Westley, I.S.; Mourad, M.** Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2009, Vol. 31, pg. 139-152.
39. **Boffito, M.; Acosta, E.; Burger, D.; Fletcher, C.V.; Flexner, C.; Garaffo, R.; Gatti, G.; Kurowski, M.; Perno, C.F.; Peytavin, G.; Regazzi, M.; Back, D.** Current status and future prospects of therapeutic drug monitoring and applied clinical pharmacology in antiretroviral therapy. *Antiviral therapy*. 2005, Vol. 10, pg. 375-392.
40. **Preskorn, Sheldon H.; Dorey, R. Cameron și Jerkovich, George S.** Therapeutic Drug Monitoring of Tricyclic Antidepressants. *Clinical Chemistry*. 1988, Vol. 34, 5, pg. 822-828.
41. **Amsterdam, Jay D.; Fawcett, Jan; Quitkin, Frederic M.; Reimherr, Frederick; Rosenbaum, Jerrold F.; Michelson, David; Hornig-Rohan, Mady; Beasley, Charles M.** Fluoxetine and Norfluoxetine Plasma

Concentrations in Major Depression: A Multicenter Study. *American Journal of Psychiatry*. 1997, Vol. 154, 7, pg. 963-969.

42. **Lundmark , J, Reis, M și Bengtsson, F.** Serum concentrations of fluoxetine in the clinical treatment setting. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2001, Vol. 23, pg. 139-147.

43. **Hartter, S; Wetzel, H.; Hammes, E.; Torkzadeh, M.; Hiemke, C.** Serum concentrations of fluvoxamine and clinical effects. A prospective open clinical trial. *Pharmacopsychiatry*. 1998, Vol. 31, 5, pg. 199-200.

44. **Sharpe, P.C.; Morrow, J.; Trimble, E.R.** An audit of therapeutic drug monitoring of anticonvulsants. *The Ulster Medical Journal*. 1995, Vol. 64, 2, pg. 151-156.

45. Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009, Vol. 101, pg. 1543-1552.

46. **Bârcă, Maria; Ilie, Mihaela; Baconi, Daniela Luiza; Ciobanu, Anne-Marie; Bălălaşu, Dan; Burcea, George T.** Spectrofluorimetric Methotrexate Assay in Human Plasma. *Farmacia*. 2010, Vol. 58, 1, pg. 95-101.

47. **Meesters, Roland J.W., și alții, și alții.** A new ultrafast and high-throughput mass spectrometric approach for the therapeutic drug monitoring of the multi-targeted anti-folate pemetrexed in plasma from lung cancer patients. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2010, Vol. 398, pg. 2943-2948.

48. **Sartorius N, Baghai TC, Baldwin DS, Barrett B, Brand U, Fleischhacker W, Goodwin G, Grunze H, Knapp M, Leonard BE, Lieberman J, Nakane Y, Pinder RM, Schatzberg AF, Svestka J, Baumann P, Ghalib K, Markowitz JC, Padberg F, Fink M, Furukawa T, Fountoulakis KN.** Antidepressant medications and other treatments of depressive disorders: a CINP Task Force report based on a review of evidence. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2007, Vol. 10 (Suppl 1), pg. S1-207.

49. **World Health Organization.** *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Geneva, Switzerland : s.n., 1992.

50. **Cipriani A, Barbui C, Brambilla P, Furukawa TA, Hotopf M, Geddes JR.** Are all antidepressants really the same? The case of Fluoxetine: a systematic review. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2006, Vol. 67, pg. 850-864.

51. **Anderson, I.M.** Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *Journal of Affective Disorders*. 2000, Vol. 58, pg. 19-36.

52. **Bauer M, Bschor T, Pfennig A, Whybrow PC, Angst J, Versiani M, Möller HJ.** World federation of societies of biological psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders in primary care. *World Journal of Biological Psychiatry*. 2007, Vol. 8, pg. 67-104.

53. **Karasu TB, Gelenberg A, Merriam A, Wang P.** Practice guideline for the treatment of patients with major depressive disorder (revision). American Psychiatric Association. *The American Journal of Psychiatry*. 2000, Vol. 157, pg. 1-45.

54. **Baghai TC, Blier P, Baldwin DS, Bauer M, Goodwin GM, Fountoulakis KN, Kasper S, Leonard BE, Malt UF, Stein D, Versiani M, Möller H-J.** General and comparative efficacy and effectiveness of antidepressants in the acute treatment of depressive disorders: a report by WPA section of pharmacopsychiatry. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2011, Vol. 261 (suppl 3), pg. S207-S245.

55. **Parker, G.** Defining melancholia: the primacy of psychomotor disturbance. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2007, Vol. 433, pg. 21-30.

56. **Fink m, Taylor MA.** Resurrecting melancholia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2007, Vol. 115, pg. 14-20.

57. **Cristea, Aurelia Nicoleta.** *Tratat de Farmacologie*. Ediția I. București : Editura Medicală, 2009. ISBN (10) 973-39-0590-9.
58. **Baghai TC, Möller H-J, Rupprecht R.** Recent progress in pharmacological and non-pharmacological treatment options of major depression. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, Vol. 12, pg. 503-515.
59. **Montgomery, S.A.** New developments in the treatment of depression. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1999, Vol. 60(suppl 14), pg. 10-15.
60. **Baldwin D, Broich K, Fritze J, Kasper S, Westenberg H, Möller HJ.** Placebo-controlled studies in depression: necessary, ethical and feasible. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2003, Vol. 253, pg. 22-28.
61. **Montgomery SA, Asberg M.** A new depression scale designed to be sensitive to change. *The British Journal of Psychiatry*. 1979, Vol. 134, pg. 382-389.
62. **Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Geddes JR, Higgins JP, Churchill R, Watanabe N, Nakagawa A, Omori IM, McGuire H, Tansella M, Barbui C.** Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 2009, Vol. 373, pg. 746-758.
63. **Angst J, Angst F, Gerber-Werder R, Gamma A.** Suicide in 406 mood-disorder patients with and without long-term medication: a 40 to 44 years' follow-up. *Archives of Suicide Research*. 2005, Vol. 9, pg. 279-300.
64. **Healy D, Whitaker C.** Antidepressants and suicide: risk-benefit conundrums. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2003, Vol. 28, pg. 331-337.
65. **Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.** *Martindale - The complete drug reference*. [ed.] Sean C Sweetman. 36th. London/Chicago : Pharmaceutical Press, 2009. ISBN 978 0 85369 840 1.
66. **Gastaut, H; Caveness, W.F.; Landolt, W.; Lorentz de Haas, A.M.; McNaughton, F.L.; Magnus, O.; Merlis, J.K.; Pond, D.A.; Radermecker, J.; Storm van Leeuwen, W.** A proposed international classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1964, Vol. 5, pg. 297-306.
67. **Gastaut, H.** Clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1970, Vol. 11, p. 102.
68. **Falco-Walter, Jessica J.; Scheffer, Ingrid E.; Fisher, Robert S.** The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy research*. 2018, Vol. 139, pg. 73-78.
69. **ILAE (International League Against Epilepsy) Commission on Classification and Terminology.** Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981, Vol. 22, pg. 489-501.
70. —. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. 1985, Vol. 26, pg. 268-278.
71. —. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*. Vol. 30, 4, pg. 389-399.
72. **Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D.R., Puccia, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., Zuberi, S.M.** ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and terminology. *Epilepsia*. 2017, Vol. 58, pg. 512-521.
73. **Pohlmann-Eden, B.; Beghi, E.; Camfield, C.** The first seizure and its management in adults and children. *British Medical Journal*. 2006, Vol. 332, pg. 339-342.

74. **Sirven, Joseph I.** Antiepileptic Drug Therapy for Adults: When to Initiate and How to Choose. *Mayo Clinic Proceedings*. 2002, Vol. 77, 12, pg. 1367-1375.
75. **Lenox RH, Frazer A.** Mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. 2002, pg. 1139-1164.
76. **Thomas L Lemke PhD, David A Williams PhD.** *Foye's principles of medicinal chemistry*. New York : The point, 2007.
77. **Preskorn, S.H.** Clinical pharmacology of SSRIs. [Interactiv] [Citat: 3 august 2004.] <http://www.prekorn.com>.
78. **Brosen K, Rasmussen BB.** Selective serotonin reuptake inhibitors: pharmacokinetics and drug interactions. In: Feighner JP, Boyer WR. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*. 2nd, 1996, pg. 87-108.
79. **Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Mayle DA, Krushinski JH, Robertson DW.** Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 1993, Vol. 8, pg. 337-344.
80. **Bertelsen KM, Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Obach RS, Greenblatt DJ.** Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 in vitro by paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003, Vol. 31, pg. 289-293.
81. **CM, Beasley.** Fluoxetine and suicide: a meta-analysis of controlled trials of treatment for depression. *BMJ*. 1991, Vol. 303, pg. 685-92.
82. **Fergusson, D.** Association between suicide attempts and selective serotonin reuptake inhibitors; systematic review of randomised controlled trials. *BMJ*. 2005, Vol. 330, p. 330.
83. European Medicines Agency. European Medicines Agency finalises review of antidepressants in children and adolescents. [Interactiv] 25 April 2005. <http://emea.eu>.
84. **Linder, Mark W. și Keck, Jr., Paul E.** Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clinical Chemistry*. 1998, Vol. 44, 5, pg. 1073-1084.
85. **Orsulak, Paul J.; Haven, Mary C.; Burton, Michael E.; Akers, Linda C.** Issues in Methodology and Applications for Therapeutic Monitoring of Antidepressant Drugs. *Clinical Chemistry*. 1989, Vol. 35, 7, pg. 1318-1325.
86. **Dorrity, Jr., Floyd, Linnolla, Markku și Habig, Robert L.** Therapeutic Monitoring of Tricyclic Antidepressants in Plasma by Gas Chromatography. *Clinical Chemistry*. 1977, Vol. 23, 7, pg. 1326-1328.
87. **Rasmussen, BB și Brosen, K.** Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors? *Therapeutic Drug Monitoring*. 200, Vol. 22, pg. 143-154.
88. **Hiemke, Christoph; Härtter, Sebastian ;.** Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000, Vol. 85, pg. 11-28.
89. **Bălălaşu, Dan; Baconi, Daniela;.** *Toxicologia substanțelor medicamentoase de sinteză*. București : Tehnoplast, 2005. ISBN 973-87567-3-1.
90. **Patsalos, Philip N.; Berry, David J.; Bourgeois, Blaise F.D.; Cloyd, James C.; Glauser, Tracy A.; Johannessen, Svein I.; Leppik, Ilo E.; Tomson, Torbjorn; Perucca, Emilio.** Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2008, Vol. 49, 7, pg. 1239-1276.

91. **Chan, KK; Sawchuk, RJ; Thompson, TA; Redalieu, E; Wagner, WE; LeSher, AR; Weeks, BJ; Hall, NR; Gerardin, A.** Bioequivalence of carbamazepine chewable and conventional tablets: Single-dose and steady state studies. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1985, Vol. 74, pg. 866-870.
92. **Graves, NM; Kriel, RL; Jones-Saete C.; Cloyd, JC.** Relative bioavailability of rectally administered carbamazepine suspension in humans. *Epilepsia*. 1985, Vol. 26, pg. 429-433.
93. **Maas B, Garnett WR, Pellock JM, Comstock TJ.** A comparative bioavailability study of carbamazepine tablets and a chewable tablet formulation. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1987, Vol. 9, pg. 28-33.
94. A comparative pharmacokinetic study of conventional and chewable carbamazepine in epileptic patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1990, Vol. 29, pg. 574-577.
95. **Patsalos, Philip N. ; Spencer, Edgar P.; Berry, Dave J.** Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsy: A 2018 Update. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018.
96. **Kudriakova TB, Sirota LA, Rozova GI, Gorkov VA.** Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1992, Vol. 33, pg. 611-615.
97. **Cloyd JC, Lackner TE, Leppik IE.** Antiepileptics in the elderly. Pharmacoepidemiology and pharmacokinetics. *Archives of Family Medicines*. 1994, Vol. 3, pg. 589-598.
98. **Battino D, Croci D, Rossini A, Messina S, Mamoli D, Perucca E.** Serum carbamazepine concentrations in elderly patients: a case-matched pharmacokinetic evaluation based on therapeutic drug monitoring data. *Epilepsia*. 2003, Vol. 44, pg. 923-929.
99. **Graves NM, Brundage RC, Wen Y, Cascino G, So E, Ahman P, Rarick J, Krause S, Leppik IE.** Population pharmacokinetics of carbamazepine in adults with epilepsy. *Pharmacotherapy*. 1998, Vol. 18, pg. 273-281.
100. **Albani, F.; Riva, R.; Baruzzi, A.** Carbamazepine Clinical Pharmacology: A Review. *Pharmacopsychiatry*. 1995, Vol. 28, pg. 235-244.
101. Labs drug levels. *GlobalRPh - The clinician's ultimate reference*. [Interactiv] [Citat: 07 12 2014.] http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm.
102. **Aramă, Corina Cristina; Nedelcu, Angela; Neagu, Alexandra Filareta; Constantinescu, Clementina; Florea, Marinela.** *Analiză instrumentală și metode de separare. Principii. Aplicații practice*. București : Editura Universitară "Carol Davila", 2014.
103. **Bakshi, Monica; Singh, Saranji.** Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, Vol. 28, pg. 1011-1040.
104. **USP 41–NF 36.** *USP Monograph Betadex Sulfobutyl Ether Sodium*.
105. **Yusuf, Ahmed; Alvi, Syed N.; Hammami, Muhammad M.** Rapid Determination of Methotrexate Level in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, Vol. 3, 10, pg. 125-135.
106. **Ranetti, Maria-Cristina; Ionescu, Mihaela; Hinescu, Lavinia; Ionică, Elena; Anuță, Valentina; Ranetti, Aurelian E.; Stecoza, Camelia Elena; Mircioiu, Constantin.** Validation of a HPLC Method for the Simultaneous Analysis of Metformin and Gliclazide in Human Plasma. *Farmacia*. 2009, Vol. 57, 6, pg. 728-735.
107. **Georgiță, Cristina; Sora, Iulia; Albu, Florin; Monciu, Crina Maria.** Comparison of a LC/MS Method with a LC/UV Method for the Determination of Metformin in Plasma Samples. *Farmacia*. 2010, Vol. 58, 2, pg. 158-169.

108. **Kiss, Bela, Bogdan, Cătălina și Loghin, Felicia.** Ultra Performance Liquid Chromatography Analysis of Flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in Human Plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related technologies*. 2010, Vol. 33, 14, pg. 1381-1392.
109. **Farthing, D.; Xi, L.; Gehr, L.; Sica, D.; Larus, T.; Karnes, H.T.** High-performance liquid chromatography (HPLC) determination of inosine, a potential biomarker for initial cardiac ischaemia, using isolated mouse hearts. *Biomarkers*. 2006, Vol. 11, 5, pg. 449-459.
110. Multi-residue pesticides analysis in water samples using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *MethodsX*. 2018, Vol. 5, pg. 744-751.
111. **Saad, Bahruddin; Sing, Yong Yek; Nawi, Mohd Asri; Hashim, NoorHasani; Ali, Abdussalam Salhin Mohamed; Saleh, Muhammad Idiris; Sulaiman, Shaida Fariza; Md Talib, Khairuddin; Ahmad, Kamarudzaman.** Simultaneous determination of five antioxidants in food by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007, Vol. 105, 1, pg. 389-394.
112. **Gocan, Simion.** *Cromatografia de înaltă performanță*. Cluj-Napoca : Risoprint, 2002. 973-656-203-4.
113. **Giaginis, Costas; Tsantili-Kakoulidou, Anna;.** Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2008, Vol. 31, pg. 79-96.
114. **Fuguet, Elisabet; Rafols, Clara; Bosch, Elisabeth; Roses, Marti;.** Determination of the chromatographic hydrophobicity index for ionisable solutes. *Journal of Chromatography A*. 2007, Vol. 1173, 1, pg. 110-119.
115. **Kaliszan, Roman; Haber, Piotr; Baczek, Tomasz; Siluk, Danuta;.** Gradient HPLC in the determination of drug lipophilicity and acidity. *Pure and Applied Chemistry*. 2001, Vol. 73, 9, pg. 1465-1475.
116. **Kaliszan, Roman; Haber, Piotr; Baczek, Tomasz; Siluk, Danuta; Valko, Klara;.** Lipophilicity and pKa estimates from gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002, Vol. 965, 1, pg. 117-127.
117. **Butler, W. Ray și Guthertz, Linda S.** Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacterium Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, Vol. 14, 4, pg. 704-726.
118. **Vlăsceanu, Ana-Maria; Olaru, Octavian Tudorel; Tuchilă, Cristian; Nițulescu, George Mihai; Baconi, Daniela.** Development of a HPLC-DAD method to evaluate the bioaccumulation of nicotine and cotinine by *Daphnia magna*. *Toxicologi Letters*. Vol. 258, p. S67.
119. **Drăghici, Ioana; Aramă, Corina; Nedelcu, Angela; Monciu, Crina-Maria; Stănescu, Mihai; Tuchilă, Cristian.** Development of a New LC Method for the Identification, Separation and Assay of Simvastatin and Its Impurities. *Farmacia*. 2013, Vol. 61, 2, pg. 229-239.
120. **Sora, I.; Cristea, E.; Albu, F.; Udrescu, S.; David, V.; Medvedovici, A.** LC-MS/MS Assay of Quinapril and its Metabolite Quinaprilat for Drug bioequivalence Evaluation: Prospective, Concurrential and Retrospective Method Validation. *Bioanalysis*. 2009, Vol. 1, 1, pg. 71-86.
121. **Baconi, Daniela Luiza; Stan, Miriana; Ebrahim, Zainab Abdul Jalil; Tuchilă, Cristian; Bălălău, Cristian.** Determination of Tramadol in human plasma by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal of Mind and Medical Sciences*. 2016, Vol. 3, 1, pg. 55-64.

122. **Ganea, Raluca; Tuchilă, Cristian; Negrei, Carolina; Stan, Miriana; Vlăsceanu, Ana-Maria; Baconi, Daniela.** HPLC-FL method for fluoxetine quantification in human plasma. *Romanian Journal of Cognitive-Behavioral Therapy and Hypnosis*. 2015, Vol. 2, 4, pg. 20-30.
123. **USP 41–NF 36.** USP <621> Chromatography.
124. **David, Victor și Medvedovici, Andrei.** *Metode de separare și analiză cromatografică*. Bucuresti : Editura Universității București, 2008.
125. **EDQM.** *European Pharmacopeia - Chapter 2.2.46 Chromatographic Separation Techniques*.
126. **Bârcă, Maria Monica.** *Controlul medicamentului - Note de curs*.
127. **USP 41–NF 36.** USP <1225> Validation of Compendial Procedures.
128. **ICH.** Validation of Analytical Procedures: text and Methodology Q2(R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. [Interactiv] Noiembrie 2005.
129. **FDA.** Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. *FDA Guidances*. [Interactiv] Iulie 2015.
130. **EMA.** Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95). *EMA*. [Interactiv]
131. **FDA.** Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. *FDA Guidances*. [Interactiv] September 2013. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
132. **Roman, Liviu; Bojiță, Marius; Săndulescu, Robert; Muntean, Daniela Lucia.** *Validarea metodelor analitice*. București : Editura Medicală, 2007.
133. **Tuchilă, Cristian; Baconi, Daniela Luiza; Dinu Pîrvu, Cristina; Bălălaşu, Denisa O.; Vlăsceanu, Ana-Maria; Stan, Miriana; Bălălaşu, Cristian.** Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for Carbamazepine. *Journal of Mind and Medical Sciences*. 2016, Vol. 3, 1, pg. 100-114.
134. **Ezzeldin, Essam, Shahat, Abdelaaty A. și Basudan, Omer A.** Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Carbamazepine in Human Plasma. *Life Science Journal*. 2013, Vol. 10, 4, pg. 2159-2163.
135. **Vosough, Maryam, Ghafghazi, Shiva and Sabetkasaei, Masoumeh.** Chemometrics enhanced HPLC–DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples. *Talanta*. 2013, Vol. 119, pp. 17-23.
136. **Dordevic, Snezana, Kilibarda, Vesna și Stojanovic, Tomislav.** Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Vojnosanitetski Pregled*. 2009, Vol. 66, 5, pg. 347-352.
137. **Sener, E., et al., et al.** Determination of Carbamazepine and its Main Metabolite Carbamazepine-10,11-Epoxy in Rat Brain Microdialysate and Blood Using ESI–LC–MS (Ion Trap). *Chromatographia*. 2007, Vol. 66, pp. S31-S36.
138. **Sultana, Najma, Arayne, Muhammad Saeed și Ali, Saeeda Nadir.** An Ultra-Sensitive LC Method for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Carbamazepine, Losartan and Ciprofloxacin in Bulk Drug, Pharmaceutical Formulation and Human Serum by Programming the Detector. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013, Vol. 4, pg. 24-33.
139. **Patil, Sachin Ramrao; Kumar, Lokesh; Kohli, Gunjan; Bansal, Arvind Kumar.** Validated HPLC Method for Concurrent Determination of Antipyrine, Carbamazepine, Furosemide and Phenytoin and its

Application in Assessment of Drug Permeability through Caco-2 Cell Monolayers. *Scientia Pharmaceutica*. 2012, Vol. 80, pg. 89-100.

140. **Hu, Liandong, Liu, Yang și Cheng, Shan.** Simultaneous Determination of Six Analytes by HPLC-UV for High Throughput Analysis in Permeability Assessment. *Journal of Chromatographic Science*. February 2011, Vol. 49, pg. 124-128.

141. **Dzodic, P., et al., et al.** Development and validation of a solid phase extraction-HPLC method for the determination of carbamazepine and its metabolites, carbamazepine epoxide and carbamazepine trans-diol, in plasma. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012, Vol. 77, 0, pp. 1-21.

142. **Mashayekhi, Hossein Ali, et al., et al.** Rapid Determination of Carbamazepine in Human Urine, Plasma Samples and Water Using DLLME Followed by RP-LC. *Chromatographia*. 2010, Vol. 71, 5/6, pp. 517-521.

143. **Behbahani, Mohammad, et al., et al.** Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples. *Journal of Chromatography A*. 2013, Vol. 1308, pp. 25-31.

144. **Mihaly W, George; Phillips, Jenny A; Louis, William J.; Vajda, Frank J.** Measurement of Carbamazepine and Its Epoxide Metabolite by High-Performance Liquid Chromatography, and a Comparison of Assay Techniques for the Analysis of Carbamazepine. *Clinical Chemistry*. 1977, Vol. 23, 12, pg. 2283-2287.

145. **McMillin, Gwendolyn A.; Juenke, JoEtta M.; Tso, Gertie; Dasgupta, Amitava;.** Estimation of Carbamazepine and Carbamazepine-10,11-Epoxide Concentrations in Plasma Using Mathematical Equations Generated With Two Carbamazepine Immunoassays. *Clinical Chemistry*. 2010, Vol. 133, 5, pg. 729-736.

146. **Tonic – Ribarska, Jasmina, et al., et al.** Optimization and validation of bioanalytical SPE – HPLC method for the simultaneous determination of carbamazepine and its main metabolite, carbamazepine-10, 11-epoxide, in plasma. *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 2011, Vol. 57, 1-2, pp. 53-61.

147. **Demirkaya, Fatma și Kadioglu, Yucel.** Determination of Carbamazepine Using RP-HPLC Method in Pharmaceutical Preparations. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*. 2005, Vol. 30, pg. 78-82.

148. **Demirkaia, Fatma; Kadioglu, Yucel.** Determination of Carbamazepine in Pharmaceutical Preparations and Pure Forms Using HPLC-DAD, First Order- and Second Order- Derivative Spectrophotometric Methods.

149. **Mowafy, Hammam A., Alanazi, Fars K. și El Maghraby, Gamal M.** Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012, Vol. 20, pg. 29-34.

150. **Sanches, Cristina; Lopez, Karin V.; Omosako, Celia E.; Bertoline, Maria A.; Pereira, Maria D.; Santos, Silvia R.C.J.** Micromethod for Quantification of Carbamazepine, Phenobarbital and Phenytoin in Human Plasma by HPLC-UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring Application. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2008, Vol. 27, 4, pp. 485-491.

151. **Devandla, Adukondalu, Yamsani, Madhysudan Rao și Avinash.** UFLC Method Development for the Quantification of Carbamazepine in Blood Samples and an Application to Pharmacokinetic Study. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. June 2015, Vol. 4, 6, pg. 5039-5046.

152. **Devandla, Adukondalu și Yamasani, Madhusudan Rao.** Development and Validation of and UPLC Method for the Quantification of Carbamazepine in Intestinal Sac Samples. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*. 2015, Vol. 5, 1, pg. 145-152.

153. **Oh, Eun Kyung; Ban, Eunmi; Woo, Jong Soo; Kim, Chong-Kook.** Analysis of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2006, Vol. 386, pp. 1931-1936.
154. **Ferreira, Ana; Rodrigues, Marcio; Falcao, Amilcar; Alves, Gilberto.** HPLC–DAD Method for the Quantification of Carbamazepine, Oxcarbazepine and their Active Metabolites in HepaRG Cell Culture Samples. *Chromatographia*. 2016, Vol. 79, pp. 581-590.
155. **Tuchilă, Cristian; Baconi, Daniela.** Bioanalytical methods for determination of fluoxetine, an antidepressant, in biological fluids. *Romanian Journal of Cognitive-Behavioral Therapy and Hypnosis*. 2015, Vol. 2, 4, pg. 6-19.
156. **Unceta, N.; Barrondo, S.; Ruiz de Azua, I.; Gomez-Caballero, A.; Goicolea, M.A.; Salles, J.; Barrio, R.J.;** Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2007, Vol. 852, pg. 519-528.
157. **El-Rjoob, Abdul-Wahab; Tahtamouni, Munther; Tahboub, Yahya R.;** Simultaneous Analysis of Fluoxetine, Norfluoxetine, Citalopram, and Haloperidol in Plasma by LC–ESI-IT-MS. *Chromatographia*. 2010, Vol. 71, 5-6, pg. 423-430.
158. Fluoxetine. *Antidepressants facts*. [Interactiv] [Citat: 07 12 2014.] <http://www.antidepressantsfacts.com/fluoxetine3.htm>.
159. **Raggi, M.A.; Mandrioli, R.; Casamenti, G.; Volterra, V.; Desiderio, C.; Fanali S.;** Improved HPLC Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *Chromatographia*. 1999, Vol. 50, 7-8.
160. **Vlase, L.; Imre, S.; Leucuta, S.;** Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 2005, Vol. 66, pg. 659-663.
161. **Bueno, J.S., Silva, B. S. și Queiroz, M.E.C.** Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2011, Vol. 22, pg. 1221-1228.
162. **Freitas, D.F.; Dobrovolskin-Porto, C.E.; Pizzamiglio Vieira, E.; Bastos de Siqueira, M.E.;** Three phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography – fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, Vol. 51, pg. 170-177.
163. **Orsulak, P. J.; Kenney, J. T.; Crowley, G.; Wittman, P. D.;** Determination of the Antidepressant Fluoxetine and Its Metabolite Norfluoxetine in Serum by Reversed-Phase HPLC, with Ultraviolet Detection. *Clinical Chemistry*. 1988, Vol. 9, 34, pg. 1875-1878.
164. **El Maanni, A.; Combourieu, I.; Bonini, M.; Creppy, E. E.;** Fluoxetine, an Antidepressant, and Norfluoxetine, its Metabolite, Determined by HPLC with a C8 Column and Ultraviolet Detection. *Clinical Chemistry*. 1993, Vol. 39, 8, pg. 1749-1750.
165. **Higashi, Yasuhiko; Gao, Ranzhi; Fujii, Youichi;** Determination of Fluoxetine and Norfluoxetine in Human Serum and Urine by HPLC Using a Cholesterol Column with Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2009, Vol. 32, 8, pg. 1141-1151.
166. **Green, R.; Houghton, R.; Scarth, J.; Gregory, C.;** Determination of Fluoxetine and its Major Active Metabolite Norfluoxetine in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 2002, Vol. 55, Suppl, pg. S133-S136.

167. **Samanidou, Victoria F; Kourti, Paraskevi V;** Rapi HPLC method for the simultaneous monitoring of uloxetine, venlafazine, fluoxetine and paroxetine in biofluids. *Bioanalysis*. 2009, Vol. 1, 5, pg. 905-917.
168. **Acikkol, Munevver; Salkim, Dilek;** GC-MS analysis of fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine in human urine. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2010, Vol. 14, pg. 98-103.
169. **Tuchilă, Cristian; Baconi, Daniela Luiza; Anuță, Valentina; Dinu-Pîrvu, Cristina Elena; Vlăsceanu, Ana-Maria; Bălălău, Cristian; Constantin, Maria Magdalena; Stan, Miriana.** Development of a high performance chromatographic method for therapeutic drug monitoring of carbamazepine based on an experimental design approach. *Farmacia*. 2018, Vol. 66, 3, pg. 452-462.
170. **Tuchilă, Cristian; Bîlea, Enna Daniela; Baconi, Daniela.** Development of a simple HPLC method for determination of carbamazepine in human plasma with application in therapeutic drug monitoring. *Toxicology Letters*. 2015, Vol. 238, p. S149.
171. **Tuchilă, Cristian și Baconi, Daniela Luiza.** Development of two HPLC-UV methods for determination of carbamazepine in human plasma, with application in therapeutic drug monitoring. *National Romanian Pharmacy Conference 2016 - Poster presentation*.
172. **Tuchilă, Cristian; Baconi, Daniela; Ciobanu, Anne-Marie; Nițulescu, George Mihai.** Development of a HPLC-FL method for quantitation of fluoxetine in human plasma used for therapeutic drug monitoring. *Toxicology Letters*. Vol. 258, p. S106.
173. Drug Bank. www.drugbank.ca. [Interactiv]