UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA RAMŠAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA RAMŠAK

ANALIZA KARBAMAZEPINA, OKSKARBAZEPINA IN NJUNIH PRESNOVKOV V KRVNI PLAZMI S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI: RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE

DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE, OXCARBAZEPINE AND THEIR METABOLITES IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka.

Zahvala

Za mentorstvo, strokovno pomoč in vztrajnost se zahvaljujem izr. prof. dr. Tomažu Vovku. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Robertu Roškarju in dr. Danieli Miloseski, mag. farm. za vse strokovne nasvete in pomoč ter vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Posebna zahvala gre tudi moji družini in prijateljem za vso pomoč in podporo na moji študijski poti.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka.

Janja Ramšak

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek

Član diplomske komisije: doc. dr. Stane Pajk

Kazalo

1 Uvod 1

1.1 Epilepsija 1

1.2 Karbamazepin 2

1.3 Okskarbazepin 5

1.4 Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil 7

1.4.1 TDM karbamazepina 9

1.4.2 TDM okskarbazepina 9

1.5 Pregled metod na področju analitike karbamazepina in okskarbazepina ter njunih presnovkov 10

2 Namen dela in delovna hipoteza 13

3 Materiali in metode 15

3.1 Materiali 15

3.1.1 Plazma 15

3.1.2 Standardi in interni standardi 15

3.1.3 Reagenti in topila 16

3.1.4 Naprave in pribor 16

3.2 Razvoj metode 17

3.2.1 Priprava raztopin 18

3.2.2 Optimizacija priprave plazemskih vzorcev 18

3.2.3 Izbira internega strandarda 20

3.2.4 Optimizacija kromatografije 21

3.3 Validacija metode 21

3.3.1 Priprava vodnih kalibracijskih standardov in kontrolnih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti 22

3.3.2 Priprava plazemskih kalibracijskih standardov in kontrolnih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti 24

3.3.3 Priprava vodnih kontrolnih vzorcev za kontrolo uspešnosti ekstrakcije 25

3.3.4 Linearnost 25

3.3.5 Spodnja meja določljivosti (LLOQ) 27

3.3.6 Točnost 27

3.3.7 Ponovljivost 27

3.3.8 Območje linearnosti 28

3.3.9 Selektivnost 28

3.3.10 Uspešnost ekstrakcije 28

3.3.11 Stabilnost 28

3.3.12 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov 30

4 Rezultati 31

4.1 Razvoj metode 31

4.1.1 Optimizacija priprave plazemskih vzorcev 31

4.1.2 Izbira internega standarda 33

4.1.3 Optimizacija kromatografije 34

4.1.4 Končna optimizirana metoda 35

4.2 Validacija metode 37

4.2.1 Linearnost 37

4.2.2 Spodnja meja določljivosti (LLOQ) ... 44

4.2.3 Točnost ... 45

4.2.4 Ponovljivost ... 48

4.2.5 Območje linearnosti ... 50

4.2.6 Selektivnost ... 50

4.2.7 Uspešnost ekstrakcije ... 51

4.2.8 Stabilnost ... 52

4.2.9 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov ... 55

5 Razprava ... 58

5.1 Razvoj metode ... 58

5.2 Validacija metode ... 59

5.2.1 Linearnost in območje ... 59

5.2.2 Spodnja meja občutljivosti (LLOQ) ... 59

5.2.3 Točnost ... 60

5.2.4 Ponovljivost ... 60

5.2.5 Selektivnost ... 60

5.2.6 Uspešnost ekstrakcije ... 60

5.2.7 Stabilnost ... 61

5.2.8 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov ... 61

5.2.9 Predlogi izboljšav metode ... 62

6 Sklepi ... 63

7 Viri ... 64

Povzetek

Karbamazepin (Cbz) in okskarbazepin (OxCbz) sta najpogosteje indicirana za zdravljenje parcialnih epileptičnih napadov, z ali brez sekundarno generaliziranih tonično-kloničnih epileptičnih napadov. Zaradi ozkega terapevtskega območja in neželenih učinkov obeh učinkovin ter njunih presnovkov je potrebno terapevtsko spremljanje plazemskih koncentracij (TDM) in prilagoditev individualnega odmerka zdravilne učinkovine.

V okviru diplomske naloge smo razvili hitro in enostavno metodo za sočasno analizo karbamazepina in okskarbazepina ter njunih glavnih presnovkov karbamazepin-10,11-epoksida (Cbz-epo), likarbazepina (LiCbz) ter 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepina (Cbz-diol) v plazmi bolnikov z epilepsijo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in ultravijolične (UV) detekcije. Plazemske vzorce smo oborili z ohlajenim acetonitrilom, centrifugirali, supernatant posušili s centrifugo za sušenje vzorcev pri podtlaku in ponovno raztopili v zmesi pufra in metanola. HPLC analiza je potekala na koloni Luna Phenyl-Hexyl C6, 5 µm in je trajala 13 minut. Mobilna faza je bila sestavljena iz kalijevega fosfatnega pufra (25,0 mM, pH 3,0) in iz metanola v razmerju 50:50 (v/v %). V kolono smo jo dovajali izokratsko pri pretoku 1 mL/min pri 50 °C. Kot interni strandard smo uporabili kloramfenikol. Vse analite smo detektirali pri valovni dolžini 215 nm.

Razvito metodo smo validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Metoda je točna, ponovljiva (odstop znotraj 15 %, razen pri pri najnižjem kontrolnem vzorcu nizke koncnetracije okskarbazepina in 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepina drugega in tretjega dne validacije) in linearna (r^2 = 1,000) v koncentracijskem območju 0,075-30 µg/mL za karbamazepin, 0,1-30 µg/mL za okskarbazepin in likarbazepin, 0,25-20 µg/mL za karbamazepin-10,11-epoksid in 0,05-20 za 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin. Izkoristki ekstrakcije so bili v območju med 87,1 % in 116 %. Analiti so ostali stabilni kljub izpostavitvi sobni temperaturi za 6 h, 4 °C za 24 h v avtomatskem vzorčevalniku, trem ciklom zamrzovanja in odtajanja. Metoda je primerna za plazemsko spremljanje koncentracij karbamazepina in okskarbazepina pri bolnikih z epilepsijo.

KLJUČNE BESEDE: karbamazepin, okskarbazepin, karbamazepin-10,11-epoksid, likarbazepin, 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin, terapevtsko spremljanje koncentracij, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, ultravijolična detekcija

Abstract

Carbamazepine (Cbz) and oxcarbazepine (OxCbz) are primary indicated for treatment of partial seizures with or without secondarily generalised tonic-clonic seizures. Because of theirs narrow therapeutic range and undesirable side effects we need to monitor drugs plasma levels (TDM) and optimize the therapy individually.

In the thesis we developed a quick and simple method to quantify simultaneously carbamazepine, oxcarbazepine their major metabolites carbamazepine-10,11-epoxide (Cbz-epo), licarbazepine (Li-cbz) and 10,11-*trans*-dihyroxy-10,11-dihydrocarbamazepine (Cbz-diol) in plasma of patients with epilepsy using high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. Plasma samples were deproteinized with acetonitrile, centrifuged, the upper layer was evaporated to dryness under centrifugal evaporator SpeedVac and the residues were reconstituted in the mixture of buffer and methanol. HPLC analysis was carried out on a Luna Phenyl-Hexyl column C6, 5 µm and finished in 13 minutes. The mobile phase consisting of potassium dihydrogen phosphate buffer (25,0 mM, pH 3,0) and methanol in the ratio 50:50 (v/v) was pumped at isocratic flow rate of 1 mL/min at 50 °C. Chloramphenicol was used as internal standard. All analytes were detected at 215 nm.

The developed method was validated according to the guidelines of Food and Drug Administration (FDA). It showed to be accurate, precise (bias within ≤15 %, except for oxcarbazepin and 10,11-*trans*-dihyroxy-10,11-dihydro-carbamazepine on first and second day of validation at the lowest concentration quality control sample) and linear (r^2 = 1,000) over the concentration range of 0,075-30 µg/mL for carbamzepine, 0,1-40 µg/mL for oxcarbazepine and licarbazepine, 0,25-20 µg/mL for carbamazepine-10,11-epoxide and 0,05-20 µg/mL for 10,11-*trans*-dihyroxy-10,11-dihydrocarbamazepine. Extraction yields varied from 87,1 % to 116 %. Analytes demonstrated to be stable during 6 h at room temperature, during 24 h at 4 °C in autosampler, after three freeze and thaw cycles.

The method was found suitable for monitoring of plasma samples of patients treated with carbamazepine and oxcarbazepine.

KEY WORDS: carbamazepine, oxcarbazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, licarbazepine, 10,11-*trans*-dihyroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, therapeutic drug monitoring, high performance liquid chromatography, ultraviolet detection

Seznam okrajšav

AcN	acetonitril
AED	protiepileptična zdravila *(antiepileptic drugs)*
AUC	površina pod krivuljo *(area under the curve)*
c	koncentracija
Cbz	karbamazepin
Cbz-diol	10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin
Cbz-epo	karbamazepin-10,11-epoksid
CEDIA	encimskoimunska tehnika, ki uporablja tehnologijo rDNK
CLIA	kemiluminiscenčna tehnika
CV	koeficient variacije
CYP	citokromi P45O *(cytochrome P450)*
DAD	detektor z nizom diod *(diode array detector)*
DR	delovna raztopina
ECD	detektor na zajetje ionov *(electron capture detector)*
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina *(ethylenediaminetetraacetic acid)*
e_i	odstopanje med eksperimentalnim in izračunanim odzivom
EIA	encimskoimunska tehnika
EMIT	multiencimska imunološka tehnika
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila *(Food and Drug Administration)*
FID	plamensko ionizacijski detektor *(flame ionization detector)*
FPIA	imunološka tehnika s fluorescenčno polarizacijo
GABA	γ-aminomaslena kislina (*gamma-aminobutyric acid)*
GC	plinska kromatografija *(gas chromatography)*
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti *(high performace liquid chromatography)*
IC/ED/FD	ionska kromatografija sklopljena z elektrokemijsko derivatizacijo in fluorescenčno detekcijo
ILAE	Mednarodna liga proti epilepsiji *(International League Against Epilepsy)*
IS	interni standard
k	smerni koeficient
LiCbz	likarbazepin

LLE	ekstrakcija tekoče-tekoče *(liquid-liquid extraction)*
LLOQ	spodnja meja določljivosti *(lower limit of quantification)*
logP	logaritemski porazdelitveni keoficient
MEKC	micelarna elektrokemična kromatografija *(miccelar electrokinetic chromatography)*
MPO	mieloperoksidaza
MS	masna spektrometrija
MS-MS	tandemska masna spektrometrija
n	presečišče z ordinato
NMDA	N-metil-D-aspartat
OR	osnovna raztopina
OxCbz	okskarbazepin
QC	kontrolni vzorec *(quality control)*
QCH	kontrolni vzorec visoke koncentracije *(high)*
QCL	kontrolni vzorec nizke koncentracije *(low)*
QCM	kontrolni vzorec srednje koncntracije *(medium)*
r	Pearsonov koeficient
r^2	determinacijski koeficient
ROS	reaktivne kisikove zvrsti *(reactive oxygen species)*
R_w	vsota produkta uteži
SD	standarna deviacija
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu *(solid phase extraction)*
SPME	mikroekstracija na trdnem nosilcu *(solid phase microextraction)*
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracij *(Therapeutic Drug Monitoring)*
t_R	retencijski čas
UGT	UDP-glukuronizil-trasferaza
UV	ultravijolično
v/v	razmerje volumnov
w_i	utež
2-OH-Cbz	2-hidroksi-karbamazepin
3-OH-Cbz	3-hidroksi-karbamazepin

1 Uvod

1.1 Epilepsija

Epilepsija je ena izmed najpogostejših nevroloških bolezeni. Ima jo približno 50 milijonov ljudi, kar predstavlja 1 % prebivalstva. Ameriška študija navaja, da se letno pojavi od 20 do 70 novih primerov epilepsije na 100,000 prebivalcev, njena prevalenca je 0,4 – 0,8 % (1).

Epilepsija je izraz za skupino kroničnih nevroloških motenj, za katere so značilni ponavljajoči epileptični napadi. Epileptični napadi so posledica prekomerne, hipersinhrone, omejene in nenormalne električne aktivnosti nevronov v možganih. Najpogostje se kažejo kot kombinacija spremenjene ravni zavesti, nezavednih gibov – mišičnih krčev, čutilnih in psihičnih doživljajev ter avtonomnih motenj (2).

Mednarodna liga proti epilepsiji (ILAE) je razdelila napade na dva osnovna tipa, in sicer žariščni (lokaliziran) in porazdeljen (generaliziran) napad. Pri prvem je motnja omejena na eno možgansko hemisfero, medtem ko se pri generaliziranem napadu bilateralno razširi na obe. Glede na vpliv, ki ga imajo na telo, generalizirane napade delimo na tonično – klonične, odsotnostne, mioklonične, klonične, tonične in klonične. V nekaterih primerih se lahko žariščni napad razvije v generaliziran, krčevit in/ali konvulziven napad (3).

Napadi se v 70 odstotkih primerov pojavijo brez neposrednega vzroka. Najpogostejši povzročitelji epilepsije so možgansko-žilne bolezni, motnje v razvoju možganov, možganski tumorji, infekcije ter nevrodegenerativne bolezni (4).

Cilj zdravljenja epilepsije je preprečitev ponovitve epileptičnih napadov. Ker pa v večini primerov vzroka bolezni ne moremo identificirati, zahteva epilepsija doživljensko terapijo. Izbira ustreznega protiepileptičnega zdravila (AED) je odvisna od tipa epilepsije, zdravstvenega stanja bolnika in psihosocialnih dejavnikov, kot sta spol in starost (5).

Protiepileptično delovanje večine učinkovin je posledica kombinacije različnih mehanizmov delovanja na centralni živčni sistem. V grobem ločimo tri mehanizme delovanja tipičnih učinkovin:

- Povečanje učinka γ-aminomaslene kisline (GABA). GABA je inhibitorni živčni prenašalec, ki odpira kloridne ionske kanale na membrani nevrona.

Posledica je vdor kloridnih ionov v celico in hiperpolarizacija in s tem zmanjšanje celične ekscitabilnosti. Barbiturati, benzodiazepini in topiramat se vežejo na kloridne kanale in s tem ojačajo učinek GABE, tiagabin inhibira njen ponovni privzem, vigabatrin irrevezibilno inhibira GABA-transaminazo, valprojska kislina pa viša njeno koncentracijo.

- Inhibicija glutamata, ki je ekscitatorni živčni prenašalec. Lamotrigin preprečuje njegovo sprostitev.
- Vpliv na napetostno odvisne natrijeve, kalijeve in kalcijeve kanale, ki imajo pomembno vlogo v proženju akcijskih potencialov. Karbamazepin, fenitoin, lamotrigin, okskarbazepin, topiramat, valprojska kislina in zonisamid delujejo na te kanale tako, da onemogočijo depolarizacijo (1).

1.2 Karbamazepin

Karbamazepin je nevtralna lipofilna spojina. Sintetizirana je bila pred več kot 50 leti kot potencialna protipsihotična učinkovina, kasneje so ugotovili še njen protiepileptičen učinek. Danes je najpogosteje predpisana učinkovina za zdravljenje epilepsije (6, 7).

Glavne fizikalno kemijske lastnosti karbamazepina so povzete v preglednici 1.

Preglednica 1: Fizikalno kemijske lastnosti karbamazepina (6).

Kemijsko ime	5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepin-5-karboksamid
Kemijska formula	$C_{15}H_{12}N_2O$
Molekulska masa	236,3 g/mol
LogP (pH 7,4)	2,2
Topnost	Topen v alkoholu, acetonu. Netopen v vodi.

Glavni mehanizem protiepileptičnega učinka karbamazepina je zaviranje napetostno odvisnih natrijevih kanalov in s tem zmanjšanje sinaptičnega širjenja ekscitacijskega impulza in preprečitev ponovnega vzdraženja nevrona.

Ostali mehanizmi, ki se vpletajo v protiepileptično delovanje so moduliranje napetostnih kalicijevih kanalov tipa L, vpliv na napetostno odvisne kalijeve kanale, povečanje sproščanja 5-hidroksitriptamina (serotonina), zaviranje *N*-metil-*D*-aspartatnih (NMDA) in muskarinskih acetilholinskih receptorjev ter ojačanje dopaminergičnega živčnega prenašanja (7).

Karbamazepin je derivat dibenzazepina s protiepileptičnim in psihotropnim učinkom. Primeren je za monterapijo ali dodatno terapijo z drugimi protiepileptičnimi zdravili. Indiciran je za zdravljenje žariščnih in porazdeljenih tonično-klonično napadov. Uporablja se tudi pri zdravljenju trigeminalne bolečine, glosofaringealne nevralgije in drugih bolečinskih sindromih, ki so povezani z nevrološkimi motnjami. Učinkovit je tudi pri vzdrževalnem zdravljenju bipolarnih motenj (8).

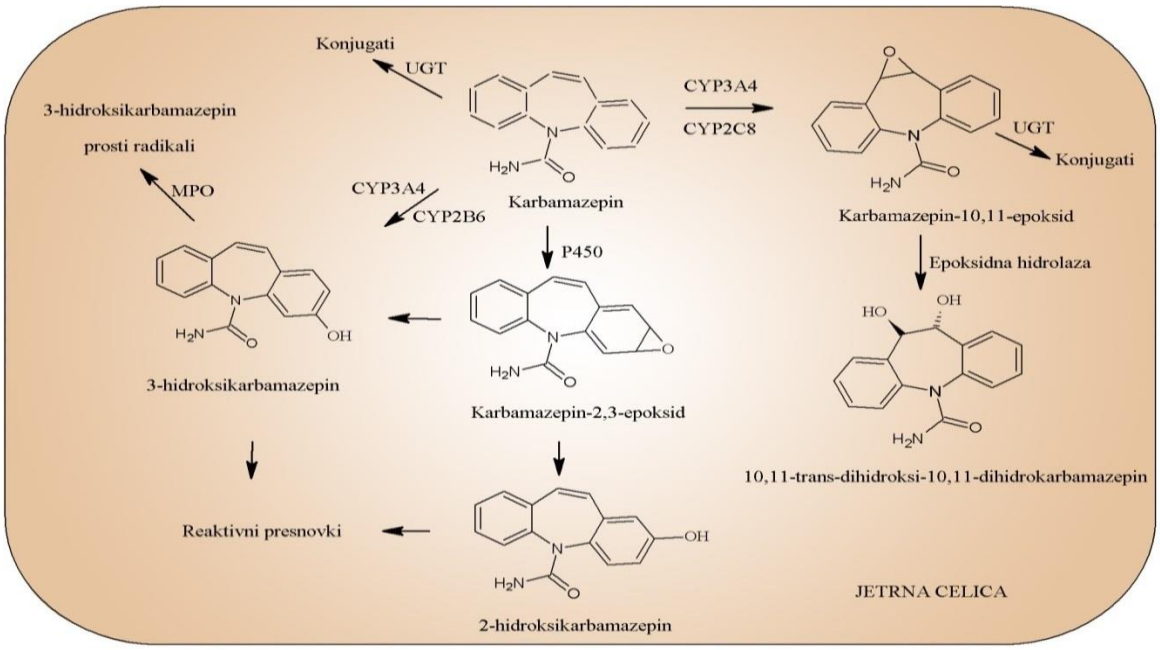
Priporočen začetni odmerek je 100-200 mg/dan, ki se postopoma povečuje do vzdrževalnega odmerka, ki je ponavadi med 0,8 in 1,2 g na dan, razdeljeno na 2 do 4 enakomerne dele (8).

Karbamazepin se po peroralni uporabi počasi in neenakomerno absorbira iz prebavnega trakta, njegova biološka uporabnost je med 85 % in 100 %. Hrana ne vpliva na hitrost in obseg absorpcije. Največji vpliv na biološko uporabnost ima vrsta farmacevtske oblike. Ta je manjša pri rektalnih farmacevtskih oblikah in pri tabletah s prirejenim sproščanjem. Pri prehodu s peroralne na rektalno obliko je potrebno odmerek povišati za približno 25 %. Odmerek je potrebno prilagoditi tudi pri tabletah s prirejenim sproščanjem, ki pa po drugi strani zmanjšajo koncentracijska nihanja in neželene učinke pri višjih odmerkih (8).

Čas dosega najvišje plazemske koncentracije je odvisen od vrste peroralne oblike. Najhitrejša absorpcija je pri peroralnih suspenzijah. Pri tabletah s takojšnjim sproščanjem dosežemo maksimum po 4 – 8 urah, medtem ko lahko pri tabletah s podaljšanim sproščanjem šele po 24 urah. Pri bolnikih, ki so že dlje časa na terapiji s karbamazepinom, je ta čas skrajšan na povprečno tri ure, zaradi avtoindukcije jeternih encimov (6). Zaradi le-te je skrajšana tudi razpolovna doba učinkovine na 12 – 24 ur in je še krajša pri otrocih (8).

Karbamazepin hitro prehaja biološke membrane in se porazdeli po celem telesu. Njegov volumen porazdelitve je 0,7-1,9 L/kg. Na plazemske proteine se veže 70-80 % spojine. Karbamazepin in njegovi presnovki se izločajo v mleku in prehajajo posteljico (6).

Pri presnovi nastane čez 30 vrst različnih presnovkov. Glavne so tri presnove poti (slika 1). Kvanitativno je najpomembnejša pot oksidacija v aktivni karbamazepin-10,11-epoksid (Cbz-epo, 40 %), ki se hidrolizira in izloči z urinom kot 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin (Cbz-diol). Druga pot presnove je hidroksilacija šestčlenskega aromatskega obroča v 3-hidroksikarbamazepin (3-OH-Cbz) in 2-hidroksikarbamazepin (2-OH-Cbz), neposredno ali posredno preko epoksidnega intermediata (karbamazepin-2,3-epoksid). Nadaljnja presnova hidroksiliranih spojin vodi v nastanek reaktivnih presnovkov (karbamazepin-o-kinon, iminokinon, prosti radikali), ki so lahko odgovorni za neželene učinke zdravila. Tretja pot je glukuronizacija Cbz-epo in direktna N-glukuronizacija karbamoilne stranske verige z UDP-glukuronizil-transferazo (UGT). CYP3A4 in CYP2C8 sta glavna jetrna mikrosomalna encima, odgovorna za nastanek aktivnega presnovka Cbz-epo. Njuni zaviralci zvišajo plazemsko koncentracijo karbamazepina in z njo povezano toksičnost, medtem ko jo njuni induktorji znižajo in s tem manjšajo terapevtski učinek. Nastanek 3-OH-Cbz katalizirata CYP3A4 in CYP2B6, medtem ko je v sintezo 2-OH-Cbz vpetih več encimov citokroma P450 (CYP 450). V manjšem obsegu lahko pri presnovi 3-OH-Cbz z mieloperoksidazo (MPO) nastanejo radikali in reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Karbamazepin je močan induktor citokroma P4503A4, epoksidne hidrataze, UGT in lastne presnove (avtoindukcija). Ob sočasni uporabi zdravil, ki se presnavljajo s temi encimi, se znižajo njihove plazemske koncentracije (8, 9).



Slika 1: Presnovne poti karbamazepina. Povezeto po Thorn *et al* (9).

Približno 72 % peroralnega odmerka se izloči v urinu v obliki presnovkov, od tega 3 % v nespremenjeni obliki. Preostalih 28 % se izloči z blatom kot rezultat nepopolne absorpcije ali enterohepatične cirkulacije (10).

Najpogostejši neželeni učinki, zlasti na začetku zdravljenja, so omotica, zaspanost, ataksija in prebavne motnje. Neželeni učinki na osrednje živčevje kažejo na prevelike plazemske koncentracije in ponavadi spontano izvenijo tekom zdravljenja ali pa z razdelitvijo odmerkov. V nekaterih primerih je priporočeno spremljanje plazemskih koncentracij (8).

1.3 Okskarbazepin

Okskarbazepin je 10-keto analog karbamazepina in spada med protiepileptične učinkovine nove generacije. V primerjavi s karbamazepinom ima enak klinični učinek, manj neželenih učinkov in interakcij z ostalimi zdravili (11).

Glavne fizikalno kemijske lastnosti okskarbazepina so povzete v preglednici 2.

Preglednica 2: Fizikalno kemijske lastnosti okskarbazepina (6, 8, 10)

Kemijsko ime	10,11-dihidro-10-okso-5*H*-dibenz[*b*,*f*]azepin-5-karboksamid
Kemijska formula	$C_{15}H_{12}N_2O_2$
Molekulska masa	252,3 g/mol
LogP (pH 7,4)	1, 25
Topnost	Topen v alkoholu in acetonu. Netopen v vodi.

Njegov aktivni presnovek 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepin (likarbazepin) blokira napetostno odvisne natrijeve kanale, vpliva na napetostno odvisne kalijeve kanale in povečuje dopaminergičen prenos. V primerjavi s karbamazepinom deluje na drug tip kalcijevih kanalov, in sicer na tip N in/ali P in/ali R (7).

Okskarbazepin se uporablja za iste indikacije kot karbamazepin. Začetni odmerek je 600 mg na dan in se povečuje do 1,2 g dnevno, glede na klinični odziv bolnika. Ob dodatni terapiji z drugimi protiepileptičnimi zdravili je potreben višji odmerek, do 2,4 g na dan. Zmanjšani odmerki so potrebni pri bolnikih z okvarjeno ledvično funkcijo (8).

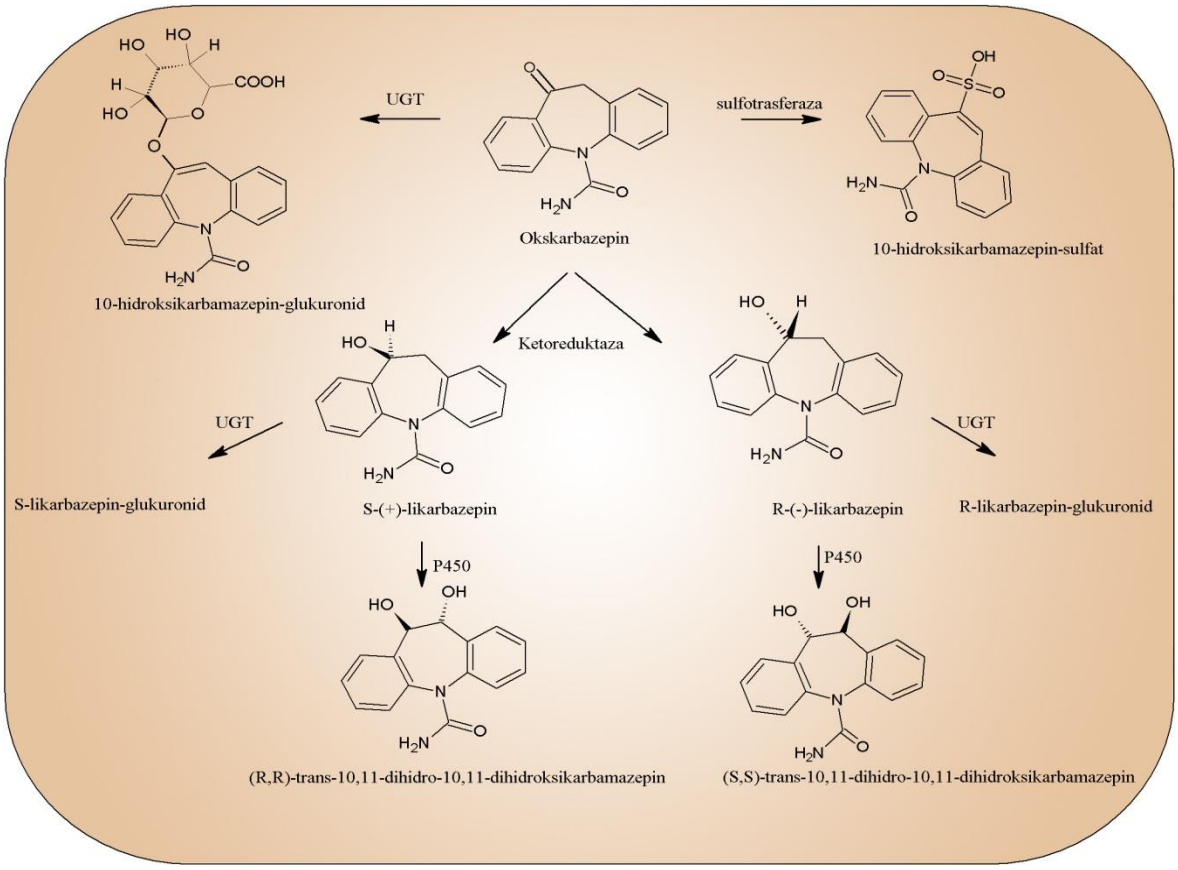
Okskarbazepin se popolnoma in neodvisno od hrane absorbira iz prebavnega trakta. Po absorpciji se v ledvicah hitro in obsežno presnovi do likarbazepina (8).

Najvišje plazemske koncentracije po uporabi filmsko obloženih tablet so dosežene v 4,5 urah po peroralni uporabi. Njegova razpolovna doba je 2 uri in 9 ur za likarbazepin. Pri bolnikih z okvarjeno ledvično funkcijo se poviša na 19 ur, vrednost površine pod krivuljo (AUC) je dvakrat večja kot pri odraslih z normalnim delovanjem ledvic (10).

Volumen porazdelitve je likarbazepin je med 0,7 in 0,8 L/kg. Na plazemske proteine se veže 60 % okskarbazepina in 40 % njegovega aktivnega presnovka. Izločata se v mleku in prehajata posteljico (11).

Presnova okskarbazepina poteka drugače od presnove karbamazepina, kljub kemijski podobnosti obeh spojin. Za aktivacijo in glavno izločitev spojine iz telesa poskrbita dva ne-oksidativna encimska procesa (slika 2).

S pomočjo citosolne ketoreduktaze se okskarbazepin hitro presnovi do likarbazepina, ki se dalje presnavlja z UGT preko konjugacije z glukuronsko kislino. V znatno manjšem obsegu poteče oksidacija likarbazepina do Cbz-diol s citokromskimi encimi. Presnova prvega prehoda je steroselektivna, saj nastaneta enatiomera (*R*)-likarbazepin in (*S*)-likarbazepin v razmerju 1:4. Ker ima Cbz-diol dva kiralna centra na mestih 10 in 11, obstaja njegova trans konfiguracija v dveh oblikah, in sicer (*R*)-Cbz-diol in (*S*)-Cbz-diol. Majhen delež okskarbazepina ostane nespremenjen ter se konjugira z glukuronsko kislino in s sulaftom (6).



Slika 2: Presnovne poti okaskarbazepina. Povzeto po Levy et al (6).

Okskarbazepin se skoraj v celoti izloča z urinom, 83% v obliki likarbazepina in njegovih glukuronidov in sulfatov, 4-7% kot Cbz-diol in 0,3-3% v nespremenjeni obliki (12).

Okskarbazepin inducira CYP3A4/5 ter inhibira CYP2C19, s čimer pomembno vpliva na plazemske koncentracije drugih učinkovin. V primerjavi s karbamazepinom ne inducira lastnega metabolizma (indukcija UDP-glukuronoziltrasferaze je minimalna)(6).

Profil neželenih učinkov je podoben kot pri karbamazepinu, vendar pa so le-ti redkejši in blažji. Najpogostejši so slabost, glavobol, omotičnost in ataksija. Pogosta je tudi hiponatremija, ki je redkejša pri karbamazepinu (12).

1.4 Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil

Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (Therapeutic Drug Monitoring – TDM) je merjenje koncentracije zdravila v telesnih tekočinah, ponavadi v serumu ali plazmi, z namenom individualizacije in optimizacije odmerjanja zdravil.

Splošne indikacije za TDM so:

- na začeteku terapije (določitev terapevtske koncentracije),
- pri spremembi odmerka zdravila (predvsem zdravil z nelinearno farmakokinetiko),
- pri neuspešni terapiji (določitev ali izključitev farmakokinetičnih vzrokov za nekontrolirane napade in neželene učinke),
- za identifikacijo in kontrolo polimorfizma v presnovi zdravil in interakcij med zdravili,
- pri patoloških ali fizioloških stanjih, kadar se spremeni farmakokinetika (nosečnost, jetrne bolezni, ledvične bolezni, gastrointestinalne bolezni, ki vpivajo na absorpcijo zdravila),
- za izboljšanje sodelovanja pri bolnikih (1, 13, 14).

Cilj TDM-ja je določitev bolnikove individualne terapevtske koncentracije, to je serumska/plazemska koncentracija, pri kateri ima bolnik dobro kontrolo nad napadi. Referenčna tereapevtska območja protiepileptičnih zdravil namreč variirajo med posameznimi tipi napadov, pri dopolnilni ali monoterapiji in pri zdravljenju bipolarnih motenj in kroničnih bolečin (15).

Predpogoj TDM-ja boljša korelacija med koncentracijo zdravila v krvi in kliničnim učinkom, kot pa med koncentracijo in odmerkom. Izpolnjene morajo biti naslednje zahteve:

- zdravilo mora imeti reverzibilen učinek,
- ne sme se razviti toleranca,
- če so aktivni presnovki, merimo tudi njih,
- koncentracija aktivne nevezane oblike učinkovine mora biti sorazmerna v odvzetem vzorcu in možganih (6).

Vzorci za določanje koncentracije zdravil so serum ali plazma, redkeje tudi polna kri, cerebrospinalna tekočina, slina in lasje. Razvitih je veliko metod za analizo vzorcev. Najpogostejše so plinska in tekočinska kromatografija ter imunološke metode (6, 13).

1.4.1 TDM karbamazepina

Glede na retrospektivne in opazovalne raziskave je referenčno območje za optimalno kontrolo napadov med 4 in 12 mg/L (17-51 µmol/L). Pri sočasnem zdravljenju z drugimi protiepileptičnimi zdravili je referenčno območje še nižje. Koncentracija aktivnega presnovka Cbz-epo, ki je odgovoren za večino toksičnih učinkov, je v območju 10 do 50 % karbamazepina. Razmerje med njima ni konstantno, saj se individualno spreminja in je odvisno od sočasnega jemanja z drugimi zdravili. Zgornja meja presnovka pri kombinirani terapiji je okoli 8 mg/L (34 µmol/L). Nad to vrednostjo večina bolnikov poroča o prehodnih neželenih učinkih na centralni živčni sistem (13,16).

Najpogostejše interakcije z zdravili so na nivoju presnove karbamazepina s citokromi P450. Večina protiepileptičnih zdravil poveča presnovo karbamazepina z indukcijo CYP3A4 in inhibicijo epoksidne hidrolaze, s čimer se v krvi zniža koncentracija karbamazepina in zviša koncentracija toksičnega epoksida. Uporaba TDM-ja je še posebej priporočljiva pri uvedbi novih učinkovin k že obstoječi terapiji s karbamazepinom oziroma ob ukinitvi enega zdravila, ker lahko pride do neželenih učinkov. Makrolidni antibiotiki, nekateri antidepresivi, azoli, cimetidin, dekstropropoksifen, diltiazem, verapamil in stripentol so zaviralci CYP3A4 in lahko povzročijo klinično pomembno zvišanje plazemske koncentracije karabamazepina (8, 16).

Uporabo TDM utemeljujejo zahtevna farmakokinetika, nepredvidljivo razmerje med odmerkom in koncentracijo, ozek terapevtski indeks ter številne interakcije z drugimi zdravili. Z analiznimi metodami se najpogosteje meri koncentracija karbamazepina in aktivnega presnovka karbamazepin-10,11-epoksida (15, 16).

1.4.2 TDM okskarbazepina

TDM je pri okskarbazepinu osredotočen na aktivnem presnovku likarbazepinu. Njegovo terapevtsko referenčno območje je med 3 in 35 mg/L. Višje vrednosti so povezane s toksičnimi neželenimi učinki (15).

Okskarbazepin in likarbazepin se iz telesa izločita skoraj brez oksidativnih procesov in sistema CYP ter linearno farmakokinetiko.

Očistek likarbazepina je večji pri otrocih, ki potrebujejo večji odmerek/kg telesne teže v primerjavi z odraslimi, v nosečnosti ter pri sočasnem zdravljenju s karbamazepinom, fenitoinom in fenobarbitalom. Očistek je manjši pri bolnikih z ledvično okvaro in pri starostnikih (14).

O spremljanju plazemskih koncentracij je potrebno razmisliti pri stanjih, ki spremenijo očistek zdravila, pri visokih odmerkih, da se izognemo koncentracijskemu nihanju, pri bolnikih, ki jemljejo enega ali več protiepileptičnih zdravil sočasno, predvsem pa pri pediatričnih bolnikih (13, 17, 18).

1.5 Pregled metod na področju analitike karbamazepina in okskarbazepina ter njunih presnovkov

Koncentracije karbamazepina in okskarbazepina ter njunih presnovkov so po do sedaj objavljenih študijah najpogosteje spremljali v plazmi ali serumu (19). Ostali biološki material, ki so ga analizirali so slina (20), materino mleko (21), urin (22) in cerebrospinalna tekočina (23). Nekateri raziskovalci so v forenzične namene razvili metodo za določevanje AED v krvi umrlih (24), okoljevarstveniki pa so spremljali koncentracije v morskih organizmih (25).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je najpogosteje uporabljena kromatografska metoda na področju analitike karbamazepina in okskarbazepina. Sklopljena je lahko z UV detektorjem (21, 22, 23, 26-35), detektorjem z nizom diod (DAD) (20, 36, 37), masnim spektrometrom (MS) (38, 39) ali tandemsko masno spektrometrijo (MS-MS) (38). UV in DAD detektorji so cenejši in lažji za vzdrževanje, vendar v primerjavi z masnim spektometrom zahtevajo daljši čas analize, lahko pride tudi do napak zaradi interferenc z matriksom (40). Narasla je uporaba tandemske masne spektrometrije, saj omogoča hitro analizo večjega števila analitov hkrati (42). Objavljene metode kvantificirajo karbamazepin ter njegove presnovke, okskarbazepin in presnovke, nekatere pa tudi kombinacijo različnih AED (27). V večini primerov poteka ločitev spojin na reverzno fazni kromatografski koloni iz silikagela s kovalento vezanimi C8 ali C18 alkilnimi skupinami, s polarno mobilno fazo iz zmesi acetonitril/metanol/pufer (43). Noveješe metode uporabljajo enantioselektivne kolone, ki omogočajo kiralno ločitev *S*-(+)-likarbazepina in *R*-(-)-likarbazepina (34, 35). Te kolone so drage, analize pa zamudne (31).

Priprava vzorca pred kromatografsko analizo je najpomebnejši korak metode. Za ustrezno izolacijo želene učinkovine, je potrebna odstranitev endogenih interferenc iz biološkega vzorca z obarjanjem proteinov ali z ekstrakcijo (44). Pred injiciranjem vzorca v kromatografski sistem so raziskovalci uporabili ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE), ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE), uporabo *on-line* ekstrakcijske pred-kolone in obarjanje z acetonitrilom ali metanolom (29). Prednosti SPE pred ekstrakcijo z organskimi topili so avtomatizacija postopka, manjši volumni vzorca in topil, boljši izkoristek ter krajši čas ekstrakcije (44). Novejše metode se poslužujejo mikroekstrakcije na trdem nosilcu (SPME), ki združi vse stopnje priprave vzorca v en korak, lahko je popolnoma avtomatizirana in se za razliko od ostalih preparativnih tehnik uporablja brez topil, kar prihrani čas in denar, boljša je tudi meja detekcije (20, 44).

Spodnja meja določljivosti (Lower Limit of Quantification – LLOQ) se razlikuje za posamezne učinkovine in HPLC metode, in sicer je njena najnižja dosežena vrednost v plazmi ali serumu 0,02 µg/mL za Cbz (21), 0,014 µg/mL za Cbz-epo (32, 37) ter 0,015 µg/mL za Ox-Cbz, Li-Cbz in Cbz-diol (31). Najvišja zgornja meja linearnosti v plazmi znaša 40 µg/mL za Cbz (36), 30 µg/mL za Cbz-epo (27), 50 µg/mL za Ox-Cbz (39), 200 µg/mL za Li-Cbz (33) in 20 µg/mL za Cbz-diol (20, 33, 38).

Imunološki testi uporabljajo vrsto metod, ki kvantitativno vrednotijo *in vitro* produkt reakcije med učinkovino in specifičnimi protitelesi proti njej. Večina metod je avtomatiziranih, kar omogoča hitro, poceni in priročno analizo zdravil v krvi (19). Na področju analize karbamazepina in okskarbazepina so razvite encimsko imunske metode (EIA, EMIT, CEDIA) (45-48) imunološke metode s fluorescenčno polarizacijo (FPIA) (49) in kemiluminiscenčne metode (CLIA) (50). Za največjo pomankljivost teh metod se je izkazala navzkrižna reaktivnost molekul s podobnimi strukturami. V nekaterih primerih so merjene plazemske koncentracije karbamazepina višje v primerjavi s HPLC, zaradi reakcije reagenta s karbamazepin-10,11-epoksidom (51). V primerjavi z drugimi metodami so večji stroški razvoja in omejen izbor zdravil za analizo (48).

Karbamazepin in okskarbazepin ter njuni presnovki so termično nestabilni in razpadejo pod večino pogojev plinske kromatografije (GC) (52). Metode zahtevajo ekstrakcijo, koncentriranje in derivatizacijo vzorca, kar vodi v dolgotrajen in zahteven postopek (53).

Derivatizacija je potrebna za zagotovitev ustrezne hlapnosti molekul, da se lahko eluirajo pri ustrezni temperaturi brez termične razgradnje (54). Reagenti, ki se uporabljajo v teh reakcijah so dimetilformamid dimetil acetal (54, 55) in pentafluorobenzoil klorid (56) ter N-ciano (57) in trimetilsililni derivat (58). Plamensko ionizacijski detektor (FID) in detektor na zajetje ionov (ECD) sta najpogostejša načina detekcije derivatiziranih analitov, pri čemer so metode z ECD bolj občutljive in specifične (53). V nekaterih metodah kot detektor plinskega kromatografa služi masni spektrometer (MS) (58).

Wu in sodelavci so razvili metodo za določitev karbamazepina v plazmi s pomočjo ionske kromatografije sklopljene z elektrokemijsko derivatizacijo in fluorescenčno detekcijo (IC/ED/FD). Po eluciji karabamazepina na anionski izmenjevalni koloni s pomočjo kisle mobilne faze (100 mM H_3PO_4 in 10 % ACN), poteče elektrokemijska oksidacija do produkta, ki ga zazna fluorescenčni detektor. V primerjavi IC z UV-detekcijo je metoda bolj občutljiva in selektivna. Prednost ionske kromatografije pred HPLC je kolona s stacionarno fazo, ki je uporabna v celotnem pH območju (59).

Pucci in sodelavci so s pomočjo micelarne elektrokinetične kromatografije (MEKC) razvili metodo za določitev okskarbazepina in njegovih presnovkov v plazmi. MEKC je princip kromatografske ločbe analitov, kjer se v ločevalni pufer doda površinsko aktivna snov – v njihovem primeru natrijev dodecil sulfat (SDS), ki nad kritično micelarno koncentracijo (CMC) tvori micele. Analiti se porazdelijo na podlagi njihove lipofilnosti v notranjost ali zunanjost micela, ki potuje v električnem polju. Metoda je tako primerna tudi za nevtralne molekule. Optimizacijo metode so dosegli predvsem s spreminjanjem koncentracije SDS in pH. Prednosti MEKC so manjša poraba vzorca in topil ter dobra ločljivost (60).

Lin in sodelavci so razvili metodo za določitev karbamazepina in njegovih presnovkov v serumu s pomočjo kapilarne elektroforeze. Pri tem so lahko injicirali večji volumen vzorca v kapilaro, brez zmanjšanja učikovitosti ločitve analitov. V primerjavi z običajno MEKC so dosegli 300 krat boljšo občutljivost metode (61).

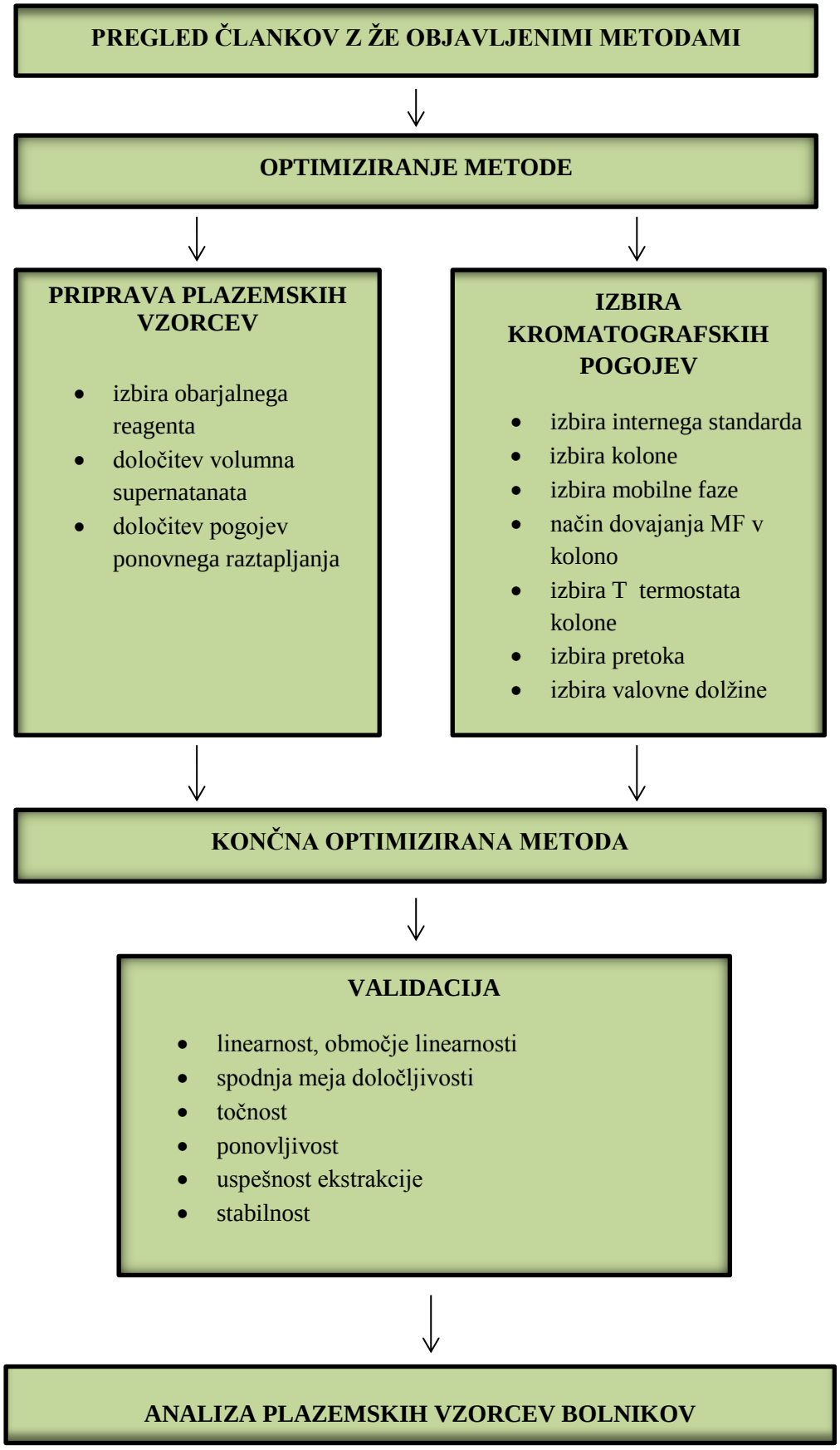
2 Namen dela in delovna hipoteza

V diplomski nalogi bomo razvili analizno metodo, ki bo omogočala spremljanje koncentracij karbamazepina in okskarbazepina ter njunih presnovkov v krvni plazmi.

Metoda bo temeljila na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti z UV detekcijo, pri čemer si bomo pri razvoju pomagali z že objavljenimi analiznimi metodami. Izbrali bomo ustrezni interni standard, kromatografsko kolono in mobilno fazo za hitro in dobro ločitev naših spojin. Iz bioloških vzorcev bomo analite izolirali z obarjanjem plazemskih proteinov, supernatant posušli s pomočjo centrifuge za sušenje vzorcev pri podtlaku in jih ponovno raztopili z optimalnim topilom.

Metodo bomo tudi validirali po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). S pomočjo validacijskih parametrov kot so selektivnost, točnost, natančnost, območje linearnosti, meja določljivosti, uspešnost ekstrakcije in stabilnost, bomo dokazali uporabnost metode in navedli morebitne omejitve njene uporabe. Validirano metodo bomo preizkusili na realnih plazemskih vzorcih bolnikov.

Shematski načrt razvoja metode je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Shematski načrt razvoja metode.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Plazma

Humano plazmo (antikoagulant EDTA) šestih različnih darovalcev smo pridobili na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana. Evidenčne številke uporabljene plazme so sledeče:

Plazma 0: 2103144
Plazma A: 2000503
Plazma B: 2103150
Plazma C: 1697084
Plazma D: 1878738
Plazma E: 1866003

Plazmo bolnikov (EDTA), ki so prejemali protiepileptična zdravila, smo pridobili na Univerzitetnem Kliničnem Centru Ljubljana, Poliklinika, Ambulanta za epilepsijo, Njegoševa 4, v okviru doktorske disertacije dr. Boštjana Martinca, mag.farm. Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije je 8.6.2011 izdala Soglasje k raziskavi (št. soglasja 152/06/1.).

Plazmo smo shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C in jo pred vsako uporabo odtajali na sobni temperaturi na vodni kopeli.

3.1.2 Standardi in interni standardi

Karbamazepin, $C_{15}H_{12}N_2O$; M = 236,27 g/mol (Sigma-Aldrich Steinhem, Nemčija)
Karbamazepin-10,11-epoksid; $C_{15}H_{12}N_2O_2$, M = 252,27 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)
Okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$; M = 252,27 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)
Likarbazepin, $C_{15}H_{14}N_2O_2$; M = 254,28 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidro-karbamazepin, $C_{15}H_{14}N_2O_3$; M = 270,29 g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

Kloramfenikol, $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$; M = 323,13 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Guanabenz acetat, $C_8H_8Cl_2N_4 \cdot C_2H_4O_2$; M = 291,13 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.3 Reagenti in topila

Acetonitril CHROMASOLV®, C_2H_3N; M = 41,05 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Metanol CHROMASOLV®, CH_3OH; M = 32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Kalijev dihidrogen fosfat pro analysi, KH_2PO_4; M = 136,09 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Natrijev hidroksid NaOH Titrisol® za pripravo 1M raztopine NaOH; M = 40,00 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

85 % ortofosforna kislina, H_3PO_4; M = 98,00 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Standardne pufrske raztopin pH = 1,5, pH = 3, pH = 5 (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Ultračista voda (specifična upornost 18,2 MΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppm), pridobljena z Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA)

3.1.4 Naprave in pribor

Hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik -80 °C (Sanyo Electric Biomedical, Osaka, Japonska)

Analitska tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Precizna tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Ultrazvočna kad Bandelin Sonorex (Bandelin Electronic, Berlin, Nemčija)

Ultrazvočna kad Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Mikrocentrifuga 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Vibromix 114 EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Centrifuga za sušenje vzorcev pri podtlaku SpeedVac (Savant SC110A, Hickville, ZDA)

Centrifuga za sušenje vzorcev pri podtlaku (VR-1/120/240, Heraeus Instruments, Danska)
Magnetno mešalo HI 190 M (Hanna Instruments, Koper, Slovenija)
Polavtomatske pipete 2 - 20µl, 20 – 200 µl, 200 – 1000 µl (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
Celulozni acetatni filter 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Göttingen, Nemčija)
Mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija) in 2,0 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
Stekleni inventar: merilni valji, bučke, čaše, palčke, tehtiči, presajalna bučka in lij, viale, inserti za viale.
Ostali inventar: plastični nastavki za pipete, plastični pokrovčki za viale, stojala za mikrocentrifugirke, rokavice, Parafilm®M, spatule.
HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detekcijo (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
Predkolona HPLC Security Guard Gemini C6 Phenyl, 4 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
HPLC kolona Gemini C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
HPLC kolona Zorbax Eclipse Plus C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
HPLC kolona Luna C18, 150 × 4,6 mm, 3µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
HPLC kolona Luna Phenyl-Hexyl, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)

3.2 Razvoj metode

Cilj optimizacije osnovne metode je bil uporaba čim manjših volumnov plazme ter visoka občutljivost metode v koncentracijskih območjih izbranih analitov. To smo dosegli z ustrezno izbiro internega standarda, metodo deproteinizacije, časa in načina sušenja vzorca, topila za ponovno raztapljanje posušenih analitov, sestave mobilne faze ter pogojev kromatografije.

3.2.1 Priprava raztopin

3.2.1.1 Priprava pufra

Pri delu smo uporabljali 25,0 mM fosfatni pufer različnih pH vrednosti (pH 1,5; 3 in 5). Pripravli smo ga tako, da smo na tehtič zatehtali 1,701 g (3,402 g) KH_2PO_4, ga kvantitativno prenesli v 500 mL merilno bučko ter z ultračisto vodo dopolnili do oznake.

V raztopino smo dodali 85 % ortofosforno kislino oziroma 1M NaOH do ustrezne pH vrednosti. Pufer smo nato prefiltrirali skozi celulozni-acetatni filter (velikost por 0,45 µm) s pomočjo vodne črpalke in ga pred črpanjem v HPLC sistem razplinili v ultrazvočni kadički.

3.2.1.2 Priprava osnovnih standarndnih raztopin

Osnovne standardne raztopine (OR) vseh petih analitov smo pripravili tako, da smo v 2 mL mikrocentrifugirko zatehtali približno 5 mg posameznega analita ter ga raztopili v ustreznem volumnu metanola do končne koncentracije 5,0 mg/mL. Za pripravo osnovne raztopine internega standarda, smo v 2 mL centrifugirko zatehtali približno 1 mg analita ter dodali volumen metanola, ki je dal koncentracijo 1,0 mg/mL. Tako pripravljene OR smo hranili v hladilniku na 4 °C.

3.2.1.3 Priprava plazemskih raztopin

Plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo k 250 µL plazme dodali 25 µL kalibracijskega standarda vseh petih učinkovin ter 25 µL delovne raztopine internega standarda. Raztopine smo nato vorteksirali 30 sekund.

3.2.2 Optimizacija priprave plazemskih vzorcev

Pripravljene plazemske raztopine so poleg naših analitov vsebovale tudi endogene komponente plazme, ki smo jih pred kromatografsko analizo morali odstraniti. Izbrali smo obarjanje proteinov z organskimi topili, ker je postopek preprost in hiter. Plazmi smo dodali obarjalni reagent, centrifugirali in odvzeli supernatant, katerega smo nato posušili in ponovno raztopili v ustreznem topilu. Pripravo plazemskih vzorcev smo optimizirali tako, da smo pri vsakem koraku postopka preverjali vpliv različnih parametrov na ponovljivost rezultatov. Za vsak testni vzorec smo pripravili po tri paralele.

Izbira obarjalnega reagenta

Kot obarjalna reagenta smo preizkusili metanol, ki smo ga dodali ohlajenega na 4 °C in acetonitril, ohlajenega na -20 °C. Preverili smo tudi, kako različni volumni organskega topila vplivajo na čistočo vzorca (preglednica 3).

Preglednica 3: Različni volumni obarjalnega reagenta.

Varianta	Volumen obarjalnega reagenta (µL)
A	600
B	750
C	900

Izbira pogojev centrifugiranja

Pogoje smo povzeli po članku avtorjev Contin *et al* (26). Po dodatku obarjalnega reagenta in vorteksiranju je sledilo centrifugiranje 10 minut pri 2500 g in 4 °C.

Določitev volumna supernatanata

Volumen odvzetega volumna supernatanta po deproteinizaciji je bil v našem primeru odvisen od velikosti steklenih insertov, ki smo jih vstavili v ustrezne viale za sušenje v vakuumskem sušilniku. Maksimalen volumen je bil 300 µL, preizkusili smo tudi 250 µL.

Izbira pogojev rekonstitucije

Za rekonstitucijsko topilo posušenega ostanka smo izbrali zmes metanola in fosfatnega pufra. Preizkusili smo različne volumne ter različne deleže metanola in pufra (v/v %):

A. Volumni dodanega topila:
- 30 µL MeOH:pufer = 50:50
- 40 µL MeOH:pufer = 50:50
- 50 µL MeOH:pufer = 50:50
- 60 µL MeOH:pufer = 50:50

B. Sestava topila:
- 80 µL MeOH:pufer = 60:40
- 80 µL MeOH:pufer = 70:30
- 80 µL MeOH:pufer = 80:20

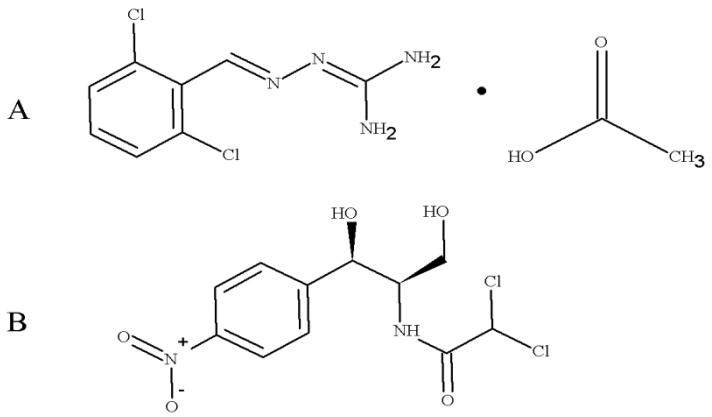
Po dodatku topila smo viale dobro premešali ter vorteksirali. Preverili smo razliko med vorteksiranjem po 30 sekundah in 1 minuti.

3.2.3 Izbira internega strandarda

Z dodatkom znane koncentracije raztopine internega standarda v plazemske vzorce smo kompenzirali izgube in variabilnost med pripravo vzorca in kromatografsko analizo. Upoštevali smo, da je interni standard kemijsko (logP, preglednica 4) in strukturno podoben analitom, da se je dobro ločil od preiskovanih spojin ter da njegov retencijski čas ni vplival na dolžino naše analize. Izbirali smo med guanabenz acetatom in kloramfenikolom (slika 4). Idejo za slednjega smo dobili iz članka avtorjev Greiner-Sosanko *et al* (28).

Preglednica 4: Porazdelitveni keoficienti analitov (62).

Spojina	logP
Karbamazepin	2,77
Karbamazepin - epoksid	2,58
Okskarbazepin	1,82
Likarbazepin	2,23
Karbamazepin - diol	0,81
Guanabenz acetat	1,71
Kloramfenikol	0,88



Slika 4: Strukturna formula guanabenz acetata (A) in kloramfenikola (B) (62).

3.2.4 Optimizacija kromatografije

Izbira kolone

Prizkusili smo štiri različne reverznofazne HPLC kolone:

- Gemini C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm
- Zorbax Eclipse Plus C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm
- Luna C18, 150 × 4,6 mm, 3µm
- Luna Phenyl-Hexyl, 150 × 4,6 mm, 5 µm

Glavna kriterija pri izbiri HPLC kolone sta bila dobra ločitev vrhov in hitra elucija preiskovanih analitov.

Razvoj optimalne mobilne faze

V reverzno fazni kromatografiji se za mobilno fazo uporablja mešanica vodne in organske faze. Kot vodni del smo uporabili kalijev fosfatni pufer različnih pH vrednosti (1,5; 3,0; 5,0) in različnih pufrskih moči (25,0 mM in 50,0 mM). Pufer smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.1. Kot organski del mobilne faze smo preizkusili acetonitril in metanol. Sestavo mobilne faze smo med kromatografsko analizo programirano spreminjali (gradientna elucija) oziroma pustili nespremenjeno (izokratska elucija).

Izbira optimalne temperature termostata kolone

Preverili smo razliko v rezultatih pri koloni ogreti na 30 °C, 40 °C in 50 °C.

Izbira optimalne valovne dolžine

Kromatografski spekter smo posneli z UV-detektorjem pri treh različnih valovnih dolžinah. 210 nm in 215 nm smo izbrali na podlagi absorpcijskih maksimumov učinkovin, 235 nm pa smo uporabili po zgledu avtorjev članka Fortuna *et al* (27).

3.3 Validacija metode

Validacija bioanalizne metode zajema dokumentirane postopke, ki dokazujejo, da daje metoda zanesljive in ponovljive rezultate kvantitativnih meritev analitov v bioloških vzorcih, kot so kri, plazma, serum ali urin.

Glavni parametri validacije, ki smo jih testirali so območje linearnosti, točnost, ponovljivost, spodnja meja določljivosti, uspešnost ekstrakcije in stabilnost.

Pri delu smo upoštevali smernice Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) za validacijo bioanalizne metode v industriji (63).

3.3.1 Priprava vodnih kalibracijskih standardov in kontrolnih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti

Po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.2 smo pripravili OR analitov s koncentracijo 5,0 mg/mL in OR IS s koncentracijo 1,0 mg/mL. Z nadaljnimi redčitvami z zmesjo metanola in vode v razmerju 50:50 (v/v %), smo pripravili posamezne delovne raztopine analitov (DR). Da bi si olajšali delo, smo iz delovnih raztopin pripravili dve zmesi delovnih raztopin analitov, iz teh pa deset kalibracijskih standardov. Iz delovnih raztopin smo pripravili tudi kontrolne vzorce v nizkem (QCL), srednjem (QCM) in visokem (QCH) koncentracijskem območju, in sicer za vsako vrednost po 5 paralelk. Preglednica 5 prikazuje pripravo delovnih raztopin in njihove koncentracije.

Preglednica 5: Delovne raztopine analitov (redčenje OR)

Analit OR = 5,0 mg/mL	Oznaka	Koncentracija (mg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen topila (µL)
CBZ	DR_1	1,8	108	192
CBZ-epo	DR_2	1,2	72	228
OxCBZ	DR_3	2,4	144	156
LiCBZ	DR_4	2,4	144	156
CBZ-diol	DR_5	1,2	72	228
Kloramfenikol (OR = 1,0 mg/mL)	DR_{IS}	0,125	125	875

Iz delovnih raztopin smo pripravili dve zmesi delovnih raztopin ($zmes_1$, $zmes_2$) vseh petih analitov:

- $zmes_1$: iz vsake delovne raztopine analita (DR_1-DR_5) brez kloramfenikola smo odpipetirali 70 µL ter zmes dobro premešali.

- $zmes_2$: odpipetirali smo 25 µL $zmes_1$ ter dodali 375 µL zmesi metanola in vode v razmerju 50:50 (v/v %).

Preglednica 6 prikazuje pripravo in koncentracije kalibracijskih standardov (redčenje $zmes_1$ ali $zmes_2$).

Preglednica 6: Priprava delovnih standardov analitov.

Vodni vzorec	Koncentracija CBZ (µg/mL)	Koncentracija OxCBZ, LiCBZ (µg/mL)	Koncentracija CBZ-epo, CBZ-diol (µg/mL)	Volumen zmesi (µL)	Volumen topila(µL)
c_1	0,9	1,2	0,6	25 $zmes_2$	600
c_2	2,25	3	1,5	30 $zmes_2$	270
c_3	4,5	6	3	25 $zmes_2$	100
c_4	9	12	6	40 $zmes_2$	60
c_5	22,5	30	15	25 $zmes_1$	375
c_6	45	60	30	25 $zmes_1$	175
c_7	90	120	60	25 $zmes_1$	75
c_8	180	240	120	50 $zmes_1$	50
c_9	270	360	180	75 $zmes_1$	25
c_{10}	360	480	240	350 $zmes_1$	0

Preglednica 7 prikazuje pripravo in koncentracije kontrolnih vzorcev QC za plazemske vzorce.

Preglednica 7: Priprava standardov kontrole kakovosti (QC).

Vodni vzorec	Koncentracija CBZ (µg/mL)	Koncentracija OxCBZ, LiCBZ (µg/mL)	Koncentracija CBZ-epo, CBZ-diol (µg/mL)	Volumen zmesi (µL)	Volumen topila (µL)
QCH	270	360	180	150 $zmes_1$	50
QCM	27	36	18	25 QCH	225
QCH	2,7	3,6	1,8	25 QCM	225

3.3.2 Priprava plazemskih kalibracijskih standardov in kontrolnih vzorcev za umeritveno krivuljo in kontrolo kakovosti

Plazemske kalibracijske standarde za validacijo smo pripravili v mikrocentrifugirkah, kjer smo k 250 µL plazme dodali 25 µL vodnih kalibracijskih standardov ter 25 µL delovne raztopine IS. Sledilo je obarjanje plazemskih proteinov, sušenje vzorcev ter ponovno raztapljanje suhega ostanka. Tako pripravljene plazmske vzorce smo analizirali s HPLC.

Preglednica 8 prikazuje koncentracije kalibracijskih standardov analitov za umeritveno krivuljo in koncentracije kontrolnih standardov v plazemskih vzorcih, pripravljenih za analizo s HPLC.

Preglednica 8: Koncentracije kalibracijskih in QC standardov v plazemskih vzorcih.

Plazemski vzorec	Koncentracija CBZ (µg/mL)	Koncentracija OxCBZ, LiCBZ (µg/mL)	Koncentracija CBZ-epo, CBZ-diol (µg/mL)
c_0	0	0	0
c_1	0,075	0,1	0,05
c_2	0,1875	0,25	0,125
c_3	0,375	0,5	0,25
c_4	0,75	1	0,5
c_5	1,875	2,5	1,25
c_6	3,75	5	2,5
c_7	7,5	10	5
c_8	15	20	10
c_9	22,5	30	15
c_{10}	30	40	20
QCL	0,225	0,3	0,15
QCM	2,25	3	1,5
QCH	22,5	30	15

Validacija je trajala 3 dni, zato smo vsak dan smo pripravili svež pufer, 11 plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo ter 9 vzorcev za kontrolo kakovosti (QC).

3.3.3 Priprava vodnih kontrolnih vzorcev za kontrolo uspešnosti ekstrakcije

Iz osnovnih raztopin analitov s koncentracijo 5,0 mg/mL smo pripravili delovne raztopine, ki smo jih nato ustrezno redčili (preglednica 9), da smo dobili iste koncentracije vodnih in plazemskih kontrolnih vzorcev QC (preglednica 8).

Preglednica 9: Priprava delovnih raztopin analitov (redčenje OR)

Analit OR = 5,0 mg/mL	Oznaka	Koncentracija (mg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen topila (µL)
CBZ	DR_1	2,8125	225	175
CBZ-epo	DR_2	1,875	77	125
OxCBZ	DR_3	3,75	75	25
LiCBZ	DR_4	3,75	75	25
CBZ- diol	DR_5	1,875	77	125
Kloramfenikol OR = 1,0 mg/mL	DR_{IS}	0,2604	69	196

Postopek redčenja za pripravo kontrolnih vzorcev QC:

- QCH: iz vsake delovne DR smo odpipetirali 25 µL ter dobro premešali,
- QCM: iz QCH standarda smo odvzeli 25 µL ter dodali 225 µL zmesi metanola in vode v razmerju 50:50 (v/v %),
- QCL: iz QCM standarda smo odvzeli 25 µL ter dodali 225 µL zmesi metanola in vode v razmerju 50:50 (v/v %).

Končne koncentracije vzorcev smo dobili tako, da smo 25 µL kontrolnega vzorca nizke, srednje in visoke koncentracije dodali 25 µL delovne raztopine IS in 250 µL zmesi metanola in vode v razmerju 50:50 (v/v %). Tako pripravljene vzorce smo analizirali s HPLC.

3.3.4 Linearnost

Metoda je linearna, kadar v določenem območju odzivi detektorja sorazmerni koncentraciji analita v vzorcu. Linearna povezava med koncentracijo in odzivom instrumenta je lahko direktna ali pa je dokazljiva preko matematične transformacije (64).

Za dokaz linearnosti je potrebna umeritvena oziroma kalibracijska krivulja, ki jo sestavlja slepi vzorec (prazna plazma), ničelni vzorec (plazma z internim standardom) ter 6 do 8 vzorcev analitov, ki zajemajo celotno koncentracijsko območje, vključno s spodnjo mejo določljivosti (LLOQ) (63).

Iz odzivov (površina pod krivuljo) kalibracijskih standardov smo s pomočjo linearne regresije in z metodo najmanjše vsote kvadratov odstopanj dobili enačbo premice odziv = kc + n, pri čemer vrednosti na abscisi predstavljajo koncentracijo analita, vrednosti na ordinati pa odziv oziroma razmerje površin pod kromatografskima vrhovoma analita in internega standarda. Korelacijo med odzivom in analitom smo ovrednotili s Pearsonovim korelacijskim (r) oziroma determinacijskim koeficientom (r^2).

Kadar imamo kalibracijsko območje, ki obsega več velikostnih redov koncentracije, standardna deviacija ni konstnatna v celotnem intervalu. Višje koncentracije analitov imajo večje odzive in odstopanja, kar pomeni večje prilagajanje premice v tem območju in večji vpliv na vsoto kvadratov ostankov. V tem primeru uporabimo uteženo linearno regresijo, da izboljšamo točnost metode pri nižjih koncentracijah (64).

V našem primeru smo za utež (w_i) uporabili obratno vrednost koncentracije analita (c_i) in obratno vrednostjo njenega kvadrata ($1/c_i^2$), kot je prikazano v enačbi 1 in 2. S pomočjo računalniškega programa MS Excel smo s funkcijo »Reševalec« (Solver) optimizirali naklon (k) in odsek (n) premice tako, da je bila vsota produkta (R_w) uteži in kvadratov odstopanj (e_i) med eksperimentalnimi ($odziv_i$) in izračunanimi ($odziv_i^*$) odzivi najmanjša (enačba 5). Enačbi 3 in 4 sta enačbi neznank, ki smo jih uporabili za končni rezultat v enačbi 5 (65).

$$\mathbf{w_i = \frac{1}{c_i}} \qquad (1)$$

$$\mathbf{w_i = \frac{1}{{c_i}^2}} \qquad (2)$$

$$\mathbf{e_i = odziv_i - odziv_i^*} \qquad (3)$$

$$\mathbf{odziv_i^* = k \cdot c + n} \qquad (4)$$

$$\mathbf{R_w = \sum_i w_i \cdot e_i^2 = \sum_i w_i\,(odziv_i - n - k \cdot c_i)^2} \qquad (5)$$

Po FDA smernicah naj bi najmanj 4 od 6 kalibracijskih standardov (brez slepega in ničelnega vzorca) odstopali manj kot 15 % od nominalne vrednosti oziroma manj kot 20 % pri LLOQ (63).

3.3.5 Spodnja meja določljivosti (LLOQ)

Najnižja koncentracija analita kalibracijske krivulje, ki izpolnjuje naslednje pogoje:

- odziv analita pri LLOQ je vsaj 5-krat večji od odziva slepega vzorca,
- odziv analita je določljiv, dobro ločen od ostalih odzivov s ponovljivostjo (koeficientom variacije) največ 20 % in točnostjo 80-120 % (63).

3.3.6 Točnost

Točnost analitske metode je odstotek ujemanja povprečne vrednosti koncentracije analita, pridobljene z analizno metodo, in teoretične koncentracije analita (enačba 6). Preverili smo jo pri treh različnih koncntracijah (QCL, QCM, QCH), ki so zajemala celotno koncentracijsko območje. V treh različnih dneh smo vsak dan za vsako kontrolno vrednost ponovili pet meritev. Metoda je točna, če povprečna vrednost koncentracije, izračunana iz povprečja odzivov s pomočjo umeritvene premice, odstopa za največ 15 % od teoretične koncentracije, oziroma 20 % za LLOQ (63).

$$\textbf{Točnost} = \frac{\bar{c}_{\textbf{izračunana}}}{c_{\textbf{teoretična}}} \cdot \mathbf{100}\ \% \qquad (6)$$

3.3.7 Ponovljivost

Ponovljivost analizne metode je ujemanje serije ponovljenih meritev analita istega homogenega vzorca pod enakimi pogoji. Ponovljivost je kazalec naključne napake, ki je lahko rezultat našega dela ali pa uporabljene opreme. Za vsak dan validacije smo injicirali pet vzorcev za vsako kontrolno koncentracijo analitov (QCL, QCM, QCH). Iz povprečja petih odzivov analit/IS ($\bar{y}$) in standarnim odklonom (SD, enačba 7) smo izračunali koeficient variacije (CV, enačba 8), ki nam je služil kot merilo ponovljivosti metode. Vrednost CV ne sme odstopati za več kot 15 % oziroma 20 % za LLOQ. Preverili smo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost naše metode za tri dni (63, 64).

$$\mathbf{SD} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{(n-1)}} \qquad (7)$$

$$\mathbf{CV} = \frac{\mathbf{SD}}{\bar{\mathbf{y}}} \cdot \mathbf{100}\ \% \qquad (8)$$

3.3.8 Območje linearnosti

Območje linearnosti je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega je dokazana ponovljivost, točnost in linearnost (64).

3.3.9 Selektivnost

Metoda je selektivna, če loči odziv analita od ostalih komponet v vzorcu. Analizirali smo šest različnih slepih plazem ter ugotavljali morebitna prekrivanja odzivov endogenih komponent plazme in naših analitov pri koncentraciji spodnje meje določljivosti (LLOQ) (63).

3.3.10 Uspešnost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije (recovery) smo preverili s primerjavo odzivov analitov plazemskih in odzivov vodnih kontrolnih vzorcev iste koncentracije. Plazemske vzorce smo pripravili pri treh koncentracijah QC po postopku opisanem v poglavju 3.2.1, vodne QC vzorce pa smo dobili z redčenjem osnovnih in delovnih raztopin naših analitov z ustreznim topilom po postopku opisanem v poglavju 3.3.3. Za plazemske in vodne vzorce smo pripravili ustrezno umeritveno krivuljo. Preverili smo tudi uspešnost ekstrakcije internega standarda. Rezultate smo dobili po enačbi 9, kjer odziv vodnih vzorcev predstavlja 100 % izkoristek. FDA ne zahteva 100 % uspešnosti ekstrakcije, vendar pa morajo biti rezulatati konstantni in ponovljivi, zato smo pri vsaki koncentraciji analizirali 3 paralele (63).

$$\mathbf{Recovery} = \frac{\mathbf{odziv_{plazma}}}{\mathbf{odziv_{voda}}} \cdot \mathbf{100}\ \% \qquad (9)$$

3.3.11 Stabilnost

S preizkušanjem različnih tipov stabilnosti smo ugotavljali spremembo kakovosti analitov med zbiranjem, pripravo, analizo in shranjevanjem vzorca. Stabilnost analita v matriksu (plazmi) tekom analize pomembno vpliva na zanesljivost metode. Izračunali smo spremembe v odzivih analitov po izpostavitvi določenim pogojem in času (64).

3.3.11.1 Stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem

Plazemske kontrolne vzorce nizke in visoke koncentracije (QCL, QCH) smo izpostavili trem ciklom zamrzovanja in odtajanja. Tri paralele vsake koncentracije smo zamrznili pri temperaturi -20 °C, ter jih odtalili na sobni temperaturi po 12, 24 in 36 urah. Po zadnjem ciklu odtajanja vzorcev smo odtalili tudi kontrolne vzorce, ki so ostali zamrzjeni 36 ur, jih analizirali in izračunali spremembo v koncentraciji.

3.3.11.2 Kratkoročna stabilnost

S kratkoročno stabilnostjo dokažemo, da se koncentracija analita v plazmi v času priprave vzorcev pri sobni temperaturi ne spremeni. Pripravili smo po tri paralele kontrolnih vzorcev nizke in visoke koncentracije (QCL, QCH) v plazmi ter jih pustili na sobni temperaturi 6 ur. Nato smo vzorce oborili, posušili ter rekonstituirali. Analizirali smo jih skupaj s kontrolnimi vzorci, katere smo obdelali takoj in jih do analize pustili v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C.

3.3.11.3 Dolgoročna stabilnost

Z dolgoročno stabilnostjo želimo posnemati pogoje v katerih shranjujemo realne plazmske vzorce bolnikov do obdelave in analize. Po tri alikvote QCL in QCH vzorcev v plazmi smo hranili v zamrzovalnik na -20 °C ter jih analizirali po enem mesecu. Rezultate smo primerjali s kontrolnimi vzorci, ki smo jih analizirali takoj.

3.3.11.4 Stabilnost osnovne raztopine

Kontrolirali smo stabilnost osnovnih raztopin vseh petih analitov (5,0 mg/mL v metanolu), ki smo jih za čas validacije hranili v hladilniku na 4 °C. Pred analizo smo osnovne raztopine ustrezno redčili do koncentracije 5,0 in 15,0 µg/mL. Posneli smo odzive analitov svežih raztopin in raztopin, ki smo jih v hladilniku hranili sedem dni. Preverili smo tudi stabilnost OR IS (0,125 µg/mL) po 14 dneh.

3.3.11.5 Stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku

Za dokaz postpreparativne stabilnosti smo kontrolne vzorce nizke in visoke koncentracije (QCL, QCH) oborili, posušili, rekonstituirali ter postavili v avtomatski vzorčevalnik na 4 °C. Pet paralel posamezne koncentracije smo testirali takoj, vzorce pustili v termostatiranem vzorčevalniku ter jih po 24 urah zopet analizirali.

3.3.12 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov

Po končani validaciji smo metodo preizkusili na plazemskih vzorcih bolnikov z epilepsijo, ki so prejemali karbamazepin ali okskarbazepin ali kombinacijo z levetiracetamom ali pregabalinom v različnih odmerkih. Vzorce smo pripravili tako, da smo 250 µL bolnikove plazme dodali 25 µL delovne raztopine internega standarda in 25 µL zmesi vode in metanola v razmerju 50:50 (v/v %) ter sledili postopku opisanem v poglavju 4.1.4.1.

4 Rezultati

4.1 Razvoj metode

4.1.1 Optimizacija priprave plazemskih vzorcev

Cilj optimizacije priprave plazemskih vzorcev je bil v čim krajšem času in na najbolj enostaven način izolirati naše analite iz plazme, vzorce posušiti ter rekonstituirati. Vrednotenje postopka priprave smo izvedli na HPLC-UV instrumentu s pomočjo standardov vseh petih analitov v plazmi pri koncentracijah 0,8 µg/mL in 16,0 µg/mL. Mobilna faza je bila sestavljena iz 50 % metanola in 50 % 25 mM fosfatnega pufra pH 3,0, pretok je znašal 1 mL/min, temperatura kolone je bila 40 °C, valovna dolžina 235 nm, v sistem smo injicirali 5 µL vzorca.

Izbira obarjalnega reagenta

Za obarjanje plazemskih proteinov smo preverili metanol in acetonitril, saj se oba pogosto uporabljata in se dobro mešata s plazmo. Boljše rezultate smo dobili z acetonitrilom ohlajenim na -20 °C, ker je bila ločitev kromatografskih vrhov boljša. Testirali smo tri različne volumne dodanega acetonitrila na 300 µL plazme, in sicer 600, 750 in 900 µL. Za optimalni volumen smo določili 600 µL, saj so pri tej količini acetonitrila rezultati najbolj ponovljivi (preglednica 10).

Preglednica 10: Rezultati ponovljivosti pri različnih razmerjih med plazmo in acetonitrilom.

Analit (c = 16,0 µg/mL)	**Volumen dodanega acetonitrila**		
	600	**750**	**900**
	CV [%]		
CBZ	0,519	4,84	9,40
CBZ-epo	0,559	5,25	9,53
OxCBZ	0,359	4,55	9,72
LiCBZ	0,776	6,09	9,54
CBZ- diol	0,510	7,83	9,75

Določitev volumna supernatanta

Po obarjanju proteinov in centrifugiranju smo preverili različna volumna odvzetega supernatanta ter njun vpliv na rezultate. Maksimalen volumen v insertu je bil 300 µL, vendar pa so bili rezultati pri volumnu 250 µL bolj ponovljivi (preglednica 11). Po okvari prvotne centrifuge za sušenje vzorcev pri podtlaku smo validacijo nadaljevali na drugi, kjer so bili potrebni manjši volumni. Odvzeli smo 125 µL supernatanta, ga posušili ter postopek ponovili, da smo dobili končni volumen 250 µL.

Preglednica 11: Rezultati ponovljivosti pri različnih volumnih supernatanta.

Analit (c = 0,800 µg/mL)	**Volumen odvzetega supernatanta po obarjanju [µL]**	
	250	**300**
	CV [%]	
CBZ	1,81	2,60
CBZ-epo	1,32	2,03
OxCBZ	0,52	2,20
LiCBZ	1,97	0,491
CBZ-diol	0,570	2,99

Izbira pogojev rekonstitucije

Preizkušali smo različne volumne rekonstitucijskega topila (30, 40, 50, 60 µL) ter različne volumske deleže metanola in fosfatnega pufra (60:40, 70:30, 80:20). Kot najbolj optimalno rekonstitucijsko topilo se je izkazalo 40 µL zmesi metanola in pufra v razmerju 80:20 (v/v %), kot je razvidno iz preglednice 12.

Preglednica 12: Rezultati ponovljivosti pri različnih volumnih rekonstitucijskega topila.

Analit (c = 16,0 µg/mL)	**Volumen zmesi metanola in pufra v razmerju 50:50 [µL]**			
	30	**40**	**50**	**60**
	CV [%]			
CBZ	3,20	3,31	16,4	33,0
CBZ-epo	4,66	1,25	15,5	30,5
OxCBZ	2,80	1,97	17,2	32,5
LiCBZ	3,44	2,81	15,2	29,7
CBZ-diol	3,71	3,18	14,6	27,7

V preglednici 13 so zbrani rezultati ponovljivosti pri različnih v/v % metanola in pufra.

Preglednica 13: Ponovljivost pri različnih razmerjih med metanolom in fosfatnim pufrom

Analit (c = 16,0 µg/mL)	**Razmerje metanol:fosfatni pufer pri 80 µL [v/v %]**		
	60:40	**70:30**	**80:20**
	CV [%]		
CBZ	8,39	5,46	4,68
CBZ-epo	9,94	5,82	2,06
OxCBZ	8,74	4,89	2,39
LiCBZ	12,9	6,43	5,54
CBZ-diol	8,10	8,18	3,69

Čas vorteksiranja po dodatku rekonstrukcijskega topila ni bistveno vplival na rezultate analitov, saj je bila ponovljivost po 30 sekundah in 1 minuti primerljiva (preglednica 14). Pri validaciji analizne metode smo vzorce vorteksirali 1 minuto.

Preglednica 14: Ponovljivost po 30 in 60 sekundah vorteksiranja

Analit (c = 16,0 µg/mL)	**Čas vorteksiranja [s]**	
	30	**60**
	CV [%]	
CBZ	0,406	0,429
CBZ-epo	0,137	1,88
OxCBZ	1,32	0,0897
LiCBZ	0,0831	0,229
CBZ-diol	0,794	0,571

4.1.2 Izbira internega standarda

Kot kandidata za interni standard smo analizirali dve spojini: kloramfenikol in guanabenz acetat (0,1 mg/mL, topilo metanol in voda). Pogoji HPLC-UV sistema so bili: različni gradienti, mobilna faza sestavljena iz različnih odstotkov acetonitrila in 50,0 mM fosfatnega pufra pH 5, pretok 1 mL/min, temperatura kolone 30 °C, valovna dolžina 235 nm, volumen injiciranja 20 µL.

Guanabenz acetat se je na različnih kolonah in pri različnih gradientih prekrival z likarbazepinom in imel v kromatogramu dva kromatografska vrhova (nečistota). Kloramfenikol se je izkazal za boljšo izbiro, njegov kromatografski vrh se je umestil med likarbazepin in karbamazepin-10,11-epoksid z retencijskim časom 5,2 minut, kjer ni bilo koelucij endogenih snovi iz plazme.

4.1.3 Optimizacija kromatografije

Izbira kolone

Kot ustrezna kromatografska kolona se je izkazala Luna Phenyl-Hexyl 150 mm × 4,6 mm 5µm. Pri ostalih kolonah je prišlo do prekrivanja kromatografskih vrhov kloramfenikola in karbamazepin-10,11-epoksida.

Razvoj optimalne mobilne faze

Preizkusili smo različne mobilne faze z gradientno in izokratsko elucijo. Začeli smo z različnimi gradienti acetonitrila in fosfatnega pufra, acetonitrila in vode ter metanola in vode, vendar nismo dosegli zadovoljive simetrije vrhov analitov. Z uporabo fenil-heksil kolone smo ugotovili, da je za organski del mobilne faze najprimernejši metanol, saj omogoča π-π interakcije med benzenovi obroči analitov in stacionarno fazo. Končna izbira je bila izokratska metoda z mobilno fazo iz metanola in 25,0 mM kalijevega fosfatnega pufra pH 3,0 (50:50, v/v %).

Izbira optimalne temperature termostata kolone

Izbrana temperatura segrevanja kolone je bila 50 °C, zaradi krajšega časa elucije vzorcev. Retencijski čas zadnjega analita je bil 11,3 minut.

Izbira optimalne valovne dolžine

Pri valovni dolžini 235 nm so bile površine kromatografskih vrhov analitov najmanjše, večje pri 215 nm in največje pri 210 nm. Pri 210 nm so se pojavili dodatni kromatografski vrhovi iz plazme, tako da je bila optimalna valovna dolžina 215 nm.

4.1.4 Končna optimizirana metoda

4.1.4.1 Priprava plazemskih vzorcev

Plazemske vzorce pripravimo tako, da 250 µL plazme dodamo 25 µL kalibracijskega standarda ter 25 µL delovne raztopine internega standarda. Raztopine nato vorteksiramo 30 sekund. Sledi obarjanje plazmeskih proteinov s 600 µL acetonitrila, ohlajenega na -20 °C. Vzorce ponovno vorteksiramo in centrifugiramo 10 minut pri 2500 g in 4 °C. 250 µL supernatanta posušimo v centrigugi za sušenje vzorcev pri podtlaku ter suhi ostanek rekonstituiramo v 40 µL raztopine metanola in fosfatnega pufra (80:20, v/v %). Inserte polnimo v viale za HPLC sistem ter dobro premešamo na vorteksu 1 minuto.

4.1.4.2 HPLC pogoji

Glavni kromatografski pogoji optimizirane metode so zbrani v preglednici 15.

Preglednica 15: Kromatografski pogoji metode.

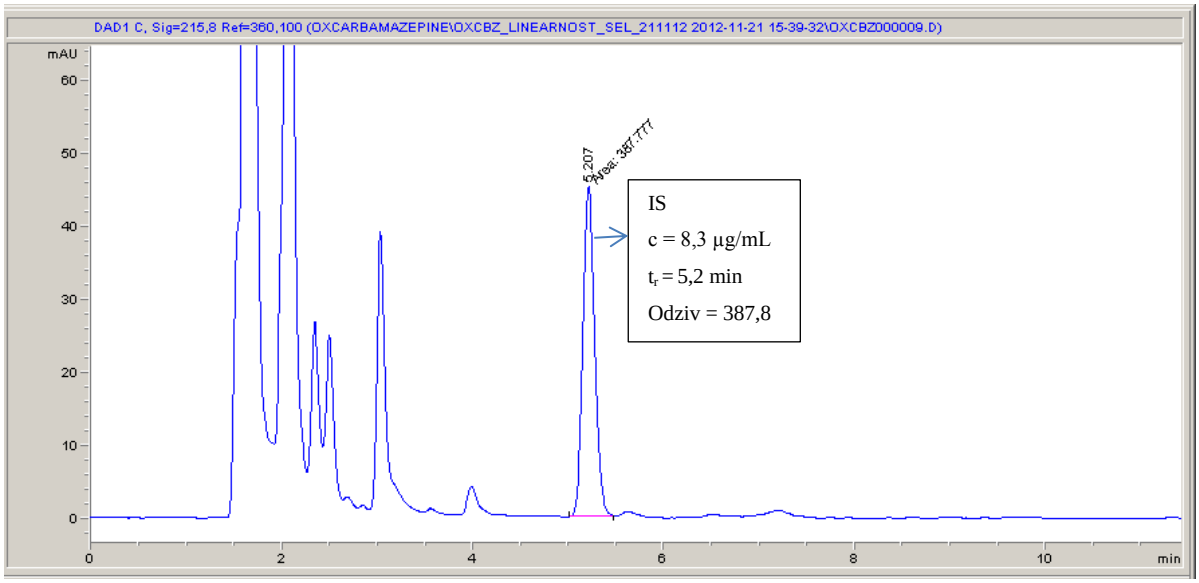
Kolona	Luna Phenyl-Hexyl 150 mm x 4,6 mm 5µm
Mobilna faza	A: 50 % metanol
	B: 50 % 25 mM kalijev fosfatni pufer pH 3
Način dovajanja MF v kolono	Izokratska metoda
Temperatura termostata kolone	50 °C
Pretok	1 mL/min
Volumen injiciranja	5 µL
Nastavitev DAD detektorja	215 nm
Interni standard	kloramfenikol
Čas analize	13 minut

Preglednica 16 prikazuje retencijske čase (t_r) posameznih analitov na kromatogramu.

Preglednica 16: Retencijski časi analitov.

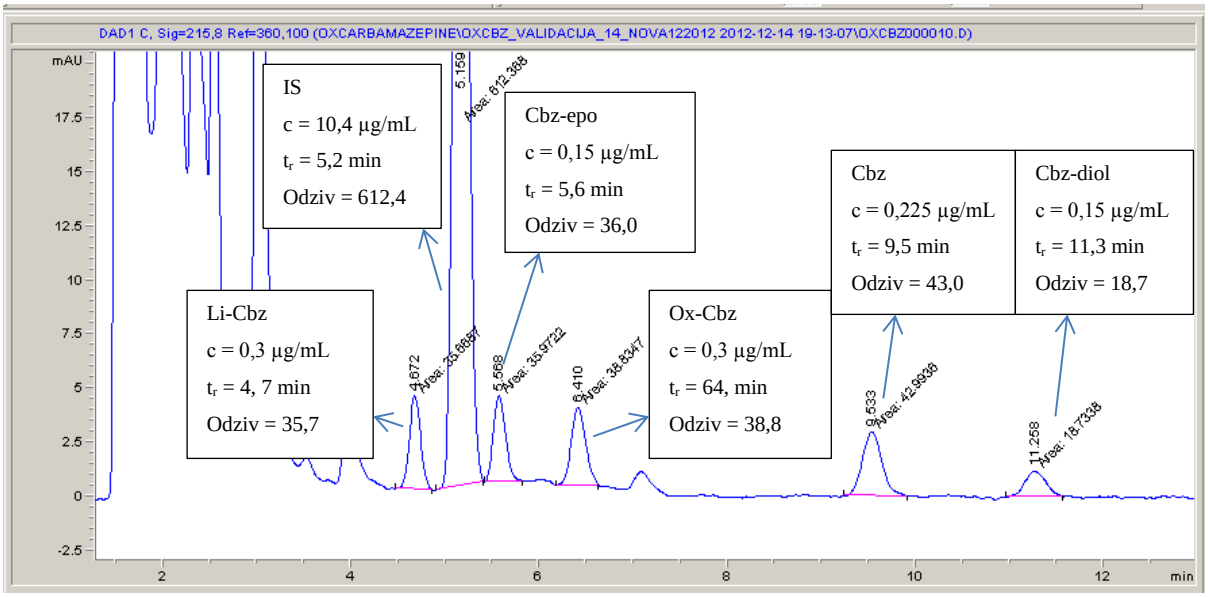
Analit	Retencijski čas (min)
Likarbazepin	4,7
Kloramfenikol	5,2
Karbamazepin-10,11-epoksid	5,6
Okskarbazepin	6,4
Karbamazepin	9,5
10,11-trans-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin	11,3

Slika 5 prikazuje kromatogram slepe plazme z dodanim internim standardom pri koncentraciji 8,3 µg/mL.



Slika 5: Kromatogram plazemskega vzorca z dodanim IS (kloramfenikol).

Slika 6 prikazuje kromatogram plazemskega vzorca z dodanim internim standardom pri nizki koncentraciji kontrolnega vzorca (QCL), kjer je bila koncentracija Cbz 0,225 µg/mL, OxCbz in LiCbz 0,3 µg/mL ter Cbz-epo in Cbz-diol 0,15 µg/mL. Koncentracija kloramfenikola je bila 10,4 µg/mL.



Slika 6: Kromatogram plazemskega vzorca z analiti in IS pri QCL.

4.2 Validacija metode

Validacija metode je trajala tri dni. Vsak dan smo pripravili svež pufer, plazemski vzorec brez analitov z IS, 10 standardnih plazemskih vzorcev z znanimi koncentracijami analitov ter kontrolne vzorce nizke (QCL), srednje (QCM) in visoke (QCH) koncentracije in sicer za vsako koncentracijo smo pripravili 5 alikovotov. Iz rezultatov meritev plazemskih kalibracijskih standardov smo za vsak dan izračunali umeritveno krivuljo z upoštevanjem odzivov IS, medtem ko smo iz kontrolnih vzorcev izračunali točnost in ponovljivost. Uspešnost ekstrakcije, stabilnost ter analizo vzorcev bolnikov smo izvedli v naslednjih treh tednih.

4.2.1 Linearnost

Linearnost metode smo določali s pomočjo umeritvene premice za vsak posamezni analit. Iz odzivov smo iz enačbe premice izračunali vrednosti koncentracij analitov v plazemskih standardih in jih primerjali z dejanskimi. Pri umeritveni enačbi premice ($y = kc + n$) predstavlja y razmerje odziva analit/IS, c pa koncentracijo analita (µg/mL) Pri vseh rezultatih smo upoštevali odziv IS.

Zaradi širokega koncentracijskega območja analitov smo regresijske parametre za enačbo premice dobili s pomočjo utežene linearne regresije.

V primerjavi z utežjo obratne vrednosti koncentracije (1/c), je pri kvadratu obratne vrednosti koncentracije analitov **$1/c^2$** točnost koncentracij analitov višja (preglednica 18), zato smo ga upoštevali pri izračunu vseh validacijskih parametrov.

Metoda ustreza kriterijem FDA za določevanje linearnosti za vse tri dni validacije za vseh pet analitov, saj nobena vrednost ni odstopala za več kot 15 % oz. 20 % pri LLOQ. Rezultati linearnosti so zbrani v preglednicah, za vsak analit posebej. Prikazana so razmerja med odzivi posameznega analita in internega standarda v standardnih plazemskih vzorcih (glej poglavje 3.2.5.2) ter izračunano umeritveno krivuljo, brez in z uporabo uteži ($1/c^2$). Z upoštevanjem utežene linearne regresije smo glede na teoretične koncentracije izračunali točnost kalibracijskih vzorcev posameznega analita za serije treh različnih dni validacije.

Karbamazepin

V preglednici 17 so zbrani rezultati razmerja odzivov Cbz/IS, z uteženo linearno regresijo izračunane enačbe umeritvenih krivulj ter točnosti plazemskih kontrolnih vzorcev.

Preglednica 17: Razmerja odzivov, enačbe umeritvenih krivulj in točnost plazemskih kalibracijskih vzorcev Cbz.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	1. dan		2. dan		3. dan	
	Odziv analit/IS	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**
0	0,00	/	0,00	/	0,00	/
0,075	0,0363	94,5	0,0400	96,1	0,0512	99,0
0,1875	0,0894	110	0,0943	111	0,103	103
0,375	0,169	108	0,153	94,8	**0,220**	/
0,75	**0,384**	/	0,319	103	0,334	96,9
1,875	0,781	104	0,777	103	0,795	95,5
3,75	1,46	97,9	1,605	107	1,77	108
7,5	3,00	101	3,00	100	3,48	107
15	5,77	97,1	6,05	101	6,34	97,2
22,5	8,28	93,1	8,21	91,6	9,05	92,6
30	11,2	94,8	11,1	93,0	13,2	101
Enačba premice ($w_i = 1/c^2$)	y = 0,395x + 0,0083 r^2 = 1,000		y = 0,398x + 0,0114 r^2 = 1,000		y = 0,434x + 0,0191 r^2 = 1,000	
Enačba premice ($w_i = 1$)	y = 0,372x + 0,0666 r^2 = 0,999		y = 0,370x + 0,103 r^2 = 0,998		y = 0,425x + 0,0479 r^2 = 0,997	

Odebeljenih rezultatov zaradi odstopanja nismo upoštevali pri izračunu. R^2 predstavlja determinacijski koeficient.

V preglednici 18 smo za primerjavo navedli koncentracije in točnost kalibracijskih vzorcev Cbz tretjega dne validacije, izračunanih brez uteževanja in z uteženo linearno regresijo.

Preglednica 18: Primerjava točnosti plazemskih kalibracijskih vzorcev Cbz, izračunanih z neuteženo in uteženo linearno regresijo.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	Brez uteževanja $w_i = 1$		Z uteževanjem $w_i = 1/c$		Z uteževanjem $w_i = 1/c^2$	
	$C_{izračunana}$ (µg/mL)	Točnost (%)	$C_{izračunana}$ (µg/mL)	Točnost (%)	$C_{izračunana}$ (µg/mL)	Točnost (%)
0,075	0,0079	10,6	0,0693	92,4	0,0743	99,0
0,1875	0,130	69,2	0,190	102	0,194	103
0,75	0,674	89,9	0,731	97,5	0,727	96,9
1,875	1,76	93,9	1,81	96,5	1,79	95,5
3,75	4,07	109	4,10	109	4,05	108
7,5	8,09	108	8,09	108	7,99	107
15	14,8	98,8	14,8	98,6	14,6	97,2
22,5	21,2	94,3	21,1	93,9	20,8	92,6
30	30,9	103	30,7	102	30,3	101

Karbamazepin-10,11-epoksid

V preglednici 19 so zbrani rezultati razmerja odzivov Cbz-epo/IS, z uteženo linearno regresijo izračunane enačbe umeritvenih krivulj ter točnosti plazemskih kalibracijskih vzorcev.

Preglednica 19: Razmerja odzivov, enačbe umeritvenih krivulj in točnost plazemskih kalibracijskih vzorcev Cbz-epo.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	1. dan		2. dan		3. dan	
	Odziv analit/IS	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**
0	0,00	/	0,00	/	0,00	/
0,05	0,0540	94,0	0,0544	94,8	0,0607	101
0,125	0,0896	113	0,0872	111	0,0881	98,1
0,25	0,135	104	0,130	103	**0,166**	/
0,5	**0,273**	/	0,222	102	0,226	96,9
1,25	0,539	106	0,496	102	0,492	94,8
2,5	0,974	98,8	1,01	108	1,08	109
5	1,94	100	1,83	99,2	2,08	107
10	3,70	96,5	3,60	98,7	3,75	97,4
15	5,35	93,3	4,89	89,6	5,40	94,0
20	7,23	94,7	6,74	92,7	7,75	101
Enačba premice ($w_i = 1/c^2$)	y = 0,380x + 0,0362 r^2 = 1,000		y = 0,361x + 0,0373 r^2 = 1,000		y = 0,380x + 0,0415 r^2 = 1,000	
Enačba premice ($w_i = 1$)	y = 0,357x + 0,0728 r^2 = 1,000		y = 0,332x + 0,0918 r^2 = 0,998		y = 0,375x + 0,0578 r^2 = 0,997	

Odebeljenih rezultatov zaradi odstopanja nismo upoštevali pri izračunu. R^2 predstavlja determinacijski koeficient.

Okskarbazepin

V preglednici 20 so zbrani rezultati razmerja odzivov OxCbz/IS, z uteženo linearno regresijo izračunane enačbe umeritvenih krivulj ter točnosti plazemskih kalibracijskih vzorcev.

Preglednica 20: Razmerja odzivov, enačbe umeritvenih krivulj in točnost plazemskih kalibracijskih vzorcev OxCbz.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	1. dan		2. dan		3. dan	
	Odziv analit/IS	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**
0	0,00	/	0,00	/	0,00	/
0,1	0,0813	102	0,0753	96,6	0,0819	98,3
0,25	0,113	93,6	0,120	107	0,126	106
0,5	0,178	100	0,187	105	**0,212**	/
1	**0,355**	/	**0,573**	/	0,300	92,9
2,5	0,688	104	0,677	96,1	0,668	93,7
5	1,26	99,1	1,42	105	1,47	108
10	2,54	102	2,64	99,1	2,83	106
20	4,97	101	5,44	103	5,19	98,2
30	7,21	98,3	7,39	93,8	7,47	94,6
40	9,66	98,9	10,0	95,4	10,7	102
Enačba premice ($w_i = 1/c^2$)	y = 0,243x + 0,0565 r^2 = 1,000		y = 0,261x + 0,0501 r^2 = 1,000		y = 0,261x + 0,0563 r^2 = 1,000	
Enačba premice ($w_i = 1$)	y = 0,240x + 0,0792 r^2 = 1,000		y = 0,249x + 0,111 r^2 = 0,998		y = 0,260x + 0,0643 r^2 = 0,998	

Odebeljenih rezultatov zaradi odstopanja nismo upoštevali pri izračunu. R^2 predstavlja determinacijski koeficient.

Likarbazepin

V preglednici 21 so zbrani rezultati razmerja odzivov LiCbz/IS, z uteženo linearno regresijo izračunane enačbe umeritvenih krivulj ter točnosti plazemskih kalibracijskih vzorcev.

Preglednica 21: Razmerja odzivov, enačbe umeritvenih krivulj in točnost plazemskih kalibracijskih vzorcev LiCbz.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	1. dan		2. dan		3. dan	
	Odziv analit/IS	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**
0	0,00	/	0,00	/	0,00	/
0,1	0,0288	98,3	0,0336	95,4	0,0505	98,3
0,25	0,0703	104	0,0861	112	0,0973	105
0,5	0,132	100	0,145	97,0	**0,198**	/
1	**0,315**	/	0,301	103	0,294	95,5
2,5	0,687	106	0,733	102	0,696	94,8
5	1,28	99,4	1,57	110	1,58	109,4
10	2,62	101	2,90	101	3,06	107,1
20	5,08	98,4	5,61	98,1	5,51	96,6
30	7,38	95,4	7,69	89,6	7,99	93,4
40	10,0	97,3	10,6	92,7	11,3	99,6
Enačba premice ($w_i = 1/c^2$)	y = 0,258x + 0,0034 r^2 = 1,000		y = 0,286x + 0,0063 r^2 = 1,000		y = 0,284x + 0,0225 r^2 = 1,000	
Enačba premice ($w_i = 1$)	y = 0,249x + 0,0372 r^2 = 1,000		y = 0,262x + 0,1005 r^2 = 0,998		y = 0,276x + 0,0626 r^2 = 0,998	

Odebeljenih rezultatov zaradi odstopanja nismo upoštevali pri izračunu. R^2 predstavlja determinacijski koeficient.

10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin

V preglednici 22 so zbrani rezultati razmerja odzivov Cbz-diol/IS, z uteženo linearno regresijo izračunane enačbe umeritvenih krivulj ter točnosti plazemskih kalibracijskih vzorcev.

Preglednica 22: Razmerja odzivov, enačbe umeritvenih krivulj in točnost plazemskih kalibracijskih vzorcev Cbz-diol.

$C_{teoretična}$ (µg/mL)	1. dan		2. dan		3. dan	
	Odziv analit/IS	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**	**Odziv analit/IS**	**Točnost (%)**
0	0,00	/	0,00	/	0,00	/
0,05	0,0163	101	0,0129	94,7	0,0134	99,0
0,125	0,0355	100	0,0376	113	0,0349	103
0,25	0,0639	94,6	0,0639	96,8	**0,0860**	/
0,5	**0,158**	/	0,138	105	0,132	97,1
1,25	0,344	107	0,338	103	0,331	97,6
2,5	0,642	100	0,692	106	0,734	108
5	1,32	103	1,30	99,2	1,444	106
10	2,57	101	2,62	99,9	2,63	96,6
15	3,68	96,0	3,57	90,7	3,75	92,0
20	5,01	98,0	4,85	92,4	5,47	101
Enačba premice ($w_i = 1/c^2$)	y = 0,256x + 0,0035 r^2 = 1,000		y = 0,262x + 0,0004 r^2 = 1,000		y = 0,272x r^2 = 1,000	
Enačba premice ($w_i = 1$)	y = 0,249x + 0,0232 r^2 = 1,000		y = 0,242x + 0,0407 r^2 = 0,998		y = 0,265x + 0,0142 r^2 = 0,997	

Odebeljenih rezultatov zaradi odstopanja nismo upoštevali pri izračunu. R^2 predstavlja determinacijski koeficient.

4.2.2 Spodnja meja določljivosti (LLOQ)

Spodnja meja določljivosti predstavlja najnižjo koncentracijo analita iz kalibracijske krivulje, za katero je dovoljeno 20 % odstopanje v točnosti. Hkrati mora biti njen odziv vsaj 5-krat višji od odziva slepe plazme.

V preglednici 23 so navedene vrednosti LLOQ za posamezne analite, ki ustrezajo smernicam FDA. Odziv (površina pod krivuljo) in točnost analitov sta navedena za prvi validacijski dan.

Preglednica 23: Spodnja meja določljivosti za posamezne analite, njen odziv in točnost

Analit	LLOQ (µg/mL)	Odziv	Točnost (%)
Cbz	0,075	15,2	94,5
Cbz-epo	0,250	56,0	104
OxCbz	0,100	35,9	102
LiCbz	0,100	13,4	98,3
Cbz-diol	0,050	6,70	101

4.2.3 Točnost

Točnost analizne metode smo določili z analizo kontrolnih vzorcev (QC) v treh različnih koncentracijah in petih ponovitvah po smernicah FDA (poglavje 3.2.5.5). Povprečna vrednost izračunane koncentracije posameznega QC vzorca ne sme odstopati za več kot 15 % od teoretične oziroma 20 % pri LLOQ.

Pri enem vzorcu visoke koncentracije (QCH) iz prvega dne točnost analitov ni podana, zaradi napake pri pripravi vzorca.

Karbamazepin

V preglednici 24 so zbrani izračunani podatki točnosti analizne metode za Cbz na podlagi QC vzorcev, ki smo jih dobili v treh različnih dneh validacije.

Preglednica 24: Točnost metode za karbamazepin.

Vzorec	Točnost (%)								
	QCL (c = 0,225 µg/mL)			QCM (c = 2,25 µg/mL)			QCH (c = 22,5 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	110	104	108	112	99,6	106	95,5	91,6	101
2.	106	94,6	108	104	89,9	106	92,0	88,0	101
3.	103	103	110	105	94,9	108	89,5	92,4	100
4.	106	98,1	110	106	97,0	112	86,8	95,5	115
5.	110	101	114	102	101	105	/	93,1	114
Povp.	107	100	110	106	96,5	108	90,9	92,1	106

Točnost metode za karbamazepin ustreza smernicam FDA za vse tri dni validacije.

Karbamazepin-10,11-epoksid

V preglednici 25 so zbrani izračunani podatki točnosti analizne metode za Cbz-epo na podlagi QC vzorcev, ki smo jih dobili v treh različnih dneh validacije.

Preglednica 25: Točnost metode za karbamazepin-10,11-epoksid.

Vzorec	Točnost (%)								
	QCL (c = 0,150 µg/mL)			QCM (c = 1,50 µg/mL)			QCH (c = 15,0 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	**118**	98,0	108	110	96,1	106	94,3	87,7	101
2.	104	99,9	108	104	90,8	106	91,1	86,1	101
3.	**117**	114	110	106	91,9	108	89,6	88,7	100
4.	110	102	110	103	94,5	112	87,2	91,1	115
5.	104	106	114	104	98,9	105	/	90,0	114
Povp.	110	104	110	106	94,4	108	90,6	88,7	106

Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah FDA.

Točnost metode za Cbz-epo ustreza smernicam FDA za vse tri dni validacije.

Okskarbazepin

V preglednici 26 so zbrani izračunani podatki točnosti analizne metode za OxCbz na podlagi QC vzorcev, ki smo jih dobili v treh različnih dneh validacije.

Preglednica 26: Točnost metode za okskarbazepin.

Vzorec	Točnost (%)								
	QCL (c = 0,300 µg/mL)			QCM (c = 3,00 µg/mL)			QCH (c = 30,0 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	89,5	106	**150**	111	94,9	101	99,2	93,4	96,7
2.	94,2	107	90,7	104	88,1	102	96,1	90,3	97,1
3.	100	**162**	101	106	93,5	104	93,8	94,2	96,7
4.	110	**146**	92,9	106	92,2	106	92,0	96,7	111
5.	**128**	98,8	96,2	103	96,7	100	/	94,4	110
Povp.	104	**124**	106	106	93,1	103	95,3	93,8	102

Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah FDA.

Točnost metode za okskarbazepin ne ustreza smernicam FDA za drugi dan validacije za QCL, saj povprečna vrednost odstopa za več kot 15 %.

Likarbazepin

V preglednici 27 so zbrani izračunani podatki točnosti analizne metode za LiCbz na podlagi QC vzorcev, ki smo jih dobili v treh različnih dneh validacije.

Preglednica 27: Točnost metode za likarbazepin.

Vzorec	Točnost (%)								
	QCL (c = 0,300 µg/mL)			QCM (c = 3,00 µg/mL)			QCH (c = 30,0 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	109	102	91,3	112	97,1	104	95,6	91,0	96,0
2.	105	94,0	101	106	96,3	107	92,5	90,3	95,6
3.	111	100	108	108	97,1	106	92,1	91,8	95,4
4.	111	89,5	110	105	97,1	109	89,7	94,2	110
5.	103	97,9	111	106	102	102	/	94,3	108
Povp.	108	96,8	104	108	97,9	105	92,5	92,3	101

Točnost metode za likarbazepin ustreza smernicam FDA za vse tri dni validacije.

10,11-trans-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin

V preglednici 28 so zbrani izračunani podatki točnosti analizne metode za Cbz-diol na podlagi QC vzorcev, ki smo jih dobili v treh različnih dneh validacije.

Preglednica 28: Točnost metode za 10,11-trans-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin.

Vzorec	Točnost (%)								
	QCL (c = 0,150 µg/mL)			QCM (c = 1,50 µg/mL)			QCH (c = 15,0 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	99,6	103	**137**	115	100	104	98,5	92,2	98,1
2.	102	97,4	**122**	107	90,5	104	95,0	88,5	97,9
3.	106	100	**121**	110	95,5	107	92,4	93,0	97,6
4.	95,6	97,4	114	110	97,3	112	89,7	96,8	112
5.	104	103	**132**	104	101	104	/	93,8	111
Povp.	101	100	**125**	109	96,9	106	93,9	92,8	103

Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah FDA.

Točnost metode za 10,11-trans-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin ne ustreza smernicam FDA za tretji dan validacije za QCL, saj povprečna vrednost odstopa za več kot 15 %.

4.2.4 Ponovljivost

Ponovljivost analizne metode smo določili z analizo kontrolnih vzorcev (QC) v treh različnih koncentracijah in petih ponovitvah po smernicah FDA (poglavje 3.2.5.6). Ovrednotili smo jo s koeficientom variacije (CV), ki smo ga izračunali znotraj enega dneva in med celotnimi tremi dnevi validacije.

Znotrajdnevna ponovljivost

Preglednica 29 prikazuje rezultate ponovljivosti za posamezne dni validacije za preiskovane analite.

Preglednica 29: Znotrajdnevna ponovljivost metode.

Analit	Koeficient variacije (%)								
	QCL			QCM			QCH		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
Cbz	2,81	3,77	2,17	3,49	4,52	2,57	4,06	2,97	7,15
Cbz-epo	6,09	5,98	4,61	2,70	3,45	2,44	3,26	2,23	7,14
OxCbz	14,7	**22,8**	**23,3**	2,87	3,49	2,42	3,27	2,43	7,16
LiCbz	3,51	5,28	7,87	2,71	2,32	2,38	2,63	1,97	7,25
Cbz-diol	3,91	2,90	7,37	3,70	4,37	3,11	4,01	3,23	7,11

Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah FDA.

Znotrajdnevna ponovljivost ustreza smernicam FDA za vse preiskovane analite, razen za kontrolni vzorec okskarbazepina nizke koncentracije (QCL) za drugi in tretji dan validacije.

Meddnevna ponovljivost

Preglednica 30 prikazuje povprečje odzivov analit/IS za vse tri dni validacije in izračunano ponovljivost metode.

Preglednica 30: Meddnevna ponovljivost metode.

Analit	QCL		QCM		QCH	
	Povp. odzivov analit/IS	CV (%)	Povp. odzivov analit/IS	CV (%)	Povp. odzivov analit/IS	CV (%)
Cbz	0,238	4,83	2,32	5,73	21,7	8,76
Cbz-epo	0,159	3,69	1,52	6,04	14,1	7,81
OxCbz	0,334	9,64	3,02	6,70	29,1	4,59
LiCbz	0,309	5,40	3,11	4,88	28,6	5,23
Cbz-diol	0,164	13,0	1,56	6,06	14,5	5,92

Meddnevna ponovljivost metode ustreza smernicam FDA za vse preiskovane analite.

4.2.5 Območje linearnosti

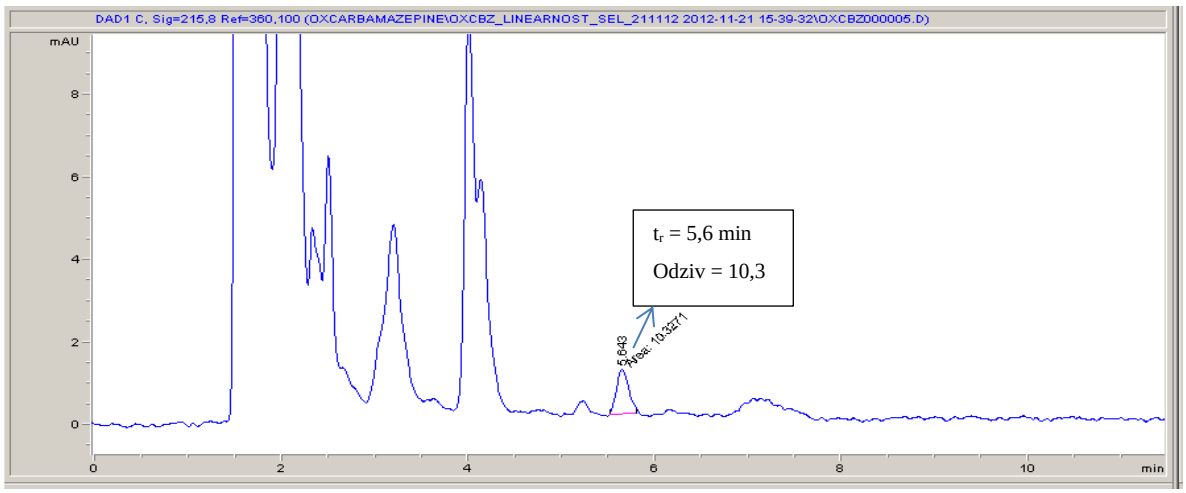
Preglednica 31 prikazuje območje linearnosti posameznih analitov, v katerem je bila dokazana ponovljivost, točnost in linearnost.

Preglednica 31: Območje linearnosti posameznih analitov.

Analit	Območje linearnosti (µg/mL)
Karbamazepin	0,075 – 30,0
Karbamazepin-10,11-epoksid	0,250 – 20,0
Okskarbazepin	0,100 – 40,0
Likarbazepin	0,100 – 40,0
10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin	0,050 – 20,0

4.2.6 Selektivnost

S selektivnostjo smo preverili prekrivanje kromatografskih vrhov analitov in internega standarda z vrhovi endogenih substanc v plazmi (koelucija). Testirali smo šest različnih slepih plazem zdravih preiskovancev. Pri štirih vzorcih se je na retencijskem času (t_R) karbamazepin-10,11-epoksida (5,6 minut) pojavil vrh spojine iz matriksa, katerega največji odziv je znašal 10 (kromatogram slepe plazme je na skliki 7). Po FDA smernicah naj bi bil odziv analita pri LLOQ vsaj pet krat večji od odziva spojine iz slepe plazme. Posledično smo mejo kvantifikacije naše metode dvignili na tretjo najnižjo koncentracijo umeritvene krivulje (0,25 µg/mL), katere površina pod krivuljo je dovolj velika in znaša približno 56.



Slika 7: Slepa plazme C z vrhom spojine iz matrika.

4.2.7 Uspešnost ekstrakcije

Pri preverjanju uspešnosti ekstrakcije (recovery) smo primerjali odzive analitov plazemskih z vodnimi kontrolnimi vzorci (QC). Za vsako koncentracijo smo pripravili 3 paralele ter s tem dokazali ponovljivost rezultatov. Pri izračunu izkoristka ekstrakcije smo povprečni odziv plazemskega vzorca delili s povprečnim odzivom vodnega vzorca ter pomnožili s 100. Po istem postopku smo preverili tudi izkoristek kloramfenikola. Rezultati so zbrani v preglednici 32.

Preglednica 32: Uspešnost ekstrakcije analitov iz plazme ter njihova variabilnost (CV).

Analit	Konc. (µg/mL)	Vodni vzorci		Plazemski vzorci		Recovery (%)
		Povp. odziv.	CV (%)	Povp. odziv	CV (%)	
Cbz	0,225	23,4	0,855	25,0	3,56	**107**
	2,25	212	0,206	245	4,77	**116**
	22,5	1955	0,980	2249	1,36	**115**
Cbz-epo	0,150	15,3	2,48	15,6	6,56	**102**
	1,50	145	0,48	160	5,22	**110**
	15,0	1339	1,02	1463	1,80	**109**
Oxcbz	0,300	18,4	1,13	16,0	6,16	**87,1**
	3,00	176	0,711	178	4,46	**101**
	30,0	1624	0,970	1770	1,75	**109**
LiCbz	0,300	20,4	1,13	21,7	4,12	**106**
	3,00	196	0,641	217	5,40	**111**
	30,0	1806	0,999	1989	1,78	**110**
Cbz-diol	0,150	10,6	3,32	12,1	4,15	**115**
	1,50	102	0,540	116	5,39	**114**
	15,0	946	0,827	1055	1,75	**112**
IS	0,125	192	0,578	196	2,08	**102**
	0,125	191	0,580	205	5,12	**108**
	0,125	182	0,889	202	1,91	**111**

4.2.8 Stabilnost

Stabilnost plazemskih vzorcev z analiti smo določili v skladu s smernicami FDA po postopkih opisanih v poglavju 3.2.5.10. Testirali smo po tri paralele nizke (QCL) in visoke koncentracije (QCH) kontrolnih vzorcev. Rezultati posameznih tipov stabilnosti so zbrani v preglednicah 33-37.

4.2.8.1 Stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem

Preglednica 33 prikazuje povprečne spremembe v koncentraciji analitov po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja pri dveh vrednostih plazemskih kontrolnih vzorcev (QC).

Preglednica 33: Stabilnost analitov med zamrzovanjem in odtajanjem.

Analit	**Povprečna sprememba koncentracije (%); (n = 3)**	
	QCL	**QCH**
Cbz	5,68	4,84
Cbz-epo	5,45	4,72
OxCbz	-0,449	3,17
LiCbz	3,17	3,96
Cbz-diol	3,85	4,72

4.2.8.2 Kratkoročna stabilnost

Preglednica 34 prikazuje povprečne spremembe v koncentraciji analitov po testiranju kratkoročne stabilnosti pri dveh vrednostih plazemskih kontrolnih vzorcev (QC), kjer smo neobdelane plazemske vzorce z analiti 6 ur pustili na sobni temperaturi ter nato nadaljevali z analizo. Rezultate smo primerjali s kontrolnimi vzorci, ki smo jih analizirali takoj.

Preglednica 34: Kratkoročna stabilnost analitov.

Analit	Povprečna sprememba koncentracije (%) po 6h glede na t = 0h; (n = 3)	
	QCL	QCH
Cbz	0,0764	1,34
Cbz-epo	-0,0268	0,199
OxCbz	5,49	-0,808
LiCbz	2,62	0,071
Cbz-diol	-4,32	1,31

4.2.8.3 Dolgoročna stabilnost

Preglednica 35 prikazuje povprečne spremembe v koncentraciji analitov po testiranju dolgoročne stabilnosti pri dveh vrednostih plazemskih kontrolnih vzorcev (QC).

Neobdelane plazemske vzorce z analiti smo zamrznili na -20 °C ter jih po enem mesecu odtalili in analizirali. Rezultate smo primerjali s kontrolnimi vzorci, ki smo jih analizirali takoj.

Preglednica 35: Dolgoročna stabilnost analitov.

Analit	Povprečna sprememba koncentracije (%) po 1 mesecu glede na t = 0h; (n = 3)	
	QCL	QCH
Cbz	-1,64	1,72
Cbz-epo	16,2	-4,51
OxCbz	-13,8	-3,48
LiCbz	-14,9	-3,99
Cbz-diol	-0,829	-1,99

4.2.8.4 Stabilnost osnovne raztopine

Preglednica 36 prikazuje povprečne razlike v odzivu vodnih raztopin analitov po testiranju stabilnosti osnovne raztopine pri koncentraciji 5,0 in 15,0 µg/mL, kjer smo primerjali odzive sveže pripravljenih raztopin in raztopin, ki smo jih pri 4 °C hranili 1 teden. Preverili smo tudi stabilnost osnovne raztopine kloramfenikola po 14 dneh (c = 0,125 µg/mL).

Preglednica 36: Stabilnost osnovnih raztopin analitov in kloramfenikola.

Analit	**Povprečna razlika v odzivu (%) po 1 tednu glede na t = 0h; (n = 3)**	
	5,00 µg/mL	**15,0 µg/mL**
Cbz	0,704	-6,85
Cbz-epo	8,60	11,8
OxCbz	-4,67	-3,40
LiCbz	3,31	-0,870
Cbz-diol	-2,23	-4,68
	Povprečna razlika v odzivu (%) po 2 tednih glede na t = 0h; (n = 3)	
	0,125 µg/mL	
Kloramfenikol	25,9	

4.2.8.5 Stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku

Preglednica 37 prikazuje povprečne spremembe v koncentraciji analitov pri testiranju post-preparativne stabilnosti plazemskih kontrolnih vzorcev (QC), kjer smo pripravljene vzorce pustili v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C 24 ur ter jih nato analizirali. Rezultate smo primerjali s kontrolnimi vzorci, ki smo ji analizirali takoj. Za vsako vrednost QC vzorcev smo pripravili pet paralel.

Preglednica 37: Post-preparativna stabilnost analitov.

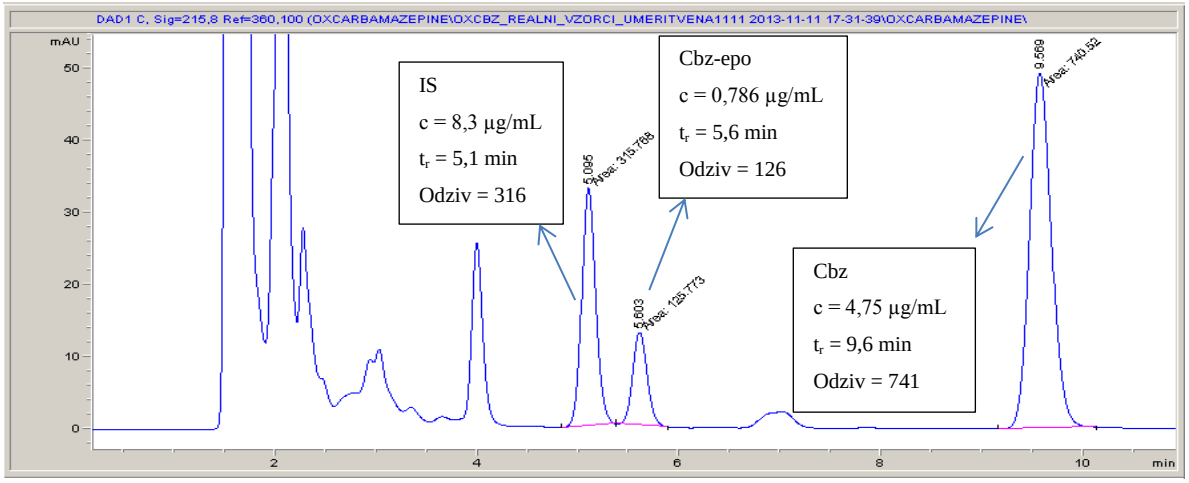
Analit	Povprečna sprememba koncentracije (%) po 24h glede na t = 0h; (n = 5)		
	QCL	QCM	QCH
Cbz	4,19	0,895	0,547
Cbz-epo	4,23	0,395	-0,289
OxCbz	-2,31	0,339	1,576
LiCbz	1,06	0,374	-0,420
Cbz-diol	2,42	-0,281	-1,82

4.2.9 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov

Z validirano metodo smo določili plazemske koncentracije analitov v vzorcih bolnikov z epilepsijo, ki so prejemali karbamazepin ali okskarbazepin, samostojno ali v kombinaciji z drugimi protiepileptičnimi učinkovinami. Postopek priprave vzorcev je opisan v poglavju 3.3.12. Koncentracije učinkovin in njunih presnovkov smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj iz kalibracijskih vzorcev, ki smo jih pripravili istega dne in z upoštevanjem internega standarda.

Na sliki 8 je primer kromatograma bolnika, ki je 2 krat dnevno prejemal 800 mg karbamazepina, na sliki 9 pa primer kromatograma bolnika, ki je 2 krat dnevno prejemal 900 mg okskarbazepina.

Preglednici 38 in 39 prikazujeta rezultate vzorcev bolnikov, ki so prejemali karbamazepin ali okskarbazepin.



Slika 8: Kromatogram plazemskega vzorca bolnika s šifro 35, ki je prejemal Cbz.

Preglednica 38: Realni plazemski vzorci bolnikov, ki prejemajo karbamazepin.

Šifra bolnika	Odmerek (mg)	Površina pod krivuljo (odziv)				Izračunana koncentracija (µg/mL)		
		Cbz	Cbz epo	Cbz diol	IS	Cbz	Cbz epo	Cbz diol
7[a]	2× 200	552	89,7	0,00	294	3,81	0,601	/
10	2× 800	703	118	0,00	298	4,78	0,780	/
15	2× 400	340	33,7	0,00	290	2,37	0,219	/
21	2× 200	300	41,4	0,00	273	2,22	0,291	/
27[b]	2× 400	798	229	0,00	324	4,99	1,41	/
28[c]	2× 400	636	110	0,00	301	4,28	0,724	/
34[d]	2× 800	1208	226	0,00	440	5,56	1,02	/
35[e]	2× 800	741	126	0,00	316	4,75	0,786	/
36[f]	2× 400	679	96,8	0,00	344	4,00	0,553	/

[a] Bolnik je dodatno prejemal lakozamid (2× 100 mg).

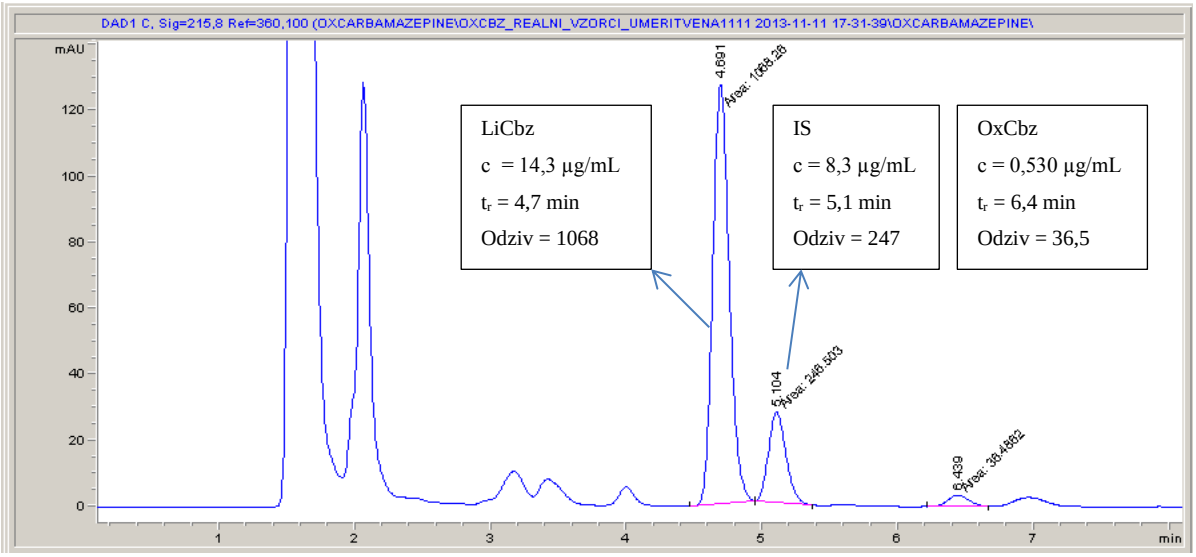
[b] Bolnik je dodatno prejemal levetiracetam (2× 1000 mg) in klobazam (2× 10 mg).

[c] Bolnik je dodatno prejemal levetiracetam (2× 1000 mg).

[d] Bolnik je dodatno prejemal pregabalin (150 mg + 225 mg).

[e] Bolnik je dodatno prejemal levetiracetam (2× 500 mg).

[f] Bolnik je dodatno prejemal pregabalin (2× 150 mg).



Slika 9: Kromatogram plazemskega vzorca bolnika s šifro 4, ki je prejemal OxCbz.

Preglednica 39: Realni plazemski vzorci bolnikov, ki prejemajo okskarbazepin.

Šifra bolnika	Odmerek (mg)	Površina pod krivuljo (odziv)				Izračunana koncentracija (µg/mL)		
		Ox Cbz	Li Cbz	Cbz diol	IS	Ox Cbz	Li Cbz	Cbz diol
4[a]	2× 900	36,5	1068	0,00	247	0,530	14,3	/
13[b]	2× 600	8,80	806	0,00	246	0,0122	10,8	/
29[c]	2× 900	35,5	1734	0,00	250	0,501	23,0	/

[a] Bolnik je uvajal topiramat (2× 50 mg) in ukinjal okskarbazepin.

[b] Bolnik je dodatno prejemal levetiracetam (2× 1500 mg).

[c] Bolnik je dodatno prejemal levetiracetam (2× 1000 mg).

5 Razprava

V okviru diplomske naloge smo razvili in validirali metodo za določanje in spremljanje (TDM) plazemskih koncentracij dveh protiepileptičnih učinkovin ter njunih presnovkov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in UV detekcijo. Analizna metoda je preprosta za uporabo zaradi enostavnega postopka deproteinizacije in nezahtevnih kromatografskih pogojev.

5.1 Razvoj metode

Pri izbiri postopka ekstrakcije učinkovin iz plazme smo si pomagali s člankom Continove (26), ki je s sodelavci razvila postopek, kjer so proteine oborili z acetonitrilom, vorteksirali ter centrifugirali 10 minut pri 2500 g in 4 °C ter nato supernatant injicirali v kromatografski sistem. Postopek smo prilagodili tako, da smo uporabili 300 µL plazme, 600 µL acetonitrila (ohlajenega na -20 °C), odvzeli 250 µl supernatanta ter ga posušili v centrifugi za sušenje vzorcev pri podtlaku. Ostanek smo ponovno raztopili v 40 µL raztopine metanola in fosfatnega pufra (80:20, v/v %). Postopek je enostaven, zamudno je le sušenje vzorcev.

Pri razvoju kromatografije smo preverili štiri različne kromatografske kolone. Vrhovi preiskovanih analitov so se zaradi aromatske strukture najbolje ločili s pomočjo kolone Luna Phenyl-Hexyl 150 mm × 4,6 mm 5µm. Pri ostalih kolonah je prišlo do prekrivanja vrhov karbamazepin-10,11-epoksida in kloramfenikola. Uporabljali smo različne gradiente organskega in vodnega dela mobilne faze, vendar smo ugotovili, da je uporaba izokratske metode bolj smoterna, saj se čas analize bistveno ne spremeni, pa tudi enostavnejša je za rutinsko uporabo. Mobilna faza je sestavljena iz 50 % metanola in 50 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,0. Metanol v primerjavi z acetonitrilom daje boljšo ločbo, saj omogoča π-π interakcije med benzenovimi obroči analitov in stacionarno fazo fenil-heksil kolone. Z večanjem deleža metanola v mobilni fazi se retencijski časi skrajšajo, vendar se ločba analitov poslabša. Čas analize se skrajša tudi z višanjem pH fosfatnega pufra.

Zaradi krajšega časa elucije vzorcev, smo temperaturo kromatografsko kolono nastavili na 50 °C, pretok mobilne faze pa na 1 mL/min.

Kot interni standard smo izbrali kloramfenikol, z retencijskim časom 5,2 min.

Guanabenz acetat se je na različnih kolonah in gradientih prekrival z likarbazepinom in imel v kromatogramu dva vrhova, kar kaže na nečistoto oziroma razpad spojine pri danih pogojih kromatografije.

Analite smo določili s pomočjo UV detekcije, saj vsi absorbirajo svetlobo v UV območju brez derivatizacije. Zaradi preproste priprave vzorca z obarjanjem proteinov so pri absorpcijskih maksimumih detekcijo ovirali vrhovi proteinov. Površine vrhov so bile tako največje pri 210 nm, najmanjše pri 235 nm, kot optimalno valovno dolžino smo izbrali 215 nm. Pri preverjanju selektivnosti pri 215 nm se je pri 4 od 6 različnih slepih plazem pojavil vrh spojine iz matriksa, ki se prekriva z karbamazepin-10,11-epoksidom. V primeru prisotnosti tega vrha na kromatogramu, bi bilo potrebno za to spojino posneti odziv pri 235 nm, kjer pri t_r = 5,6 min ni vrha iz plazme.

5.2 Validacija metode

Razvito metodo smo validirali po smernicah, ki jih priporoča FDA za bioanalizne metode. Razprava se nanaša na rezultate validacije, kjer je pri izračunih upoštevan interni standard in utežena linearna regresija.

5.2.1 Linearnost in območje

Metoda je linearna v območju 0,075-30 µg/mL za karbamazepin, 0,1-40 µg/mL za okskarbazepin in likarbazepin, 0,25-20 µg/mL za karbamazepin-10,11-epoksid in 0,05-20 µg/mL za 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin. Vrednost determinacijskega koeficienta (r^2) je bila vse tri dni validacije enaka pri vseh analitih in je znašala 1,000. Metoda zajema celotno referenčno območje karbamazepina in okskarbazepina, ki sta 4-12 µg/mL in 3-35 µg/mL. V primerjavi z metodo, ki so jo razvili Fortuna in sodelavci, smo dosegli višjo zgornjo mejo linearnosti za okskarbazepin in 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin, saj sta bili v njihovem primeru 20 µg/mL in 10 µg/mL. Dosegli smo tudi nižjo spodnjo mejo za 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin, njihova je znašala 0,1 µg/mL (27).

5.2.2 Spodnja meja občutljivosti (LLOQ)

Spodnja meja določljivosti naše metode je 0,075 µg/mL za karbamazepin, 0,1 µg/mL za okskarbazepin in likarbazepin, 0,25 µg/mL za karbamazepin-10,11-epoksid ter 0,05 za 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin.

Vzrok za visoko LLOQ pri karbamazepin-10,11-epoksidu je prekrivanje kromatografskega vrha z vrhom spojine iz matriksa. Mandrioli in sodelavci so so za metodo ekstrakcije uporabili SPE in dosegli nižje spodnje meje občutljivosti analitov v primerjavi z našimi, pripravljenimi z obarjanjem proteinov (31).

5.2.3 Točnost

Točnost metode ustreza smernicam FDA za vseh pet analitov. Do odstopanja je prišlo le pri okskarbazepinu drugi dan in pri 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepinu tretji dan validacije pri QCL vzorcih, kjer sta bili povpečni točnosti 124 % in 125 %. Vzroka za odstop rezultata nismo znali pojasniti. Predvidevamo, da je do napake prišlo med pripravo kontrolnih vzorcev.

5.2.4 Ponovljivost

Pri preverjanju meddnevne ponovljivosti smo dokazali, da je metoda ponovljiva za vseh pet analitov. Pri znotrajdnevni ponovljivosti je prišlo do odstopanja pri okskarbazepinu drugi in tretji dan pri QCL vzorcu. Koeficienta variacije sta bila 22,8 % in 23,3 %, dovoljena vrednost je 15 %. Pri ostalih analitih so bile vrednosti CV znotraj zahtevanih meja.

5.2.5 Selektivnost

Pri kontroli selektivnosti metode, se je pri 4 od 6 plazem zdravih preiskovancev na kromatogramu pojavil vrh velikosti 10 pri retencijskem času karbamazepin-10,11-epoksida pri delovni valovni dolžini 215 nm. Posledično smo LLOQ za ta analit dvignili iz 0,05 µg/mL na 0,25 µg/mL. Pri validaciji smo uporabljali plazmo, kjer omenjena interferenca ni bila vidna, zato smo odziv posneli pri 215 nm. Kromatogram bi lahko posneli tudi pri valovni dolžini 235 nm, kjer interference iz plazme ni bilo zaznati.

5.2.6 Uspešnost ekstrakcije

Vrednosti izkoristkov ekstrakcij so bile v vseh, razen v enem primeru, malo čez 100 %. To je posledica ekstrakcije plazemskega vzorca z acetonitrilom, kjer z oborino nismo odstranili vseh proteinov. Ti so ostali v supernatantu, ki smo ga posušili skupaj z našimi analiti ter po ponovnem raztapljanju analizirali pri valovni dolžini, kjer so vidne tudi interference iz plazme.

Slednje se lahko pojavijo na kromatogramu pri retencijskih časih naših analitov in dajejo lažno večjo površino pod krivuljo. Odzivi vodnih vzorcev so torej manjši, ker je njihov matriks voda. Izkoristki ekstrakcij so sicer ponovljivi, saj je najvišji CV 6,56 %.

5.2.7 Stabilnost

Plazemski vzorci z analiti so ostali stabilni po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja, saj je bila povprečna sprememba koncentracije enaka ali manjša 5,68 %. Podobne rezultate smo dobili tudi pri preverjanju kratkoročne stabilnosti, kjer je bila največja sprememba v koncentraciji po 6 urah 5,49 %. Metoda je uspešno prestala tudi post-preperativno stabilnost analitov, z največjim odstopanjem v koncentraciji za 4,23 %.

Večja odstopanja smo dobili pri kontroli stabilnosti osnovne raztopine in dolgoročne stabilnosti. Koncentracija karabamazepin-10,11-epoksida se je v povprečju spremenila za 8,60 % pri nižji in 11,8 % pri višji koncentraciji osnovne raztopine analita po 1 tedenu pri 4 °C. Še višja je bila povprečna sprememba koncentracije IS kloramfenikola, saj je po 14 dneh pri 4 °C povečala za 25,9 %. Tako velika razlika kaže na nestabilnost IS pri shranjevanju osnovne raztopine v hladnilniku. Predvidevamo, da bi lahko kloramfenikol vplival na rezultate dolgoročne stabilnosti, saj smo plazemskim vzorcem po pomoti poleg analitov dodali tudi raztopino IS. Po enomesečnem hranjenju vzorcev pri -20 °C, je do večjih odstopanj prišlo pri karbamazepin-10,11-epoksidu, okskarbazepinu in likarbazepinu, s povprečnimi spremembami v koncentraciji 16,2 %, -13,8 % in -14,9 %.

5.2.8 Analiza plazemskih vzorcev bolnikov

Analizirali smo 12 plazemskih vzorcev bolnikov, od tega je 9 bolnikov prejemalo karbamazepin in trije okskarbazepin. Na kromatogramu so se pri retencijskih časih karbamazepina, karbamazepin-10,11-epoksida, okskarbazepina in likarbazepina pojavili odzivi analitov.

Na nobenem vzorcu bolnikov pa ni bilo zaznati odziva 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepina. Predvidevamo, da je vzrok lahko premajhna občutljivost ali pa razpad analita med shranjevanjem plazemskih vzorcev pri -20 °C. Čeprav so bolniki prejemali kombinacijo karbamazepina in okskarbazepina z drugimi protiepileptiki (topiramat, levetiracetam, pregabalin, vimpat lakozamid, klobazam), dodatnih vrhov na kromatogramu ni bilo zaznati.

5.2.9 Predlogi izboljšav metode

Pri metodi je še prostor za izboljšave. Pri pripravi vzorca bi lahko uporabili manjše volumne plazme, s tem bi se zmanjšal tudi čas sušenja supernatanata. Preverili bi lahko, ali daje ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) boljše rezultate izkoristkov. Če se na kromatogramu pojavi vrh iz plazme, ki se prekriva z karbamazepin-10,11-epoksidom, bi bilo potrebno odziv za to učinkovino posneti pri valovni dolžini 235 nm.

6 Sklepi

Razvili smo novo HPLC-UV metodo, s katero lahko selektivno določamo plazemske koncentracije karbamazepina, karbamazepin-10,11-epoksida, okskarbazepina, likarbazepina ter 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepina. Metoda je enostavna, saj ne potrebuje dragih reagentov in zahtevnih instrumentov, kot so masni spektrometer, a je kljub temu občutljiva v širokem koncentracijskem območju analitov.

Pri pripravi vzorca smo moteče komponente plazme odstranili s pomočjo obarjanja proteinov, kjer smo za obarjalni reagent uporabili ohlajen acetonitril. Postopek je hiter in enostaven, nastalo oborino smo centrifugirali, supernatant pa posušili ter ponovno raztopili za nadaljno kromatografsko analizo. Izkoristki ekstrakcij so bili vsi malo nad 100 %, kar bi lahko bila posledica zaostanka endogenih komponent v superantantu. Ločitev analitov in internega standarda smo dosegli s pomočjo kromatografske kolone Luna Phenyl-Hexyl (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) in izokratsko mobilno fazo, sestavljeno iz 50 % metanola in 50 % 25,0 mM kalijevega fosfatnega pufra s pH = 3,0. Pretok mobilne faze je bil nastavljen na 1 mL/min, temperatura termostata kolone na 50 °C ter valovna dolžina 215 nm. Retencijski čas zadnjega analita je 11,3 minut, celotna analiza pa traja 13 minut.

Metoda je po smernicah FDA za validacijo bioanaliznih metod linearna, točna in ponovljiva v območju 0,075-30 µg/mL za karbamazepin, 0,1-40 µg/mL za okskarbazepin in likarbazepin, 0,25-20 µg/mL za karbamazepin-10,11-epoksid in 0,05-20 µg/mL za 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepin. Odstopanja so se pojavila pri okskarbazepinu 2. ter pri 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepinu 3. dan validacije, kjer je bila točnost QCL 123,8 % in 125,4 %. Pri okskarbazepinu je 2. in 3. dan odstopala tudi znotrajdnevna ponovljivost, CV sta znašala 22,8 % in 23,3 %. Metoda in učinkovine so uspešno prestale kontrolo kratkoročne stabilnosti, stabilnosti v avtomatskem vzorčevalniku ter stabilnost po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja. Problematična je stabilnost osnovne raztopine kloramfenikola, saj je bila povprečna sprememba v koncentraciji 25,9 %. Rahlo povišane so tudi vrednosti dolgoročne stabilnosti pri okskarbazepinu, likarbazepinu in karbamazepin-10,11-epoksidu. Pri analizi plazemskih vzorcev bolnikov smo lahko določili obe učinkovini in njune presnovke, razen 10,11-*trans*-dihidroksi-10,11-dihidrokarbamazepina.

7 Viri

1 Neels H, Sierens A, Naelaerts K, *et al*. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. Clin Chem Lab Med 2004; 42(11): 1228-1255.

2 Engel J. Epilepsy: Global issues for the practicing neurologist. Demos Medical Publishing, 2005: 9-10.

3 Berg, AT, Berkovic SF, Brodie M J, *et al*. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on classification and terminology 2005–2009. Epilepsia 2010; 51(4): 676–685.

4 Manji H, Gilman S. Oxford American handbook of neurology. Oxford University Press, 2010: 181-197.

5 Royden HJ, Srinivasan J, Allan GJ, Baker RA. Netter's Neurology, 2nd Edition. Saunders, 2011: 175-190.

6 Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, *et al*. Antiepileptic drugs, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 105-109, 236-46, 459-65.

7 Wheless J, Brumback R A, Willmore J. Advanced therapy in epilepsy. People's Medical Publishing House, 2009: 291-295.

8 Sweetman S C. Martindale. The complete drug reference 36th ed. Pharmaceutical Press, 2009: 465-516.

9 Thorn CF, Leckband SG, Kelsoe J, et al. PharmGKB Summary: Carbamazepine pathway. Pharmacogenet Genomics, 2011; 21(12): 906-10.

10 Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 521-46.

11 Lott RS, Helmboldt K. Oxcarbazepine. Formulary, 2000; 35(3): 219.

12 Shorvon S. Oxcarbazepine: a review. Seizure, 2000; 9(2): 75-79.

13 Johannessen SI, Landmark CJ. Value of therapeutic drug monitoring in epilepsy. Expert Rev Neurother, 2008; 8(6): 929-39.

14 Johannessen SI, Tomson T. Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: When is monitoring needed? Clin Pharmacokinet, 2006; 45(11): 1061-75.

15 Krasowski MD. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic medications. Novel Treatment of Epilepsy, InTech, 2011: 133-158.

16 Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, *et al*. 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; 49(7): 1239–1276.

17 Krasowski MD, McMillin GA. Advances in anti-epileptic drug testing. Clin Chim Acta, 2014; 436:224-36.

18 MZ, JAZMP, ZZZS, IVZ, Centralna Baza Zdravil. http://www.cbz.si/ZZZS/pao/bazazdr2.nsf/o/048695E772B1E536C12579C2003F67A8/$File/s-015491.pdf. Dostopano: november 2015.

19 Eadie MJ. Therapeutic drug monitoring – antiepileptic drugs. Br J Clin Pharmacol, 2001; 52: 11S-20S.

20 Saracino MA, Tallarico K, Raggi MA. Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. Anal Chim Acta, 2010; 661(2): 222-8.

21 Shimoyama R, Ohkubo T, Sugawara K. Monitoring of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in breast milk and plasma by high performance liquid chromatography. Annal Clin Biochem, 2000; 37(2): 210-215.

22 Reith D, Cannell G. An HPLC assay for carbamazepine phase I metabolites and their glucuronides in urine. J Liq Chromatogr Technol, 1999: 22(12): 1907-18.

23 Kimiskidis V, Spanakis M, Niopas I, *et al.* Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of oxcarbazepine and its main metabolites in human plasma and cerebrospinal fluid and its application to pharmacokinetic study. J Pharm Biomed Anal, 2007; 43(2): 763-8.

24 Kłys M, Rojek S, Bolechała F. Determination of oxcarbazepine and its metabolites in postmortem blood and hair by means of liquid chromatography with mass detection (HPLC/APCI/MS). J Chromatogr B, 2005; 825(1): 38-46.

25 Martínez Bueno MJ, Boillot C, Fenet H, *et al*. Fast and easy extraction combined with high resolution mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in Marine Mussels. J Chromatogr A, 2013; 1305: 27-34.

26 Contin M, Balboni M, Callegati E, *et al*. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. J Chromatogr B, 2005; 828(1-2): 113-7.

27 Fortuna A, Sousa J, Alves G, *et al.* Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. Anal Bioanal Chem, 2010; 397(4): 1605-15.

28 Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, *et al*. Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. J Chromatogr Sci, 2007; 45(9): 616-22.

29 Hunek C1, Burgyan M, Wang S. Measurement of 10,11-dihydro-10-hydroxy-carbamazepine in serum and plasma by high-performance liquid chromatography. Clin Chem Lab Med, 2008; 46(10): 1429-33.

30 Levert H, Odou P, Robert H. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in serum by high-performance liquid chromatography. Biomed Chromatogr, 2002; 16(1): 19-24.

31 Mandrioli R, Ghedini N, Albani F, *et al*. Liquid chromatographic determination of oxcarbazepine and its metabolites in plasma of epileptic patients after solid-phase extraction. J Chromatogr B, 2003; 783(1): 253-63.

32 Pienimäki P, Fuchs S, Isojärvi J, *et al*. Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B, 1995; 673(1): 97-105.

33 Souppart C, Decherf M, Humbert H, *et al*. Development of a high throughput 96-well plate sample preparation method for the determination of Trileptal (oxcarbazepine) and its metabolites in human plasma. J Chromatogr B, 2001; 762(1): 9-15.

34 Mazzucchelli I, Franco V, Fattore C, *et al*. A novel enantioselective microassay for the high-performance liquid chromatography determination of oxcarbazepine and its active metabolite monohydroxycarbazepine in human plasma. Ther Drug Monit, 2007; 29(3): 319-24.

35 Alves G, Figueiredo I, Castel-Branco M, *et al*. Enantioselective HPLC-UV method for determination of eslicarbazepine acetate (BIA 2-093) and its metabolites in human plasma. Biomed Chromatogr, 2007; 21(11): 1127-34.

36 Bugamelli F, Sabbioni C, Mandrioli R, *et al*. Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. Anal Chim Acta, 2002; 472: 1-10.

37 Vermeij TA, Edelbroek PM. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. J Chromatogr B, 2007; 857(1): 40-6.

38 Breton H, Cociglio M, Bressolle F, *et al*. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. J Chromatogr B, 2005; 828(1-2): 80-90.

39 Maurer HH, Kratzsch C, Weber AA, *et al*. Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. J Mass Spectrom, 2002; 37(7): 687-92.

40 de Sousa Maia MB, do Nascimento DF, Martins IL, *et al*. Simultaneous quantitative analysis of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, 2007; 45(2): 304-11.

41 Kang J, Park YS, Kim SH, *et al*. Modern methods for analysis of antiepileptic drugs in the biological fluids for pharmacokinetics, bioequivalence and therapeutic drug monitoring. Korean J Physiol Pharmacol, 2011; 15(2): 67-81.

42 Krasowski MD, McMillin GA. Advances in anti-epileptic drug testing. Clin Chim Acta, 2014; 436: 224-36.

43 Martinavarro-Domínguez A, Capella-Peiró ME, Gil-Agustí M, *et al*. Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples. Clin Chem. 2002; 48(10): 1696-702.

44 Samanidou V, Karageorgou E. Drug monitoring by HPLC: Recent developments [e-book]. Nova Science, 2010: 53-82.

45 Hayashi S, Kurooka S, Arisue K, *et al*. Semi-automated continious-flow enzyme immunoassay for antiepileptic drugs in serum. Clin Chem, 1983; 29(10): 1790-92

46 Kubotsu K, Goto S, Fujita H, *et al*. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonvulsant drugs. Clin Chem, 1992; 38: 808-812.

47 Rambeck B, May TW, Jürgens MU, *et al*. Comparison of phenytoin and carbamazepine serum concentrations measured by high-performance liquid chromatography, the standard TDx assay, the enzyme multiplied immunoassay technique, and a new patient-side immunoassay cartridge system. Ther Drug Monit, 1994; 16(6): 608-12.

48 Krasniqi S, Zeitlinger M, Bauer S. Comparison between the immunoassay and high performance liquid chromatography for therapeutic monitoring of carbamazepine and phenytoine. Biochem Med, 2010; 20(3): 341-9.

49 Cochran EB, Massey KL, Phelps SJ, *et al*. Comparison of a noninstrumented immunoassay for carbamazepine to high performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay. Epilepsia, 1990; 31(4): 480-4.

50 Leite CE, Petersen GO, Lunardelli A, *et al*. A high performance liquid chromatography Method for the determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide and its comparison with chemiluminescent immunoassay. Clin Chem Laboratory Med, 2009; 47(4): 458-463.

51 Contin M, Riva R, Albani F, *et al*. Determination of total and free plasma carbamazepine concentrations by enzyme multiplied immunoassay: Interference with the 10,11-epoxide metabolite. Ther Drug Monit, 1985; 7(1): 46-50.

52 Dasgupta A. Advances in chromatographic techniques for therapeutic drug monitoring. CRC Press, 2009: 92-93.

53 Sun L, Szafir I. Comparison of enzyme immunoassay and gas chromatography for determination of carbamazepine and ethosuximide in human serum. Clin Chem, 1977; 23(9): 1753-56.

54 Mohd MA. Advanced gas chromatography - progress in agricultural, biomedical and industrial applications. InTech, 2012: 83-108.

55 Perchalski RJ, Wilder BJ. Rapid gas-liquid chromatographic determination of carbamazepine in plasma. Clin chem, 1974; 20(4): 492-3.

56 Schwertner HA, Hamilton HE, Wallace JE. Analysis for carbamazepine in serum by electron-capture gas chromatography. Clin Chem, 1978; 24(6): 895-9.

57 Gérardin A, Abadie F, Laffont J. GLC determination of carbamazepine suitable for pharmacokinetic studies. J Pharm Sci, 1975; 64(12): 1940-2.

58 von Unruh GE, Paar WD. Gas chromatographic/mass spectrometric assays for oxcarbazepine and its main metabolites, 10-hydroxy-carbazepine and carbazepine-10,11-trans-diol. Biomed Environ Mass Spectrom, 1986; 13(12): 651-6.

59 Wu S, Xu W, Subhani Q, *et al*. Ion chromatography combined with online electrochemical derivatization and fluorescence detection for the determination of carbamazepine in human plasma. Talanta 101, 2012: 541-5.

60 Pucci V, Kenndler E, Raggi MA: Ouantitation of oxcarbazepine and its metabolites in human plasma by micellar electrokinetic chromatography. Biomed Chromatogr, 2003; 17(4): 231-38.

61 Lin YY, Wang CC, Ho YH, *et al*. Analysis of carbamazepine and its five metabolites in serum by large-volume sample stacking–sweeping capillary electrophoresis. Anal Bioanal Chem, 2013; 405(1): 259-66.

62 ChemAxon. http://www.chemicalize.org
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=carbamazepine&source=fp
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=carbamazepine-10%2C11-epoxide&source=calculate
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=oxcarbazepine&source=calculate
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=licarbazepine&source=calculate
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=NC%28%3DO%29N1c2ccccc2C%28O%29C%28O%29c2ccccc12&source=search
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=chloramphenicol&source=calculate
http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=guanabenz+acetate&source=calculate
Dostopano: September 2015.

63 Administration F, Drug. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.

64 Rosing H, Man WY, Doyle E, *et al*. Bioanalytical liquid chromatographic method validation. A review of current practices and procedures. J Liq Chromatogr Technol, 2000; (23)3: 329-54.

65 Deming SN, Michotte Y, Massart DL, *et al*. Chemometrics: A textbook. Elsevier, 1988: 75-92.