

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO BENKOVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO BENKOVIĆ

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE
PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ NOVEJŠIH
ANTIEPILEPTIKOV S POMOČJO FLUORESCENČNEGA
OZNAČEVANJA IN TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE**

**DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR
QUANTIFICATION OF RECENT ANTIEPILEPTIC DRUGS
WITH FLUORESCENCE MARKING IN PLASMA SAMPLES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

ZAHVALA

Za mentorstvo in strokovno pomoč se iskreno zahvaljujem doc. dr. Tomaža Vovku in vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo, ki so mi olajšali delo diplomske naloge.

Zahvaljujem se domačim, prijateljem ter puncu Evi za podporo in pomoč tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

Marko Benković

Ljubljana, november 2010

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek

Članica diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega

VSEBINA

1. Uvod	1
1.1. Epilepsija	1
1.2. Sodobno zdravljenje epilepsije	1
1.3. Novejše učinkovine za zdravljenje epilepsije	1
1.3.1. Vigabatrin	1
1.3.2. Topiramat	2
1.3.3. Pregabalin	2
1.3.4. Gabapentin.....	3
1.4. Določanje novjših antiepileptikov v bioloških vzorcih.....	3
1.4.1. Pogosto uporabljeni reagenti za derivatizacijo novjših antiepileptikov	4
1.4.2. Ostale metode za določanje novjših antiepileptikov.....	7
1.5. Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (TDM).....	8
1.5.1. Smiselnost TDM.....	8
1.5.2. Uporabnost TDM pri določenih učinkovinah.....	9
2. Namen dela	11
3. Materiali in metode.....	12
3.1. Materiali.....	12
3.1.1. Biološki material	12
3.1.2. Standardi.....	12
3.1.3. Reagenti in topila.....	12
3.1.4. Naprave in pribor.....	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Priprava osnovnih raztopin za razvoj metode.....	15
3.2.2. Priprava pufrov	15

3.2.3.	Razvoj metode za ekstrakcijo iz plazemskih vzorcev	16
3.2.4.	Sušenje vzorcev	18
3.2.5.	Derivatizacija učinkovin.....	18
3.2.6.	Izbor kolone na HPLC	19
3.2.7.	Izbor optimalnih pogojev HPLC analize	19
3.2.8.	Optimizacija pogojev fotopomnoževalke.....	19
3.2.9.	Identifikacija derivatov	19
3.2.10.	Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine	20
3.2.11.	Izbira internega standarda	20
3.3.	Validacija HPLC metode	21
3.3.1.	Priprava standardov za validacijo.....	21
3.3.2.	Linearnost	23
3.3.3.	Točnost	23
3.3.4.	Ponovljivost.....	24
3.3.5.	Območje linearnosti.....	24
3.3.6.	Meja kvantifikacije (LOQ)	24
4.	Rezultati.....	25
4.1.	Ekstrakcija učinkovin	25
4.2.	Derivatizacija učinkovin	26
4.3.	Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine	27
4.4.	Izbira internega standarda	28
4.5.	Kromatografija.....	28
4.5.1.	Izbira kolone	28
4.5.2.	Temperatura segrevanja kolone.....	28
4.5.3.	Optimalna mobilna faza.....	29
4.5.4.	Nastavitve ojačitve fotopomnoževalke.....	29
4.5.5.	Kromatografska ločba naših spojin.	30

4.6.	Identifikacija derivatov	31
4.7.	Validacija HPLC metode	36
4.7.1.	Linearnost	36
4.7.2.	Točnost	44
4.7.3.	Ponovljivost metode	49
4.7.4.	Izkoristek ekstrakcije	50
4.7.5.	Limita kvantifikacije (LOQ).....	50
4.7.6.	Stabilnost analitov	50
5.	Razprava	51
5.1.	Ekstrakcija	51
5.2.	Derivatizacija	53
5.3.	Kromatografija.....	54
5.4.	Validacija HPLC metode	55
5.4.1.	Linearnost	55
5.4.2.	Točnost	55
5.4.3.	Ponovljivost.....	56
5.4.4.	Izkoristek ekstrakcije	56
5.4.5.	Limita kvantifikacije.....	56
6.	Sklepi.....	58

Slika 1: Vigabatrin.....	1
Slika 2: Topiramat	2
Slika 3: Pregabalin.....	2
Slika 4: Gabapentin	3
Slika 5: Reakcije benzofurazanov	4
Slika 6: Reakcija FMOC s primarnim aminom	5
Slika 7: Reakcija fluorescamina s primarnim aminom.....	5
Slika 8: Reakcija OPA s primarnim aminom	6
Slika 9: Reakcija DNS-Cl z aminom.....	7
Slika 10: Ekscitacijski spekter valovnih dolžin derivata pregabalina	27
Slika 11: Emisijski spekter valovnih dolžin derivata pregabalina.....	28
Slika 12: Kromatogram derivatov z NBD-Cl v plazemskem vzorcu	30
Slika 13: Kromatogram plazemskega vzorca brez analitov	31
Slika 14: Reakcija vigabatrina z NBD-Cl.....	31
Slika 15: Masni spektrogram derivata vigabatrina	32
Slika 16: Fragmentacija derivata NBD-CL z vigabatinom	32
Slika 17: Reakcija topiramata z NBD-Cl	33
Slika 18: Masni spekter derivata topiramata z NBD-Cl	33
Slika 19: Reakcija pregabalina z NBD-Cl.....	34
Slika 20: Masni spekter derivata pregabalina z NBD-Cl	34
Slika 21: Fragmentni produkti vrha m/z 321,1.....	35
Slika 22: Reakcija gabapentina z NBD-Cl	35
Slika 23: Masni spekter gabapentina z NBD-Cl.....	36

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Čas sušenja v odvisnosti od topila in tlaka N ₂	18
Preglednica II: Zatehta standardnih raztopin.....	21
Preglednica III: Priprava osnovnih raztopin.....	22
Preglednica IV: Priprava standardnih koncentracij	22
Preglednica V: Priprava QC standardov.....	23
Preglednica VI: Izkoristek ekstrakcije z različnimi organskimi topil	25
Preglednica VII: Izkoristek ekstrakcije na trdnih nosilcih	26
Preglednica VIII: Gradient mobilne faze.....	29
Preglednica IX: Ojačitve fotopomnoževalke med potekom HPLC analize plazemskih vzorcev.....	29
Preglednica X: Časi elucije analitov.....	30
Preglednica XI: Odzivi derivata vigabatrina	37
Preglednica XII: Točnosti odzivov derivata vigabatrina.....	38
Preglednica XIII: Odzivi derivata topiramata	39
Preglednica XIV: Točnosti odzivov derivata topiramata	40
Preglednica XV: Odzivi derivata pregabalina	41
Preglednica XVI: Točnosti odzivov derivata pregabalina.....	42
Preglednica XVII: Odzivi derivata gabapentina.....	43
Preglednica XVIII: Točnosti odzivov derivata gabapentina	44
Preglednica XIX: Točnost metode za določanje vigabatrina brez upoštevanja IS.....	45
Preglednica XX: Točnost metode za določanje vigabatrina z upoštevanjem IS	45
Preglednica XXI: Točnost metode za določanje topiramata brez upoštevanja IS.....	46
Preglednica XXII: Točnost metode za določanje topiramata z upoštevanjem IS	46
Preglednica XXIII: Točnost metode za določanje pregabalina brez upoštevanja IS	47
Preglednica XXIV: : Točnost metode za določanje pregabalina z upoštevanjem IS	47
Preglednica XXV: Točnost metode za določanje gabapentina brez upoštevanja IS.....	48
Preglednica XXVI: Točnost metode za določanje gabapentina z upoštevanjem IS.....	48
Preglednica XXVII: Znotrajdnevna ponovljivost metode.....	49
Preglednica XXVIII: Meddnevna ponovljivost metode.....	49
Preglednica XXIX: Izkoristki ekstrakcije.....	50

POVZETEK

V diplomski nalogi smo razvili novo, občutljivo metodo za določanje koncentracij štirih novejših antiepileptikov v plazmi. Določali smo koncentracije vigabatrina, topiramata, pregabalina in gabapentina. Za detekcijo naših analitov s fluorescenčnim detektorjem vezanim na HPLC smo izvedli derivatizacijo s 4-kloro-7-nitrobenzofurazanom. Pred izvajanjem analize smo očistili plazemske vzorce z ekstrakcijo na trdnih nosilcih Oasis MCX. Kot interni standard smo uporabili DL-p-klorofenilalanin.

Za ločbo analitov smo uporabili kolono Gemini C18 150 x 4,6 mm 5 μ m. Ekscitacijsko valovno dolžino smo nastavili na 470 nm, emisijsko pa 530 nm. Uporabili smo gradient mobilne faze, kjer smo ob peti minuti analize spremenili odstotek organske faze s 50 na 56 %. Kot vodno fazo smo uporabili 50 mM fosfatni pufer s pH 4,5, medtem ko je bila organska faza metanol. Pretok je bil konstanten pri 1,3 mL/min. Kolono smo termostatirali na 45 °C. Injicirali smo 5 μ L vzorca.

Kromatografsko metodo smo validirali po FDA smernicah in določili mejo kvantifikacije, linearnost, ponovljivost in točnost. Meja kvantifikacije za vigabatrin, pregabalin in gabapentin je bila pri koncentraciji 0,5 μ g/mL in linearno območje od 0,5 do 40 μ g/mL. Meja kvantifikacije za topiramat je bila pri 0,625 μ g/mL. Pri določanju vigabatrina, pregabalina in gabapentina je bilo pri določanju dnevne ponovljivosti odstopanje manjše kot 10 %, medtem ko je bilo največje odstopanje pri topiramatu 18 % pri meji kvantifikacije, kar še vedno ustreza zahtevam FDA. Točnost za vigabatrin, pregabalin in gabapentin z uporabo kontrolnih vzorcev je ustrezala, saj je povprečna vrednost petih kontrolnih vzorcev pri različnih koncentracijah odstopala za manj kot 15 % oziroma 20 % pri meji kvantifikacije od pričakovane vrednosti. Pri določanju točnosti koncentracij topiramata so bila odstopanja prevelika za uspešno validacijo metode.

ABSTRACT

A new, sensitive method for the determination of four recent antiepileptic drugs was developed. We have determined concentrations of vigabatrin, topiramate, pregabalin and gabapentin in plasma samples. The drugs were derivatised using 4-chloro-7-nitrobenzofurazane and detected using a fluorescence detector. The plasma samples were extracted using OASIS MCX solid phase extraction cartridges. DL-p-chlorophenylalanine was used as the internal standard.

Gemini C18 150 x 4,6 mm 5 μ m column was used for derivatives separation. Excitation wavelength was set at 470 nm and emission wavelength at 530 nm. A gradient method was used, changing from 50 to 56 % of methanol at fifth minute of analysis. The water part consisted of 50 mM phosphate buffer at pH 4.5. The flow was set at 1.3 mL/min and the column was heated to 45°C. 5 μ L of the sample was injected in the system.

The method was validated according to FDA guidelines and limit of quantification, linearity, precision and accuracy was determined. Limit of quantification at 0.5 μ g/mL was reached for the determination of vigabatrin, pregabalin and gabapentine and the standard curve was linear between 0.5-40 μ g/mL. Limit of quantification was at 0.625 μ g/mL for topiramate. The intra-day precision assay was lower than 10 % for the determination of vigabatrin, pregabalin and gabapentin, and lower than 18 % at the determination of topiramate at its limit of quantification which is still within FDA determined validation limits. Accuracy at the determination of vigabatrin, pregabalin and gabapentine had the mean value deviating less than 15 % and less than 20 % at LOQ from the expected value. Topiramate samples deviated too much for successful method validation.

SEZNAM OKRAJŠAV

PEZ - protiepileptična zdravila

GABA - γ -aminomaslena kislina

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

NBD-X - halogeniran nitrobenzofurazan

OPA - ortoftaldialdehid

FMOC-Cl - 9-fluorenilmetil kloroformat

DNS - Cl - 5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonil klorid

MS - masni spektrograf

LC - tekoča kromatografija

TDM - terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (Therapeutic Drug Monitoring)-

UV - ultra vijolično

LL - tekoče - tekoče

SPE - ekstrakcija na trdnih nosilcih

FLD - fluorescenčni detektor

FDA - Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration)

MeOH - metanol

ACN - acetonitril

TFA - trifluorocetna kislina

DKM - diklorometan

TBME - terc-butil metil eter

iPr - izopropanol

QC - kontrolni vzorec

AVG - povprečna vrednost

SD - standardni odklon

CV - koeficient variacije

1. Uvod

1.1. Epilepsija

Izraz epilepsija se nanaša na skupino kroničnih nevroloških obolenj, ki jih označujejo ponavljajoči epileptični napadi. Epileptični napadi so znaki in simptomi epilepsije. Pojavijo se ob nenormalni aktivnosti nevronov v možganih. Osebi, ki doživi en epileptični napad, epilepsije ne moremo diagnosticirati. Potrdimo jo lahko šele po dolgotrajni epileptični možganski aktivnosti (1).

1.2. Sodobno zdravljenje epilepsije

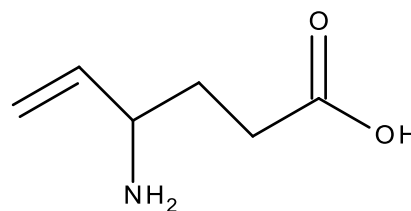
Ob optimalnem zdravljenju lahko prenehanje epileptičnih napadov pričakujemo pri približno 70 % bolnikov. Zdravljenje je uspešnejše pri bolnikih, ki so imeli manj napadov. Cilj zdravljenja je preprečevanje epileptičnih napadov brez neželenih učinkov in z ohranjenostjo kakovostjo življenja.

V zadnjih 10 letih so se uveljavila številna novejša protiepileptična zdravila (PEZ): vigabatrin, lamotrigin, gabapentin, topiramat, tiagabin, okskarbazepin, zonisamid, levetiracetam in pregabalin. Bolniki ta zdravila večinoma bolje prenašajo kot starejša PEZ (fenobarbital, fenitoin, valproat, karbamazepin) (2).

1.3. Novejše učinkovine za zdravljenje epilepsije

1.3.1. Vigabatrin

Vigabatrin z molsko maso 129,2 g/mol je analog γ -aminomaslene kisline (GABA) (slika 1). Ireverzibilno se veže na GABA-transaminazo, ki omogoči razgradnjo GABA, in povzroči trajno deaktivacijo, kar poveča možgansko koncentracijo GABA.

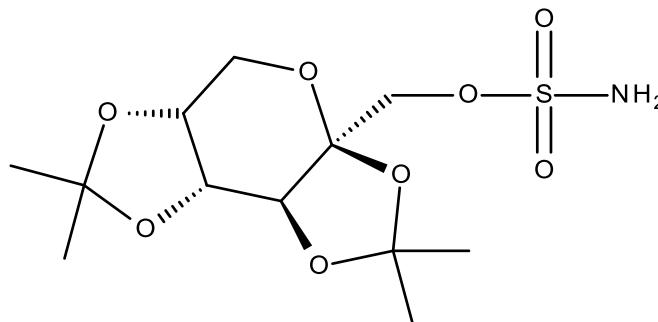


Slika 1: Vigabatrin

Uporablja se za začetno ali dodatno zdravljenje žariščnih napadov z ali brez sekundarne generalizacije. Ima ugodno kinetiko, saj ne inducira jetrnih encimov. Skozi ledvice se izloči nespremenjen. Z ostalimi zdravili nima znanih interakcij. Pogost neželen učinek vigabatrina je zoženje perifernega vida, ki ni vedno reverzibilno, zato se zdravilo v mnogih primerih opušta (2, 3).

1.3.2. Topiramat

Topiramat je sulfamatno substituiran monosaharid, pridobljen iz D-enantiomera fruktoze. Njegova molska masa je 339,37 g/mol (slika 2). Topiramat ojača zaviralne učinke



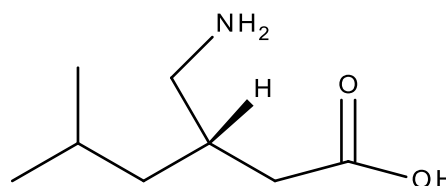
GABA in zavira napetostno odvisne natrijeve kanale. Ojača prenos signala v kalijevih kanalih in zavira napetostno odvisne kalcijeve kanale L-tipa.

Slika 2: Topiramat

Uporablja se za preprečevanje žariščnih napadov, tonično-kloničnih napadov in napadov pri miokloni epilepsiji. Ugodno deluje tudi pri preprečevanju migrenskih glavobolov. Le manjši del se ga presnavlja. 40 – 50 % se ga izloči skozi ledvice nespremenjenega. Do sedaj so identificirali dva hidroksi in dva diolna metabolita, ki niso farmakološko aktivni. Pogosti neželeni učinki pri zdravljenju so: upočasnjena psihomotorika, utrujenost, kognitivne spremembe, težave pri govoru, zmanjšana pozornost, anoreksija in izguba teže, metabolična acidoza (predvsem pri otrocih), hipohidroza, sedacija ter meglen ali dvojni vid (2, 3).

1.3.3. Pregabalin

Pregabalin je spojina z molekulsko maso 159,2 g/mol (slika 3). Veže se na $\alpha_2\delta$ podenoto napetostno odvisnega kalcijeva kanala. To zapre N in P/Q presinaptične kalcijeve kanale in s tem izniči



odvečno nevronske aktivnost ter sproščanje neurotransmitorjev. Kljub strukturni podobnosti z GABA, nanjo ali na njene receptorje neposredno nima vpliva.

Slika 3: Pregabalin

Uporablja se kot dodatno zdravilo za preprečevanje žariščnih epileptičnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez nje. Njegov učinek je precej močnejši kot učinek gabapentina. Uporablja se tudi pri zdravljenju nevropatske bolečine. V prihodnje bo verjetno registriran kot monoterapija, naprimer pri bolnikih s simptomatsko epilepsijo po

možganski kapi. Biološka uporabnost je večja od 90 %. Kot analog levcina prehaja krvnomožgansko pregrado. Skozi ledvice se izloča nespremenjen. Pogosti neželeni učinki so: somnolenca, ataksija, utrujenost, parestezija, zmanjšanje pozornosti, zmedenost, evforičnost, razdražljivost, bruhanje, suha usta, meglen vid, periferni edemi in zmanjšanje libida (2, 3).

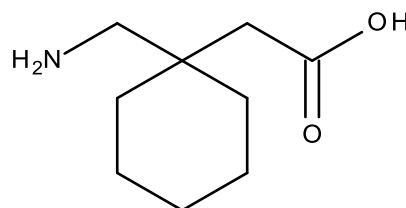
1.3.4. Gabapentin

Gabapentin je spojina z molekulsko maso 171,23 g/mol. Deluje na enak način kot pregabalin (slika 4).

Uporablja se za začetno ali dodatno zdravljenje žariščnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez nje. Pri preprečevanju epileptičnih napadov nima

zelo močnega delovanja, zato se pogosteje uporablja pri zdravljenju nevropatske bolečine. Peroralna

biološka uporabnost je pod 60 %. Nizka biološka uporabnost je posledica nasičenosti transportnega sistema L-amino kislin in se pri visokih odmerkih še dodatno zniža. Tako kot pregabalin prehaja krvnomožgansko pregrado. Izloča se le preko ledvic v nespremenjeni obliki. Pogosti neželeni učinki so: somnolenca, vrtoglavica, bruhanje, zaprtje, anoreksija, povečan apetit, suha usta, meglen vid, obrazni edem, izpuščaji, impotenca, pri otrocih pod 12 let se pojavi tudi agresivno obnašanje, čustvena nestabilnost, hiperkinezija, vnetje dihalnega trakta in bronhitis (2, 3).



Slika 4: Gabapentin

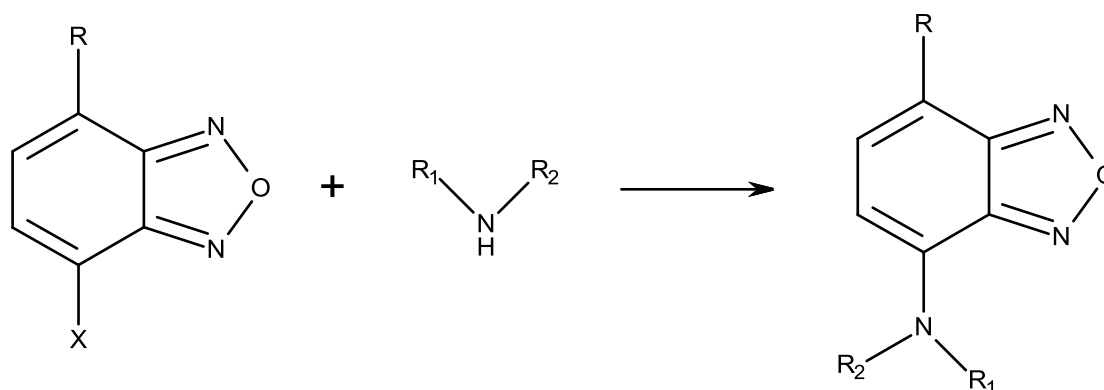
1.4. Določanje novejših antiepileptikov v bioloških vzorcih

Novejši PEZ ne vsebujejo kromofornih skupin in kot taki ne absorbirajo, zato jih ne moremo detektirati s klasičnimi tekočinsko kromatografskimi metodami visoke ločljivosti (HPLC) z UV detektorjem. Za detekcijo so potrebne metode kot je HPLC, vezan z masnim spektrometrom. Možna je tudi derivatizacija spojin, ki nato omogoči detekcijo s fluorescenčnim ali UV detektorjem.

1.4.1. Pogosto uporabljeni reagenti za derivatizacijo novejših antiepileptikov

Benzofurazani (NBD-X)

Halogenobenzofurazani reagirajo s primarnimi in sekundarnimi amini pri temperaturi 50-60°C v alkalnih pogojih (slika 5). Uporabljata se kloriran in fluoriran derivat benzofurazana. Reakcija s fluoriranim derivatom je približno desetkrat hitrejša. Oba reagenta se uporabljata za predkolonsko derivatizacijo (4).

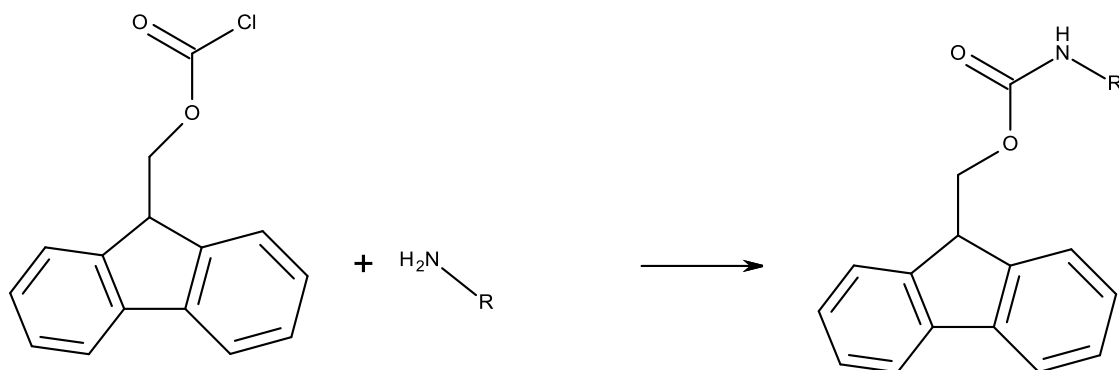


Slika 5: Reakcije benzofurazanov

Derivati pridobljeni pri reakciji z NBD-X so bolj stabilni kot derivati pridobljeni s pomočjo ortoftaldialdehida (OPA) in imajo manjši šum kot derivati pridobljeni s pomočjo 9-fluorenilmetil kloroformata (FMOC-Cl) (5, 6). Bahrami s sod. so razvili metode za določanje gabapentina in topiramata v človeškem serumu s pomočjo derivatizacije z NBD-Cl (7, 8). Olgun s sod. so razvili spektrofotometrično metodo za določanje vigabatrina v tabletah s pomočjo derivatizacije z NBD-Cl (9), Erturk s sod. pa metodo za določanje vigabatrina v plazmi po derivatizaciji z NBD-Cl (6).

9-fluorenilmetil kloroformat (FMOC)

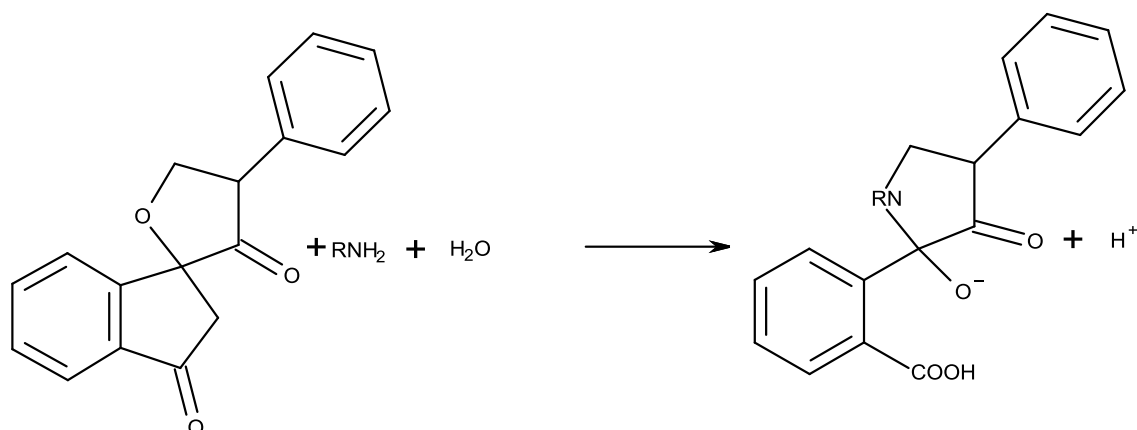
FMOC se je najprej uporabljal kot zaščita amino skupine med peptidno sintezo. Njegovi derivati kažejo izjemno reaktivnost, občutljivost in stabilnost. Reagira s primarnimi in sekundarnimi amini (slika 6). Težava pri uporabi FMOC je v tem, da že sam fluorescira in posledično povzroči večji šum na detektorju (4). Bahrami s sod. so derivatizacijo z njim uporabili za določanje gabapentina in topiramata v serumu (5, 10).



Slika 6: Reakcija Fmoc s primarnim aminom

Fluorescamin

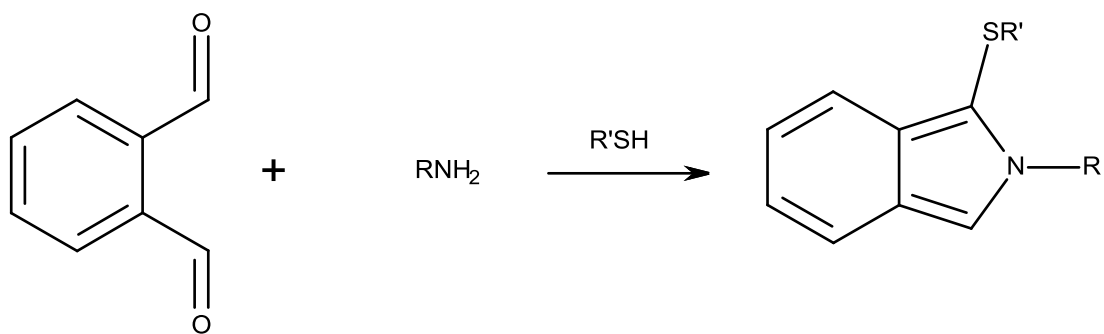
Fluorescamin je reagent, ki sam po sebi ne fluorescira, toda po reakciji s primarnimi amini nastane fluorescenčen produkt. Pri sobni temperaturi reagira s primarnimi in sekundarnimi amini v alkalnih pogojih (slika 7). Uporaben je predvsem za določanje primarnih aminov, saj produkt s sekundarnimi amini ne fluorescira. Reagent se uporablja za predkolonsko in postkolonsko derivatizacijo. Fluorescenčni derivati v vodnih raztopinah niso stabilni. Občutljivost detekcije je 2-5 krat manjša kot pri derivatizaciji z OPA (4). Belal s sod. so razvili metodo za določanje gabapentina in vigabatrina po derivatizaciji s fluorescaminom v urinu in farmacevtskih oblikah (11).



Slika 7: Reakcija fluorescamina s primarnim aminom

O-ftalaldialdehid (OPA)

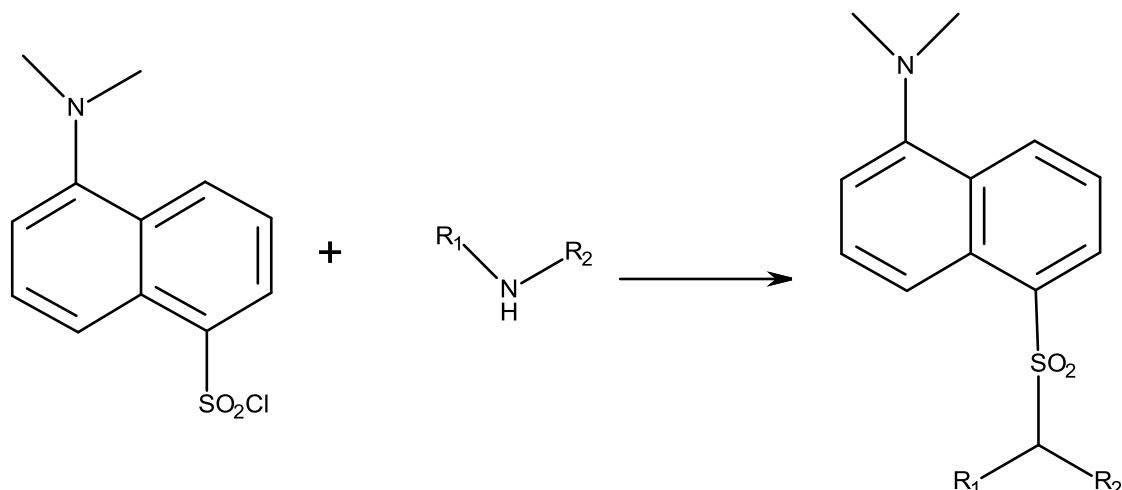
OPA se pogosto uporablja za derivatizacijo primarnih aminov in aminokislin (slika 8). Reakcija poteka v alkalnem pH v prisotnosti alkiltiolov, kot je 2-merkaptoetanol. Reakcija povzroči nastanek visoko fluorescenčnih izoindolnih derivatov. V mešanici boratnega pufra (pH 6-8 za amine in pH 9,7-10 za aminokislino) poteče v dveh minutah. Težava pri reakcijah z OPA je v nestabilnih derivatih in težko ponovljivih rezultatih. Za pridobitev stabilnejših derivatov se v postopek derivatizacije uvaja veliko sprememb (npr. izbira drugačnega alkiltiola) (4). Vermeij s sod. so razvili metodo za določanje pregabalina, gabapentina in vigabatrina v človeškem serumu s pomočjo derivatizacije z OPA in 3-merkaptopropionsko kislino (12). Razvili so tudi metodo, kjer so uporabili derivatizacijo z OPA in N-acetil-L-cisteinom, kar je omogočilo analizo enantiomerov vigabatrina v človeškem serumu (13).



Slika 8: Reakcija OPA s primarnim aminom

5- (dimetilamino) naftalen-1-sulfonil klorid (DNS-Cl)

Danzil klorid (DNS-Cl) pod šibko alkalnimi pogoji reagira s sekundarnimi in primarnimi amino skupinami (slika 9). Optimizirani časi derivatizacije so med 30 in 120 minut. Odvisni so od vrste amino skupine. DNS derivati so dokaj stabilni. DNS-Cl se večinoma uporablja za predkolonsko derivatizacijo. Občutljivost detekcije je primerljiva z derivati, pridobljenimi z derivatizacijo z OPA (4). Mercolini s sod. so razvili metodo za hkratno določanje vigabatrina, topiramata in gabapentina v plazmi po derivatizaciji z DNS-Cl (14).



Slika 9: Reakcija DNS-Cl z aminom

1.4.2. Ostale metode za določanje novjših antiepileptikov

Pogosto uporabljena metoda za določanje novjših antiepileptikov je tekočinska kromatografija, vezana z MS (masni spektroskop) detektorjem. Zaradi visoke specifičnosti MS/MS metod popolna kromatografska ločba analitov in biološkega nosilca, iz katerih jih pridobivamo, ni vedno potrebna (15). Slabosti omenjene metode sta visoka cena in nedosegljivost potrebnih aparatov v analitskih laboratorijih. Analitika s pomočjo masne spektrometrije omogoča zelo nizko mejo detekcije in kvantifikacije, večinoma v rangu nekaj ng/mL. To za določanje PEZ ni bistvenega pomena, saj so njihove terapevtske koncentracije pri odraslih v večini primerov višje od 1 µg/mL. Nizka meja kvantifikacije nima smiselne uporabnosti pri razvoju analitskih metod za aplikacijo pri terapevtskem spremljanju koncentracij zdravil (TDM).

Oertel s sod. so uporabili tekočinsko kromatografijo (LC) z MS s hidrofilnimi interakcijami za določanje pregabalina, gabapentina in pregabalina v človeškem serumu (15). Nirogi s sod. so razvili metodo za določanje pregabalina s pomočjo kemijske ionizacije pri atmosferskem tlaku, vezane z MS detektorjem. Dosegli so zelo nizko mejo kvantifikacije pri 1 ng/mL (16). Matar je razvil metodo za določanje topiramata z LC-MS tehniko, ki je bila uporabljena pri TDM (17).

Za določanje novjših PEZ se uporabljajo tudi metode z derivatizacijskimi reagenti, ki omogočajo UV detekcijo. Takšne metode so primerne za laboratorije, ki nimajo na voljo

fluorescenčnega detektorja. Zhu s sod. so razvili metodo za določanje gabapentina v človeški plazmi po derivatizaciji s fenilizotiocianatom (18). Jalalizadeh s sod. so kot derivatizacijski reagent za določanje gabapentina uporabili 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (19).

1.5. Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (TDM)

TDM (Therapeutic Drug Monitoring) je meritev in klinično spremljanje koncentracij zdravil v telesu, navadno v serumu ali plazmi, ki določi individualno odmerjanje zdravila, prilagojeno vsakemu pacientu posebej. Epilepsija je eno prvih obolenj, katerega uspešnost zdravljenja se je izboljšala z uporabo TDM. Koncentracija učinkovine, ki jo določimo v plazmi ali serumu, omogoča individualno odmerjanje zdravil in prilagoditev odmerka specifičnim zahtevam posameznika.

Razvoj analitskih metod je omogočil merjenje koncentracij zdravil v bioloških vzorcih in tako preučevanje povezave med odmerkom zdravila, njegovo koncentracijo in farmakološkim učinkom. TDM je splošno sprejeta metoda za izboljšanje učinkovitosti zdravil, katerih učinek bolje korelira s koncentracijo v telesu kot z odmerkom (20).

1.5.1. Smiselnost TDM

Potreba po TDM je v glavnem povezana s farmakokinetično variabilnostjo PEZ in tudi z naravo epilepsije in njene terapije.

Za TDM se odločamo, kadar učinkovine izkazujejo naslednje lastnosti:

- Velika interindividualna variabilnost v farmakokinetiki,
- intraindividualna variabilnost v kinetiki zaradi interakcij z drugimi zdravili,
- ugotovljen odnos med koncentracijo zdravila in terapevtskim ali toksičnim učinkom,
- ozko terapevtsko referenčno območje,
- zdravilo naj bi delovalo reverzibilno brez razvoja tolerance,
- učinkovalo naj bi samo zdravilo in ne njegovi metaboliti, razen če te merimo,
- koncentracija nevezanega zdravila v krvi naj bi bila enaka koncentraciji v možganih (20).

1.5.2. Uporabnost TDM pri določenih učinkovinah

Vigabatrin

Serumske koncentracije so znotraj kliničnega odmerjanja vigabatrina linearno odvisne od odmerka. Pri pacientih z manjšim ledvičnim očistkom je potrebno znižanje, pri pacientih z zvečanim ledvičnim očistkom pa zvišanje odmerka zdravila. Vigabatrin se ne metabolizira in se ne veže na serumske proteine. Interakcij, ki bi vplivale na farmakokinetiko zato ni pričakovati.

Povezava med serumskimi koncentracijami in toksičnostjo še ni bila ugotovljena. TDM pri vigabatrinu zato ni zelo potreben, so pa meritve uporabne pri nadzoru sodelovanja bolnika pri zdravljenju. Pri odmerkih med 1000 in 3000 mg naj bi bile serumske koncentracije med 0,8 – 36 µg/mL (21).

Topiramat

Topiramat se po zaužitju hitro absorbira. Najvišje serumske koncentracije nastopijo po eni do štirih urah. 15 % učinkovine se veže na serumske proteine in se slabo presnavlja.

Pri uporabi terapevtskih odmerkov je koncentracijski interval v krvi relativno širok. Serumske koncentracije z istim odmerkom (mg/kg) so pri otrocih za 30 % nižje kot pri odraslih. Pri pacientih s kreatininskim očistkom < 70 mL/minuto je odmerek potrebno zmanjšati za 50 %. Pozornost je potrebna tudi pri pacientih z jetrno disfunkcijo, saj se lahko očistek topiramata zniža. PEZ, ki inducirajo encime lahko zmanjšajo plazemsko koncentracijo topiramata za približno 50 %.

Serumska koncentracija topiramata je od odmerka linearno odvisna. Do sedaj je bilo podano široko območje koncentracij z želenim kliničnim odzivom. Terapevtske koncentracije topiramata so med 5 – 20 µg/mL. TDM topiramata se izvaja za določanje optimalne referenčne koncentracije za posameznika pri neuspehu predhodne terapije in v povezavi z interakcijami z drugimi zdravili (22).

Pregabalin

Absorpcija pregabalina je hitra in linearno povezana z odmerkom. Najvišje serumske koncentracije dosežemo eno uro po peroralni administraciji. Na serumske proteine se ne veže. Skozi ledvice se izloča nespremenjen.

Vpliv starosti ali nosečnosti na serumske koncentracije do danes še nista bila raziskana. Pregabalin ni podvržen jetrnemu metabolizmu in ne inducira ali inhibira jetrnih encimov. Prilagoditev odmerka je potencialno potrebna pri pacientih z ledvično insuficienco.

Zaradi dejstva, da se pregabalin izloča skozi ledvice, naj bi bila pomembnost TDM relativno majhna. Koncentracijsko območje pregabalina naj bi bilo med 2,8 – 8,2 µg/mL (22).

Gabapentin

Gabapentin se iz prebavnega trakta absorbira hitro. Najvišje koncentracije v krvi doseže po dveh do treh urah po peroralnem zaužitju. Biološka uporabnost, ki je najmanj 60 % se s sočasnim jemanjem določenih antacidov zmanjša do 24 %. Absorpcijska kinetika je, verjetno zaradi nasičenosti transportnega sistema, odvisna od odmerka. Skozi ledvice se izloči nespremenjen. Na serumske proteine se ne veže.

Razmerje med koncentracijo v krvi in odmerkom se s starostjo pacienta pomembno spremeni. Pri mlajših otrocih (< 5 let) so potrebni približno 30 % večji odmerki kot pri starejših otrocih. Renalna insuficienca linearno zveča koncentracijo gabapentina. Primeren je za paciente z jetrno disfunkcijo. Ne veže se na proteine in se izloči skozi ledvice. O interakcijah z ostalimi PEZ še ni podatkov. Cimetidin lahko zmanjša njegov ledvični očistek, aluminijevi ter magnezijevi antacidi pa lahko zmanjšajo absorpcijo do 20 %.

Zaradi z odmerkom povezane absorpcijske kinetike je TDM gabapentina primeren po spremembi odmerka in v primeru neuspešne terapije. Raziskav z merjenjem koncentracij v telesu, ki bi se uporabile za TDM še ni bilo navedenih. Pri pacientih s terapevtskimi odmerki so njegove koncentracije med 12 – 20 µg/mL (22).

2. Namen dela

V diplomski nalogi bomo razvili analitsko metodo za hkratno določanje plazemskih koncentracij štirih novejših antiepileptikov: vigabatrina, topiramata, pregabalina in gabapentina. Pri razvoju metode si bomo pomagali z že objavljenimi metodami za določanje teh spojin.

Preučevane učinkovine so slabi kromofori, zato določanje v UV območju ni možno. Učinkovine bomo derivatizirali z NBD-Cl, saj reagent tvori fluorescenčne derivate tako s primarnimi amini kot tudi s sulfamati. Analite bomo ekstrahirali z ekstrakcijo tekoče-tekoče (LL), oziroma na trdnih nosilcih (SPE). Ekstrahirane analite bomo kvantificirali s HPLC z uporabo fluorescenčnega detektorja.

Najprej bomo razvili metodo za določanje spojin v vodnih vzorcih. Med drugim bomo določili optimalno sestavo mobilne faze. Ta nam mora zagotoviti dobro resolucijo naših analitov ter ustrezno kratke analitske čase. V tem delu bomo razvili tudi optimalne pogoje derivatizacije. Največji odziv na FLD bomo dosegli z optimizacijo ekscitacijske in emisijske valovne dolžine. Analite bomo identificirali s pomočjo masnega spektrografa.

Metodo, ki jo bomo razvili na vodnih vzorcih bomo prenesli na biološke vzorce, kjer bomo vzorce pred HPLC analizo ustrezno očistili z ekstrakcijsko metodo. Metodo bomo ustrezno prilagodili novim pogojem, nastalih zaradi ostalih snovi v plazmi, ki jih ne bomo uspeli očistiti pred postopkom derivatizacije.

Po razvoju ustrezne metode za plazemske vzorce bomo metodo validirali po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) (Food and Drug Administration). Določili bomo točnost, natančnost, ponovljivost, mejo kvantifikacije in določili stabilnost naših analitov. Ugotovili bomo ustreznost metode za uporabnost pri TDM.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Biološki material

Uporabljali smo humano plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana.

3.1.2. Standardi

Vigabatrin, $C_6H_{11}NO_2$, $M = 129.157$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Topiramate, $C_{12}H_{21}NO_8S$, $M = 339.363$ g/mol, (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

Pregabalin, $C_8H_{17}NO_2$, $M = 159.23$ g/mol, (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

Gabapentin, $C_9H_{17}NO_2$, $M = 171.237$ g/mol, (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo)

DL-norvalin, $C_5H_{11}NO_2$, $M = 117.15$ g/mol, Sigma grade, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Izoniazid, $C_6H_7N_3O$, $M = 137.139$ g/mol, Fluka Analytical

DL-p-klorofenilalanin, $C_9H_{10}ClNO_2$, $M = 199.63$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

p-fluoro-DL-fenilalanin, $C_9H_{10}FNO_2$, $M = 183.18$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Cikloheksil-D-alanin hidrat, $C_9H_{17}NO_2 \cdot xH_2O$, $M = 171.24$ g/mol (anhidrid), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

4-kloro-7-nitrobenzofurazan, $C_6H_2ClN_3O_3$, $M = 199,55$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.3. Reagenti in topila

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

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

Borna kislina H_3BO_3 $M = 61,83$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Puferske raztopine pH = 2, pH = 3, pH = 5, pH = 6, pH = 7, pH = 9, pH = 10 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)

85 % ortofosforna kislina H_3PO_4 , M = 98, (Merck, Darmstadt, Nemčija)

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

2 M amonijak v metanolu NH_3 , M = 17.03 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

25% vodna raztopina amonijaka NH_3 , M = 17.03 (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.1.4. Naprave in pribor

HLADILNIK (LTH, Škofja Loka, Slovenija)

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

TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

TEHTNICA H 54 AR (Mettler, Greinfensee, Švica)

PH METER MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)

ELEKTROMAGNETNO MEŠALO HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)

MEŠALNIK VIBROMIX 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

ULTRAZVOČNA KADIČKA SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

POLAVTOMATSKE PIPETE 2-20 µl, 20-200 µl in 200-1000 µl (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

MIKROCENTRIFUGIRKE 1,5 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

CELULOZNO ACETATNI FILTER 0,45 µm (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija)

HPLC KOLONE

- Gemini C18 150 x 4,6 mm 5 µm, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Gemini C18 150 x 4,6 mm 3 µm, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

- Gemini C6 Phenyl 150 x 4,6 mm 5 μ m, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

HPLC PREDKOLONA Gemini C18 5 μ m, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)

SPE KOLONE

- Strata X 33 μ m 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Strata X-C 33 μ m 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Oasis MCX 3 mL/60 mg (Waters, Milford Massachusetts Združene države Amerike)

STEKLENI INVENTAR: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala

OSTALI INVENTAR: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M

HPLC SISTEM Agilent technologies 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)

TEKOČINSKI KROMATOGRAFI 1290 Infinity z masnim detektorjem tipa trojni kvadrupol Agilent 6460 (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike)

3.2. Metode

Pri razvoju ustreznih metod smo se soočali s številnimi spremenljivkami, ki smo jih lahko pri določanju naših spojin optimirali. Spremembe smo lahko naredili v postopku ekstrakcije vzorca, lahko smo spremenili postopek derivatizacije ali pa HPLC metodo. Med razvijanjem HPLC metod smo preizkusili več različnih kolon in na koncu izbrali optimalno. Priprava naših vzorcev je potekala tako, da smo najprej izvedli ekstrakcijo za čiščenje pripravljenih plazemskih vzorcev, nato odpareli topilo, s katerim smo ekstrahirali vzorce in nazadnje izvedli derivatizacijo naše spojine. Po derivatizaciji smo nekatere derivate med razvojem metod centrifugirali in te vzorce injicirali na HPLC, ki nam je na koncu podal rezultate v obliki kromatograma.

3.2.1. Priprava osnovnih raztopin za razvoj metode

Osnovne vodne raztopine učinkovin smo pripravili v 5 ml bučke. Pripravljene koncentracije topiramata, pregabalina in gabapentina v raztopini so bile 200 µg/mL. Koncentracija osnovne raztopine vigabatrina je bila 762 µg/mL. Osnovne raztopine topiramata, pregabalina in gabapentina smo hranili v hladilniku pri 4°C. Osnovno raztopino vigabatrina smo razdelili v 0,5 mL alikvote, ki smo jih shranjevali v zamrzovalniku pri -20°C.

Osnovno raztopino NBD-Cl s koncentracijo 10 mg/mL smo pripravili dnevno svežo, raztopljeno v MeOH/ACN 50/50 (vol/vol).

3.2.2. Priprava pufrov

V razvoju metode smo uporabljali razne fosfatne in boratne pufre.

Priprava fosfatnih pufrov za mobilno fazo in spiranje SPE kolon

Priprava 10 mM fosfatnega pufra: 10 mM fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v 500 mL bučko dodali 337 µL ortofosforne kisline in dopolnili z vodo do 500 mL.

Priprava 50 mM fosfatnih pufrov pri pH 2, 4, 4,5, 1,8 in 3,0: Za pripravo teh fosfatnih pufrov smo zatehtali 3,402 g KH_2PO_4 in dopolnili do 500 mL z vodo. Da smo dobili pufer s pH 2,4 3,0 in 1,8, smo umerili pH meter med 2 in 3 s standardnimi puferskimi raztopinami in nato našo raztopino KH_2PO_4 nakisali do želenega pH s pomočjo ortofosforne kisline. Za pripravo pufra s pH 4,5 smo 3,402 g KH_2PO_4 dodali vodo v bučki do 500 mL.

Za pripravo pufra s pH 5 in 6 smo pH meter umerili med 5 in 6 ter 100 mL alikvot osnovne puferske raztopine titirali z NaOH do želenega pH. Te pufre smo uporabljali za spiranje SPE kolon.

Priprava boratnih pufrov za postopek derivatizacije

Boratne pufre smo pripravljali v 100 mL bučki. Za pripravo 50 mM smo zatehtali 0,309 g H_3BO_3 , za 250 mM pa 1,544 g. Na ustrezno kalibriranem pH metru smo raztopine titirali do želenega pH z NaOH. Pripravljali smo raztopine s pH 9, 10 in 11.

3.2.3. Razvoj metode za ekstrakcijo iz plazemskih vzorcev

Ekstrakcija tekoče-tekoče

Ekstrakcijo tekoče-tekoče smo izvedli tako, da smo 1 mL človeške plazme dodali 5 µL osnovne raztopine vigabatrina, pregabalina in gabapentina ter 40 µL standardne raztopine topiramata. 1 mL te raztopine smo dodali 5 mL ekstrakcijskega topila. Ekstrahirali smo učinkovine iz plazme v organsko topilo. Po dodatku ekstrakcijskega topila smo vzorce 30 s mešali na vortexu in nato 3 min centrifugirali pri 12000 *g*. Kot ekstrakcijska topila smo preizkusili diklorometan (DKM), mešanico DKM in izopropanola (iPr), mešanico DKM in acetona ter mešanico diklorometana in terc-butil metil etra (TBME). Topila smo izbrali na podlagi člankov, ki navajajo LL ekstrakcijo pri analitiki določenih spojin (8, 10, 16). Poskusili smo še s sušenjem organske faze z Na₂SO₄ in z dodatkom 1 % TFA (trifluorocetna kislina) v mešanico organskega topila in plazme.

Ekstrakcija na trdnih nosilcih

SPE nosilci, ki smo jih uporabili pri razvoju ekstrakcijskih metod delujejo tako, da stacionarno fazo s kondicioniranjem in ekvilibriranjem aktiviramo. V fazi nanosa se med učinkovinami in stacionarno fazo tvorijo interakcije, ki omogočijo, da se učinkovine zadržijo na stacionarni fazi. Z nosilca jih nato speremo z elucijskim topilom. Kolone, ki smo jih uporabili so temeljile na lipofilnih interakcijah med nosilcem in učinkovino ali pa na kationskih interakcijah. Kolone STRATA-X zadržijo učinkovine na koloni z lipofilnimi interakcijami, STRATA XC ter OASIS MCX pa s kationskimi in lipofilnimi interakcijami.

Plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 1 ali 0,5 mL odmrznjene plazme dodali 5 µL standardne raztopine vigabatrina, pregabalina in gabapentina ter 40 µL standardne raztopine topiramata. Ekstrakcijo smo začeli z metodo za razvoj optimalne ekstrakcije, ki je temeljila na pogojih, katere nam je podal računalniški program: Strata Sample Preparation Method Development Software Version 1.x 2005 Phenomenex Inc., v katerega smo vnesli strukturne formule naših spojin. Uporabljeni pogoji so opisani v metodi SPE 1:

Vzorce ki smo jih smo uporabili pri validaciji HPLC metode smo pripravili tako, da smo 500 µL plazme dodali 20 µL zmesi koncentracij učinkovin, ki so opisane v poglavju 3.3.1. in 10 µL raztopine internega standarda. Raztopino smo 15 s mešali na vortexu in nato

dodali 1 mL 0,1 M HCl. Po dodatku HCl smo vzorce ponovno 15 s mešali na vortexu. Taki vzorci so bili pripravljeni za ekstrakcijo. Pri validaciji smo uporabili ekstrakcijo SPE 2.6

SPE 1

SPE kolona: Strata X 60 mg/mL, strata-x polimerni RP nosilec

Kondicioniranje: 1 mL metanola

Ekvilibracija: 1 mL vode

Nanos vzorca: 1 mL plazme razredčen z 1 mL vode

Spiranje: 1 mL vode

Elucija: 1 mL 1:1 metanol/acetonitril

Naslednjo uporabljeno metodo smo povzeli po članku, ki so ga objavili Mercolini s sod. (14):

SPE 2

SPE kolona: Oasis MCX 60 mg/mL

Kondicioniranje: dvakrat po 2 mL

Ekvilibracija: dvakrat po 2 mL vode

Dodajanje vzorca: 500 µL plazme in 1 mL 0,1 M HCl

Spiranje: dvakrat 1 mL 0,1 M HCl in dvakrat 1 mL 50 mM fosfatni pufer pH = 5 in 50 µL metanola

Elucija: 2 mL NH₃:H₂O:ACN (5:15:80)

Metodo SPE 2 smo modificirali na naslednje načine:

SPE 2.1

Spiranje vzorca smo povečali na 500 µL namesto 50 µL.

SPE 2.2

Spiranje vzorca smo povečali na 1 mL metanola namesto 50 µL.

SPE 2.3

Spiranje z 0,1 M HCl smo povečali na 3 mL.

SPE 2.4

Elucijo smo zmanjšali na 1 mL namesto dveh.

SPE 2.5

Za elucijo smo uporabili 2 M NH_3 v metanolu in spirali z 1 mL H_2O namesto metanola.

SPE 2.6

Za spiranje smo uporabili 1 mL H_2O namesto metanola

Enako metodo kot SPE 2 smo uporabili še s kolono STRATA XC (SPE 3) ter STRATA X (SPE 4).

3.2.4. Sušenje vzorcev

Vzorci smo sušili s pomočjo Turbovapa v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku. Z vsako spremenjeno elucijo ali spremenjeno organsko fazo se je spremenil čas sušenja naših vzorcev. Spremembe so podane v preglednici I.

Preglednica I: Čas sušenja v odvisnosti od topila in tlaka N_2

Topilo	Čas sušenja	Tlak N_2
5 mL DKM : iPr 1:1	30 min	2 bar 20 min, 5 bar 10 min
5 mL DKM	20 min	2 bar
5 mL DKM : aceton 1:2	45 min	2 bar 30 min, 5 bar 15 min
5 mL DKM : aceton 1:1	35 min	2 bar 20 min, 5 bar 15 min
5 mL TBME: DKM 4:1	30 min	2 bar
5 mL TBME: DKM 1:1	30 min	2 bar
5 mL TBME: DKM 1:1	30 min	2 bar
1 mL 1:1 MeOH/ACN	15 min	5 bar
2 mL NH_3 : H_2O :ACN 5:15:80	35 min	5 bar 20 min, 7 bar 15 min
2 mL 2M NH_3 v MeOH	30 min	5 bar

3.2.5. Derivatizacija učinkovin

Za osnovni postopek derivatizacije učinkovin smo si izbrali metodo, ki so jo uporabili Bahrami s sod. (8). Po sušenju vzorcev smo jim dodali 100 μL raztopine NBD-Cl, 100 μL diklorometana in 25 μL 50 mM boratnega pufra pri $\text{pH}=10$. Po 10 sekundnem mešanju

vzorcev na vortexu smo 200 μ L vzorca prenesli iz steklenih epruvet za sušenje v mikrocentrifugirke, v katerih je derivatizacija potekala 15 minut.

Pri optimizaciji metode smo poleg 50 mM uporabili še 250 mM boratni pufer s pH 9, 10 in 11.

Na koncu postopka smo raztopino centrifugirali 3 minute pri 12000 *g* ter 140 μ L supernatanta prenesli v inserte, ki smo jih vstavili v vialo.

3.2.6. Izbor kolone na HPLC

Pri razvoju metode smo preizkusili tri različne kolone :

- Gemini C18 150 x 4,6 mm 5 μ m
- Gemini C18 150 x 4,6 mm 3 μ m
- Gemini C6 Phenyl 150 x 4,6 mm 5 μ m

3.2.7. Izbor optimalnih pogojev HPLC analize

Kot organski del mobilne faze smo preizkusili acetonitril in metanol, kot vodni del mobilne faze pa fosfatni pufer z različnimi pHji: 1,8 2,4 3,0 in 4,5. Pri pH 2,4 smo spreminjali tudi pufersko moč. Pri tem pH smo uporabili 10 mM in 50 mM raztopino. Ostale pufre smo pripravili kot 50 mM raztopino. Spreminjali smo pretok mobilne faze in odstotek organske faze. Preverili smo tudi vpliv temperature na ločbo, metode smo izvedli s termostatiranjem kolone na 45, 50 in 55°C.

3.2.8. Optimizacija pogojev fotopomnoževalke

Pri razvoju metode smo preizkusili detekcijo z ojačitvami fotopomnoževalke med vrednostma 9 in 13.

3.2.9. Identifikacija derivatov

V potrditev predvidenega poteka reakcije derivatizacije smo derivate analizirali z masnim spektrometrom. Vodni vzorec derivatov smo pripravili po optimiziranem postopku in vzorec analizirali na HPLC s FLD z optimalno metodo za določanje koncentracije derivatov. Spremenili smo le mobilno fazo in namesto fosfatnega pufra uporabili 50 mM amonijev acetat. Vzorce derivatov, ki so se eluirali iz kolone, smo ločeno zbrali v vialo in jih uporabili za analize na masnem spektrometru. Uporabili smo tekočinski kromatograf

1290 Infinity z masnim detektorjem tipa trojni kvadrupol Agilent 6460. Vzorce smo direktno injicirali v masni spektrometer brez kolone in kot mobilno fazo uporabili ACN/50 mM amonijev acetat 1/1 (vol/vol). Ionski izvor je bil elektrosprej pri atmosferskem tlaku in negativnem načinu ionizacije. Spektre vzorcev smo posneli v »full scan« načinu.

3.2.10. Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine

Kot osnovo za ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino smo izbrali vrednosti, ki so jih pri derivatizaciji topiramata z NBD-Cl uporabili Bahrami s sod. (8). Kot izhodno ekscitacijsko valovno dolžino smo zato uporabili 470 nm. Bahrami sod. so uporabili emisijsko valovno dolžino pri 537, mi smo uporabili 530 nm.

Za določanje optimalne ekscitacijske in emisijske valovne dolžine smo posneli spektre derivatiziranih učinkovin tako, da smo z UV detektorjem posneli spekter ekscitacijskih valovnih dolžin. Spekter emisijskih valovnih dolžin smo posneli s FLD detektorjem.

3.2.11. Izbira internega standarda

Izbirali smo med naslednjimi internimi standardi:

- Cikloheksil-D-alanin hidrat
- DL-norvalin
- DL-p-klorofenilalanin
- Izoniazid
- p-fluoro-DL-fenilalanin
- 2-fluoro-DL-fenilalanin

3.3. Validacija HPLC metode

Za dokazovanje primernosti naše metode za uporabo na plazemskih vzorcih smo izvedli validacijo na podlagi FDA standardov za validacijo bioanaliznih metod (23)

3.3.1. Priprava standardov za validacijo

Standarde za validacijo smo pripravili v mikrocentrifugirkah, razen interni standard. Zatehte so prikazane v preglednici II.

Preglednica II: Zatehta standardnih raztopin

Spojina	Masa (mg)	Volumen (mL)
Vigabatrin	4,97	1
Topiramat	4,87	1
Pregabalin	5,02	1
Gabapentin	4,90	1
IS: DL-p-kloro-fenilalanin	1,90	5

Za postopek validacije smo pripravili osem koncentracij naših spojin in tri koncentracije za kontrolo kakovosti. Poleg osmih koncentracij smo analizirali še vzorec brez dodatka naših učinkovin.

Plazemske vzorce smo pripravili v plastičnih epruvetah. 500 μL plazme smo dodali 20 μL zmesi naših štirih spojin v ustrezni koncentraciji ter 10 μL raztopine internega standarda.

Pripravili smo osnovno zmes naših raztopin, ki je ustrezala koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ topiramata ter 40 $\mu\text{g/mL}$ ostalih treh spojin. V osnovno mešanico smo dodali 125,75 μL topiramata, 102,6 μL gabapentina, 99,6 μL pregabalina in 102 μL vigabatrina. Dodali smo še 70 μL vode, da smo imeli 500 μL osnovne raztopine (OR1), iz katere smo pripravili nadaljnje redčitve. Redčitve so prikazane v preglednici IV.

Priprava osnovnih raztopin je opisana v preglednici III.

Preglednica III: Priprava osnovnih raztopin

	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) vigabatrina, pregabalina, gabapentina	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) topiramata	Volumen osnovne raztopine (μL)	Volumen H_2O (μL)
OR 3	1	1,25	40 μL OR2	360
OR 2	10	12,5	100 μL OR1	300

Preglednica IV: Priprava standardnih koncentracij

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) vigabatrina, pregabalina, gabapentina	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) topiramata	Volumen osnovne raztopine (μL)	Volumen H_2O (μL)
0	0	-	-
OR3			
0,5	0,625	50	50
0,75	0,9375	75	25
1	1,25	40	360
OR2			
2,5	3,125	25	75
5	6,25	50	50
10	12,5	100	300
OR1			
20	25	50	50
40	50	500	0

Na skrajni desni so zapisane vmesne redčitve, iz katerih smo redčili nadaljnje vzorce. Osnovne raztopine smo označili z oznako OR1-3. Predstavljale so standardne koncentracije in služile za nadaljnjo pripravo le-teh.

Priprava standardov za nadzor kakovosti je prikazana v preglednici V.

Preglednica V: Priprava QC standardov

	Koncentracija QC ($\mu\text{g/mL}$) vigabatrina, pregabalina, gabapentina	Koncentracija QC ($\mu\text{g/mL}$) topiramata	Postopek redčenja V OR	V H ₂ O
Nizka QC koncentracija (Ql)	0,875	1,094	175 μL OR3	25
Srednja QC koncentracija (Qm)	7,500	9,375	150 μL OR2	50
Visoka QC koncentracija (Qh)	30.00	37,50	150 μL OR1	50

3.3.2. Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala zagotavlja odzive instrumenta, ki so sorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu. Linearnost preverimo s statistično obdelavo analize standardov. Z dobljenimi rezultati določimo regresijsko premico z metodo najmanjše vsote kvadratov odstopanj. Premica ima enačbo $y = k \cdot x + n$, pri čemer je y intenziteta odziva, za kar smo izbrali površino kromatografskih vrhov, x koncentracija analita, n odsek na ordinati in k naklon premice. Korelacijo med koncentracijo in odzivom podajamo s Pearsonovim koeficientom (R) oz. determinacijskim koeficientom (R^2). Dovoljena odstopanja pri koncentracijah vzorcev so 15 oziroma 20 % pri limiti kvantifikacije. Za ugotavljanje linearnosti se priporoča vsaj 6 standardov in slepi vzorec. Da metoda ustreza merilom FDA mora vsaj 75 % vzorcev ustrezati danim zahtevam, oziroma najmanj štiri od šestih vzorcev pri različnih koncentracijah, ne upoštevajoč slepi vzorec (23).

3.3.3. Točnost

Točnost je sposobnost metode, da določi pravo vrednost oziroma da izmerjena vrednost signifikantno ne odstopa od dejanske. Točnost ugotavljamo s preverjanjem odzivov standardov oziroma vzorcev znanih koncentracij. Iz odzivov s pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunamo določeno koncentracijo in jo primerjamo z dejansko. Izračunana vrednost ne sme odstopati od dejanske za več kot 15 %. Za točke blizu meje kvantifikacije

je dovoljeno rahlo večje odstopanje, do 20 %. Točnost določamo s QC vzorci, kjer imamo tri različne koncentracije QC vzorcev in pri vsakem pet ponovitev. Za zagotovitev točnosti mora biti odstopanje povprečne vrednosti manjše od 15 %, oziroma 20 % pri meji kvantifikacije (23).

3.3.4. Ponovljivost

Ponovljivost je sposobnost metode, da daje vedno enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Ponovljivost bomo določali s QC vzorci, kjer smo vsak dan injicirali pet vzorcev pri isti koncentraciji. Ovrednotimo jo s standardnim odmikom (SD) in koeficientom variacije (CV) (%). Koeficient variacije ne sme odstopati za več kot 15 % in 20 % pri meji kvantifikacije (23). Določili bomo znotrajdnevno ponovljivost in meddnevno ponovljivost za tri dni.

3.3.5. Območje linearnosti

V analitiki poskušamo doseči linearnost v celotnem območju, ki ga določamo. Če odstopanje pri najvišji koncentraciji analita ni večje od 15 % in pri najnižji koncentraciji analita ni večje od 20 %, je metoda linearna v celotnem določenem območju (23).

3.3.6. Meja kvantifikacije (LOQ)

Po FDA smernicah najnižja točka v umeritveni premici ustreza meji kvantifikacije, kadar ta ustreza naslednjim merilom:

- Odziv analita pri najnižji koncentraciji je vsaj 5 krat višji od odziva pri analizi praznega vzorca.
- Vrh analita pri najnižji koncentraciji mora imeti ponovljivost znotraj 20 % in točnost med 80 - 120 % (23).

4. Rezultati

4.1. Ekstrakcija učinkovin

Ekstrakcija tekoče-tekoče

V poglavju 3.2.3 so opisana topila, ki smo jih uporabili pri poskusih LL ekstrakcije. Izkoristek ekstrakcije smo določili iz razmerja odzivov ekstrahiranih vzorcev in vzorcev iste koncentracije, ki jih nismo ekstrahirali.

V preglednici VI so opisani izkoristki ekstrakcije z različnimi organskimi topili.

Preglednica VI: Izkoristek ekstrakcije z različnimi organskimi topil

Poskus	Izkoristek ekstrakcije (%)			
	Vigabatrin	Topiramat	Pregabalin	Gabapentin)
CH ₂ Cl ₂ : iPr 1:1	Moteč vrh	Moteč vrh	46,21	40,70
CH ₂ Cl ₂ : iPr 1:1 + 1 g Na ₂ SO ₄	Moteč vrh	Moteč vrh	35,26	25,53
CH ₂ Cl ₂	-	57,34	-	-
CH ₂ Cl ₂ : aceton 1:2	-	-	30,20	38,35
CH ₂ Cl ₂ : aceton 1:1	-	-	20,24	10,98
TBME: CH ₂ Cl ₂ 4:1	-	60,25	-	-
TBME: CH ₂ Cl ₂ 1:1	-	70,85	-	-
TBME: CH ₂ Cl ₂ 1:4	-	40,56	-	-

Ekstrakcija na trdnih nosilcih

Izkoristki različnih SPE metod so opisani v preglednici VII. Podatkov o izkoristku ekstrakcije za vse učinkovine ob vseh različnih ekstrahiranjih nimamo na voljo, saj so bile prekrite s koelucijo. Ob uporabi končne kromatografske metode bi ponekod lahko dobili rezultate o izkoristkih ostalih analitov. Izkoristek ekstrakcije smo določili iz razmerja odzivov ekstrahiranih vzorcev in vzorcev iste koncentracije, ki jih nismo ekstrahirali.

Preglednica VII: Izkoristek ekstrakcije na trdnih nosilcih

Metoda	Izkoristek ekstrakcije			
	Vigabatrin	Topiramat	Pregabalin	Gabapentin
SPE 1	-	-	1,87	5,77
SPE 2	63,88	63,64	77,16	101,85
SPE 3	-	-	58,42	44,09
SPE 4	74,37	28,06	81,16	73,42
SPE 2.1	-	-	88,17	87,28
SPE 2.2	-	-	129,09	89,38
SPE 2.3	-	-	84,30	69,41
SPE 2.4	-	-	23,41	13,47
SPE 2.5	76,64	180,72	75,233	75,87
SPE 2.6	71,11	84,64	97,17	96,69

4.2. Derivatizacija učinkovin

Osnovni postopek derivatizacije, opisan v poglavju 3.2.5 smo prilagodili za uporabo določenih analitov. V postopku optimizacije smo preizkusili postopek derivatizacije z uporabo boratnega pufra pri pH 9, 10 in 11. Med pH 9 in 10 ni bilo razlike. Pri pH 11 je v mešanici nastala oborina, ki je bila preveč moteča za nadaljnjo analizo s HPLC. Molarnost pufra smo kasneje spremenili na 250 mM, saj smo tako dosegli boljši obseg derivatizacije po ekstrakciji na trdnih nosilcih, kjer smo za spiranje kolone uporabljali 0,1 M HCl. Za uspešno derivatizacijo potrebujemo alkalne pogoje. Večja molarnost alkalnega pufra je uspešneje naalkalila našo derivatizacijsko raztopino, če so ob eluciji učinkovin s SPE

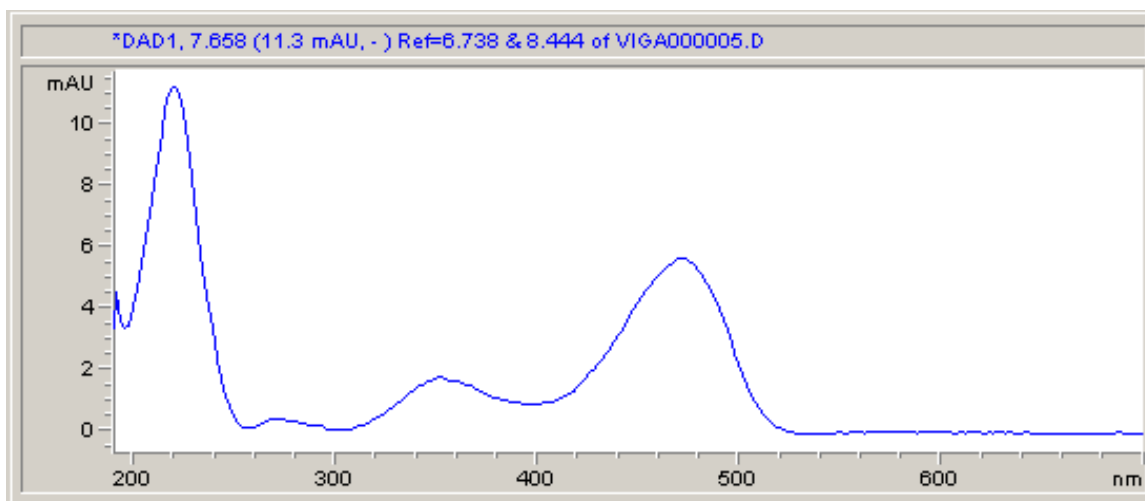
kolone še bili prisotni ostanki HCl. Ko smo razvijali metode HPLC smo odkrili, da uporaba DKM kot derivatizacijskega topila razvleče vrhove vigabatrina. Zato smo namesto 100 μL DKM uporabili 100 μL mešanice acetonitril in metanol v razmerju 1:1 (vol/vol).

Postopku derivatizacije smo na koncu dodali 3 minutno centrifugiranje pri 12000 g pri $T=8^{\circ}\text{C}$. S tem smo odstranili oborino, ki je nastala med derivatizacijo, najverjetneje boratni pufer. Oborino smo odstranili, da bi zaščitili HPLC injektor in kolono pred zamašitvijo zaradi nečistot.

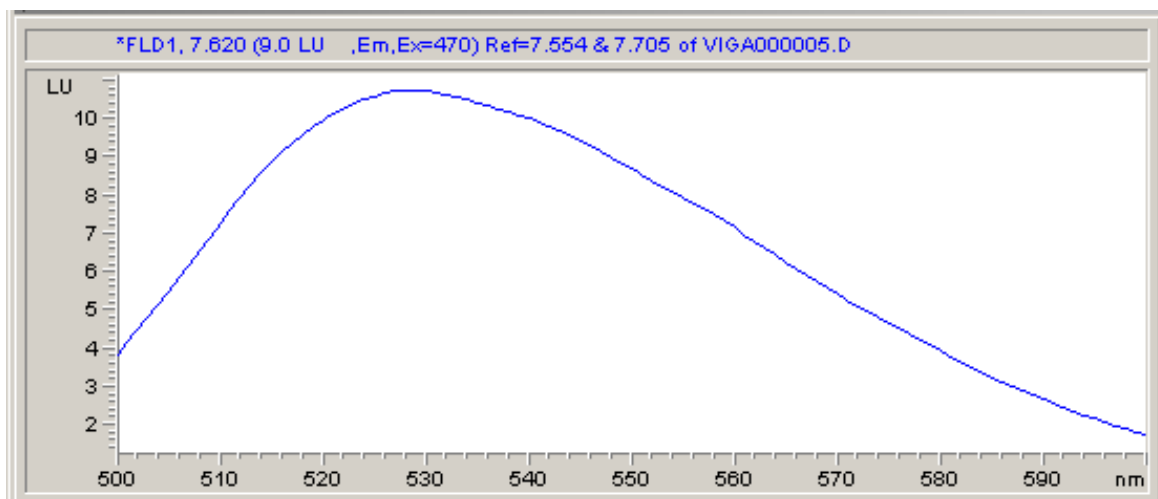
Optimalni pogoji derivatizacije: posušenim vzorcem smo dodali 100 μL raztopine NBD-Cl koncentracije 10 mg/mL, 100 μL ACN:MeOH v razmerju 1:1 (vol/vol) ter 25 μL 250 mM H_3BO_3 s pH 10. Te pogoje smo uporabili tudi pri validaciji. Mešanico smo vorteksirali 30 sekund. Iz steklenih epruvet smo jo prenesli v mikrocentrifugirke z zamaški, ki so onemogočile hlapenje topila. Vzorce smo derivatizirali 15 min pri 60°C na vodni kopeli. Po končanem postopku derivatizacije smo vzorce centrifugirali 3 minute pri 12000 g pri 8°C ter prenesli 140 μL vzorca v 180 μL inserte, ki smo jih vstavili v vialo.

4.3. Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine

Na sliki 10 je prikazan spekter za določanje ekscitacijske valovne dolžine pregabalina, na sliki 11 pa emisijski spekter. Spektri ostalih analitov so enaki.



Slika 10: Ekscitacijski spekter valovnih dolžin derivata pregabalina



Slika 11: Emisijski spekter valovnih dolžin derivata pregabalina

4.4. Izbira internega standarda

Optimalni interni standard smo izbrali tako, da smo ga dodali vzorcu na začetku priprave le-tega. Njegova koncentracija je bila približno enaka koncentraciji naših vzorcev. Kot optimalen interni standard smo izbrali DL-p-klorofenilalanin, saj časa analize na HPLC ni bistveno podaljšal. Tudi eluiral se je kot zadnji, kar ga je lepo ločilo od ostalih snovi, prisotnih v plazmi. Ostale spojine so se eluirale ob istih časih kot snovi iz plazme. Cikloheksil-D-alanin hidrat se je eluiral 5 minut kasneje kot ostali analiti, torej bi nam kot interni standard čas analize nepotrebno podaljšal.

4.5. Kromatografija

4.5.1. Izbira kolone

Kot optimalno kolono za izvajanje kromatografske ločbe smo izbrali kolono Gemini C18 150 mm x 4,6 mm 5 μ m. Z njo smo dosegli ustrezno ločbo določenih vrhov. Dolžina metode z uporabo te kolone je bila okrog 10 minut.

4.5.2. Temperatura segrevanja kolone

Kot optimalno temperaturo smo uporabili 45°C, saj pri višjih temperaturah nismo dosegli opaznih razlik v ločbi naših analitov.

4.5.3. Optimalna mobilna faza

V postopku razvoja kromatografske metode smo preizkusili veliko različnih. Na koncu smo se odločili za gradientno, ki je omogočila relativno kratke analizne čase in dobro ločbo določenih vrhov. Vodni del mobilne faze je predstavljal 250 mM fosfatni pufer pri pH = 4,5, kot organski del mobilne faze pa smo uporabili metanol. Metoda je predstavljena v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Gradient mobilne faze

Čas (min)	% organske faze	Pretok (mL/min)	Tlak (bar)
0,00	50	1,3	145
5,00	50	1,3	145
5,10	56	1,3	132
15,00	56	1,3	132
15,10	50	1,3	145
18,00	50	1,3	145

4.5.4. Nastavitve ojačitve fotopomnoževalke

Za doseg približno enakomernih odzivov smo času elucije posameznih spojin prilagodili ojačitve fotopomnoževalke. Pri času, ko se eluira topiramet, smo ojačitev nastavili na 13, medtem ko smo za ostale tri spojine potrebovali ojačitev 9. Le tako smo sočasno izmerili odziv za vse analite v celotnem koncentracijskem območju

Nastavitve ojačitve fotopomnoževalke v odvisnosti od časa so predstavljene v preglednici IX.

Preglednica IX: Ojačitve fotopomnoževalke med potekom HPLC analize plazemskih vzorcev

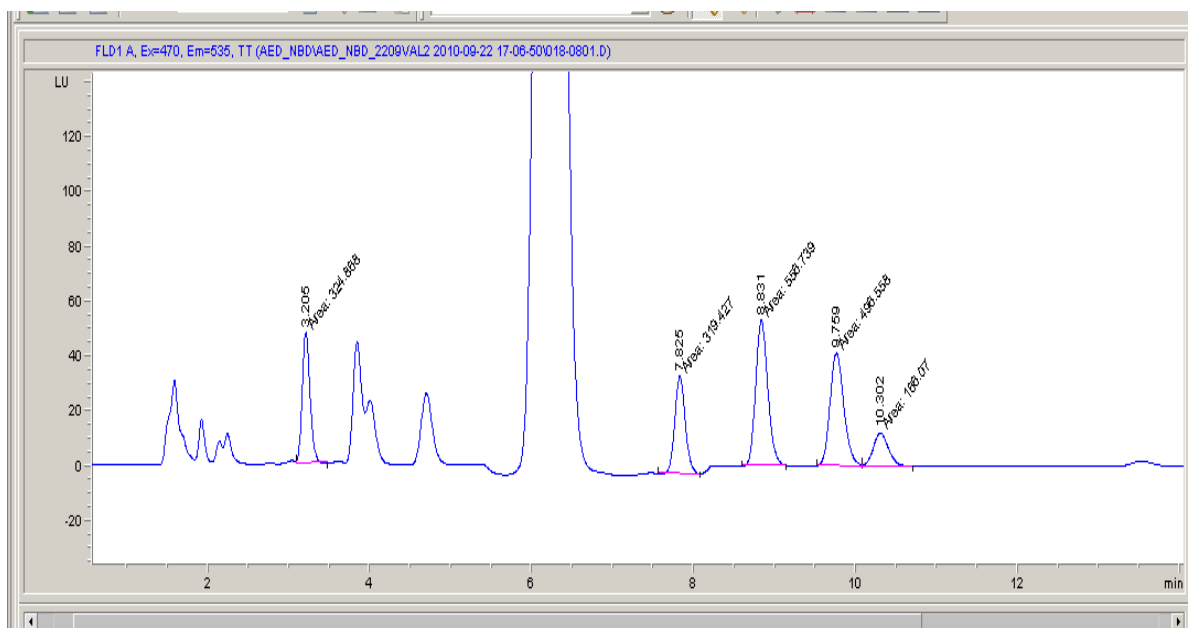
Čas	Ojačitev fotopomnoževalke
0	9
5,30	9
5,31	13
8,25	13
8,26	9
18,00	9

4.5.5. Kromatografska ločba naših spojin.

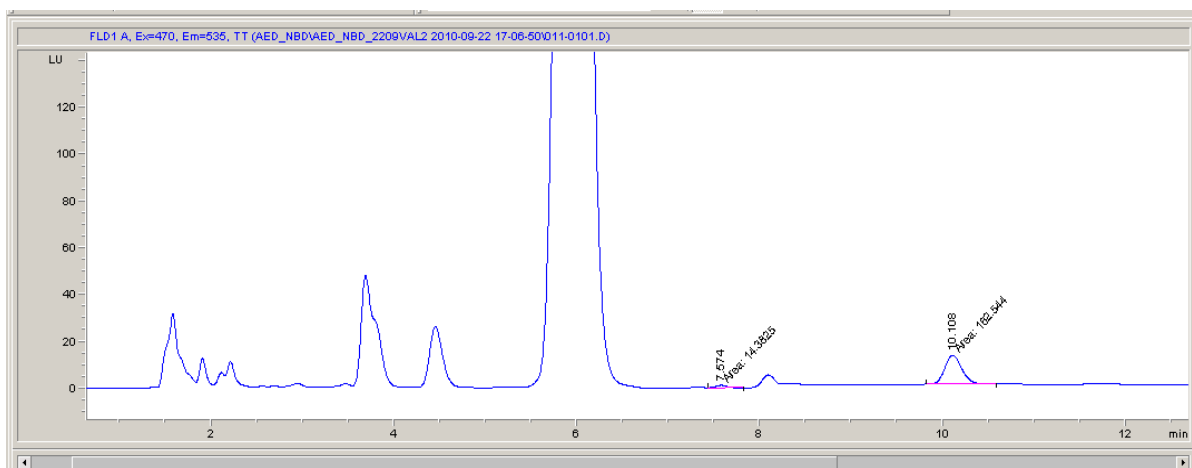
S končno optimizirano metodo so se vsi derivati NBD-Cl eluirali v času do 11 minut. Kromatogram plazemskega vzorca z analiti je prikazan na sliki 12. Slika prikazuje vrhove derivatov vigabatrina, pregabalina in gabapentina koncentracije 20 µg/mL, topiramata pa koncentracije 25 µg/mL. Spojine se eluirajo pri časih, označenih v preglednici X. Na sliki 13 je prikazan kromatogram plazemskega vzorca brez analitov.

Preglednica X: Časi elucije analitov

Spojina	Čas
Vigabatin	3,205
Topiramat	7,825
Pregabalin	8,832
Gabapentin	9,759
Interni standard	10,302



Slika 12: Kromatogram derivatov z NBD-Cl v plazemskem vzorcu



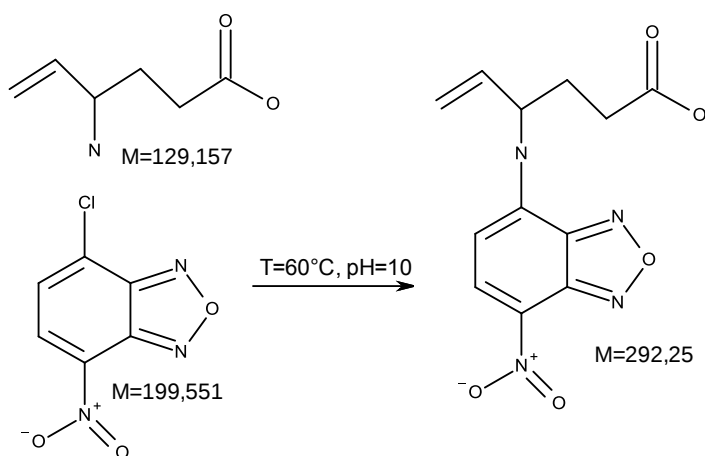
Slika 13: Kromatogram plazemskega vzorca brez analitov

4.6. Identifikacija derivatov

V potrditev predvidenega poteka derivatizacije smo derivate analizirali na masnem spektrometru. Vodne vzorce derivatov smo zbirali v viala na HPLC ob njihovem retencijskem času. Zanimala nas je predvsem derivatizacija topiramata, saj v literaturi nismo zasledili poteka reakcije NBD-Cl z sulfamatno skupino. Analiza na MS se v fosfatnem pufru ne izvaja, zato smo kot vodno fazo izbrali 50 mM pufer amonijevega acetata.

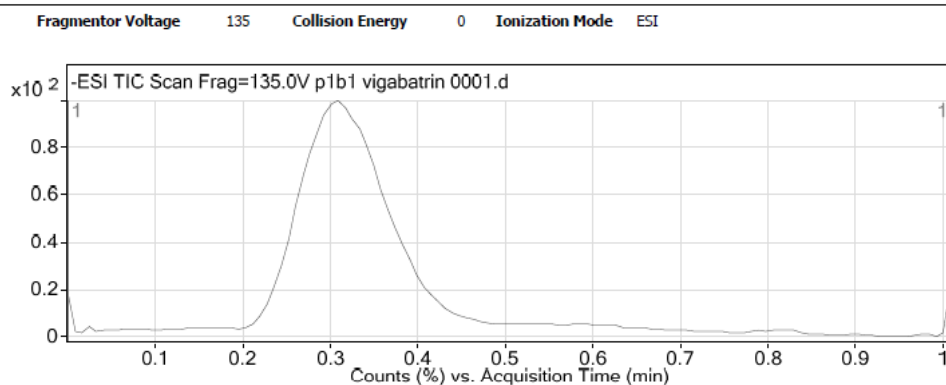
Reakcija vigabatrina z NBD-Cl

Reakcija vigabatrina z NBD-Cl je prikazana na sliki 14. Masni spekter pa na sliki 15.

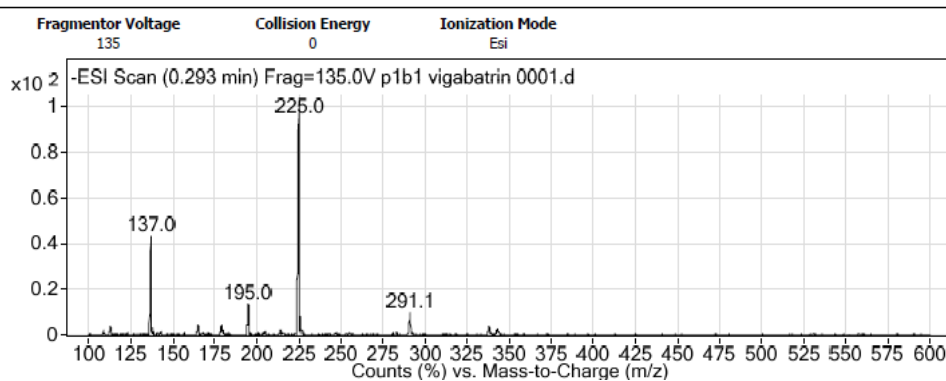


Slika 14: Reakcija vigabatrina z NBD-Cl

User Chromatograms



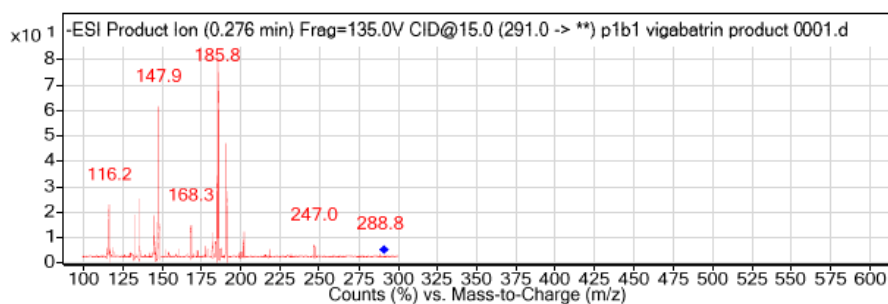
User Spectra



Slika 15: Masni spektrogram derivata vigabatrina

Vrh z m/z 291,1 predstavlja derivat vigabatrina, ki bi ga pričakovali glede na naše predvidevanje o poteku reakcije. Dokazuje nam, da je reakcija res potekla na predviden način.

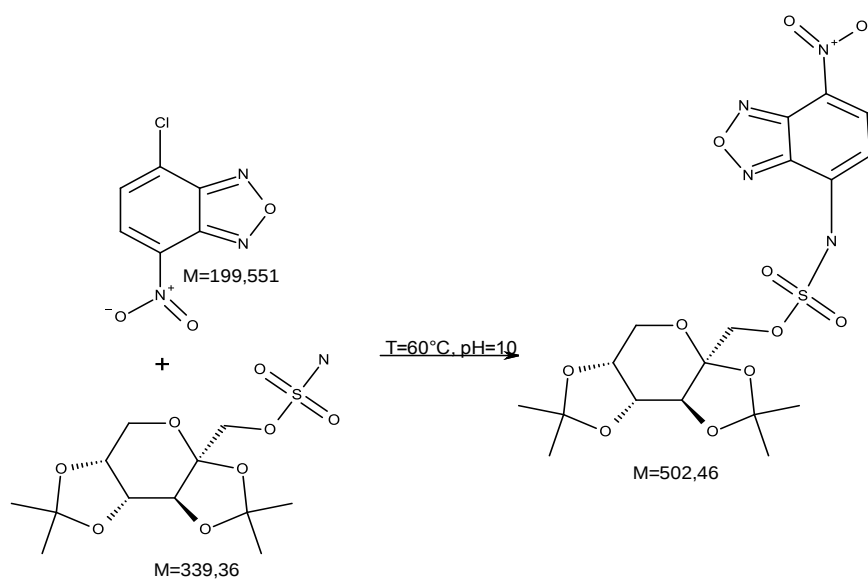
Na sliki 16 so prikazani fragmentni produkti vrha z maso 291,1.



Slika 16: Fragmentacija derivata NBD-CL z vigabatrinom

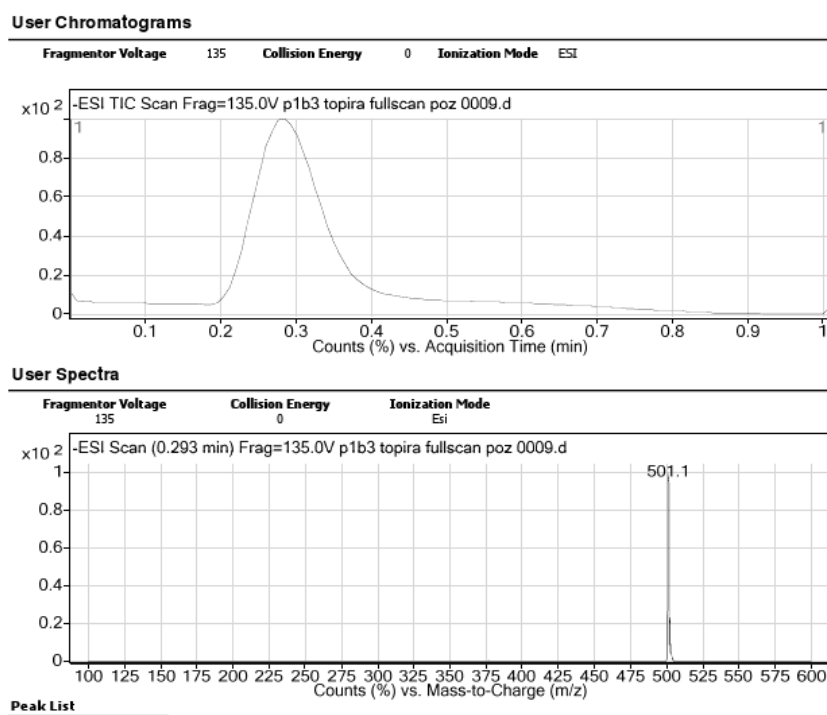
Reakcija topiramata z NBD-Cl

Reakcija topiramata z NBD-Cl je prikazana na sliki 17.



Slika 17: Reakcija topiramata z NBD-Cl

Na sliki 18 je prikazan masni spektrogram topiramata, derivatiziranega z NBD-Cl.

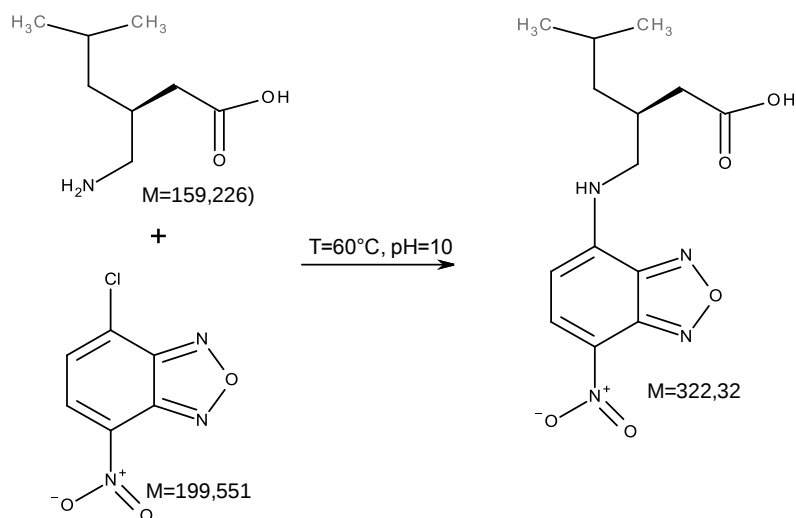


Slika 18: Masni spekter derivata topiramata z NBD-Cl

Derivatizacija je potekla po načrtih, saj vrh z m/z 501,1 predstavlja derivat topiramata.

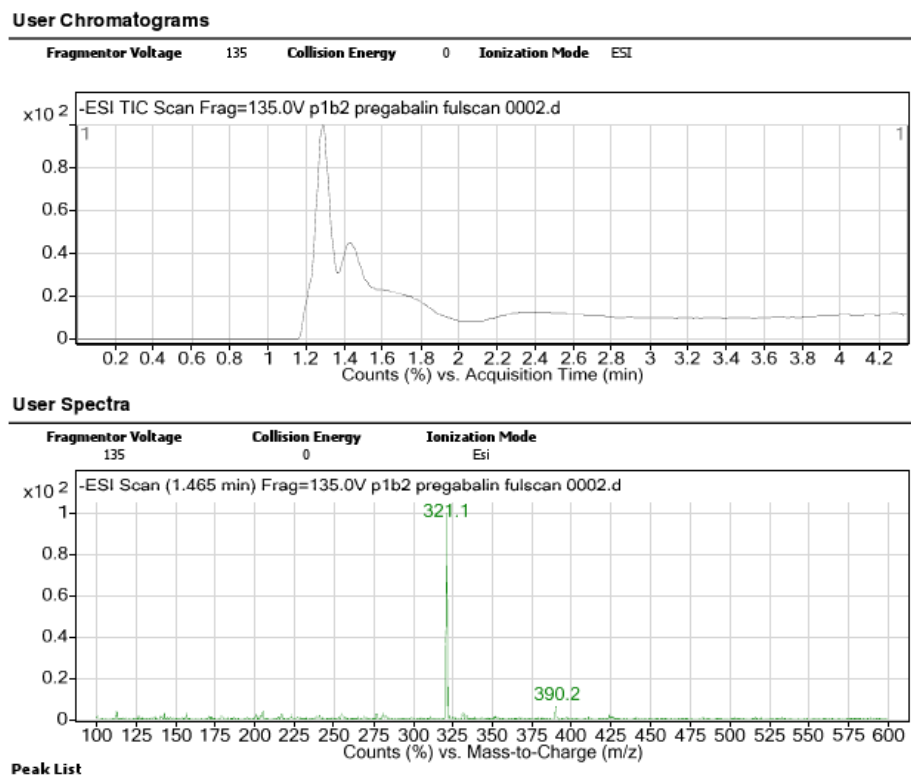
Reakcija pregabalina z NBD-Cl

Na sliki 19 je prikazana reakcija pregabalina z NBD-Cl.



Slika 19: Reakcija pregabalina z NBD-Cl

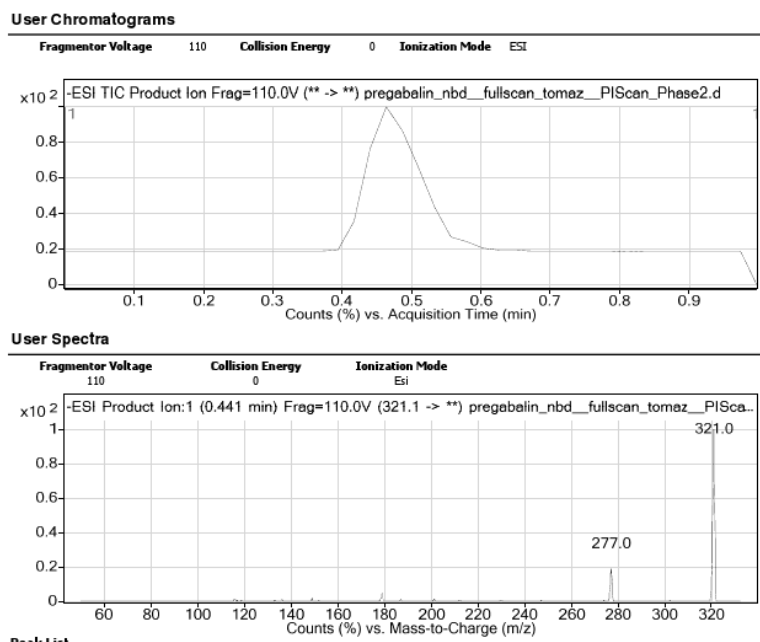
Na sliki 20 je prikazan masni spekter derivata pregabalina z NBD-Cl.



Slika 20: Masni spekter derivata pregabalina z NBD-Cl

Tudi tu nam je masni spekter potrdil predviden potek reakcije, in sicer je naš analit predstavlja vrh z m/z 321,1.

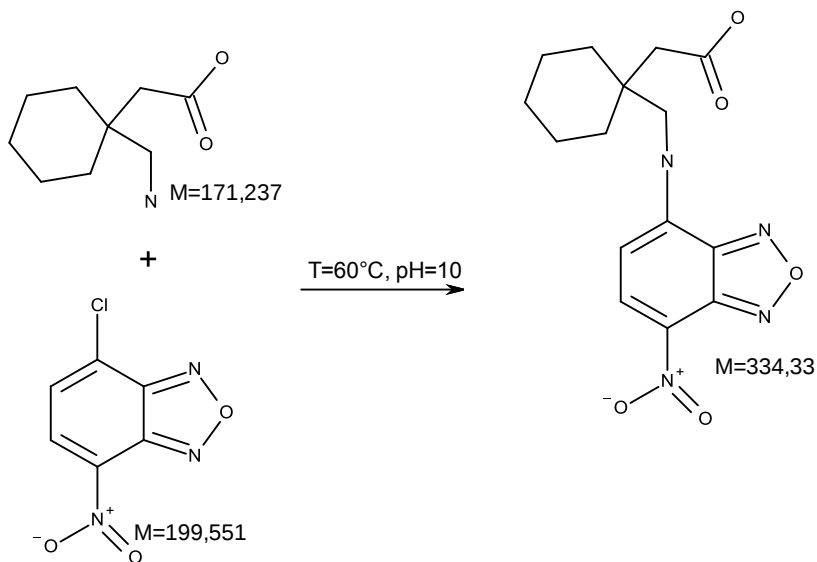
Na sliki 21 so prikazani fragmentni produkti vrha z m/z 321,1.



Slika 21: Fragmentni produkti vrha m/z 321,1

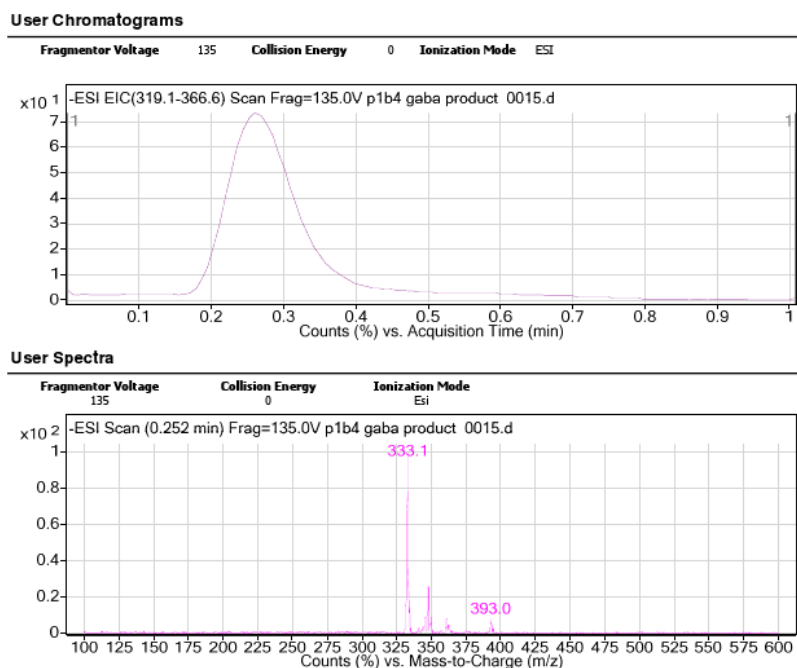
Reakcija gabapentina z NBD-Cl

Na sliki 22 je prikazana reakcija gabapentina z NBD-Cl.



Slika 22: Reakcija gabapentina z NBD-Cl

Na sliki 23 je prikazan masni spekter derivata gabapentina z NBD-Cl.



Slika 23: Masni spekter gabapentina z NBD-Cl

Vrh z m/z 331,1 nam potrjuje predvidevanja o poteku reakcije gabapentina z NBD-Cl.

4.7. Validacija HPLC metode

Validacijo smo izvedli v treh dneh. Iste vzorce smo vsak dan trikrat injicirali na HPLC in iz povprečnih vrednosti določili umeritveno krivuljo, točnost in ponovljivost za vsak analit posebej. Odebeljenih vrednosti v tabeli odzivov analitov pri izračunu umeritvene krivulje nismo upoštevali, saj bi upoštevanje teh vrednosti povzročilo preveliko odstopanje v linearnosti. Standarde smo pripravili po opisu v poglavju 3.3.1. Za določanje umeritvene premice z upoštevanjem IS se namesto površine odziva analita kot osnova uporablja razmerje med površino odziva analita in IS.

4.7.1. Linearnost

Linearnost smo določali z umeritveno premico, s pomočjo katere smo izračunali teoretične vrednosti koncentracij, ki bi jih morali dobiti glede na odziv analitov. Te izračunane vrednosti smo primerjali z dejanskimi in določili odstotek ujemanja izračunanih in dejanskih vrednosti. Odzive analitov smo merili s površino pod vrhom določenega analita.

Vigabatrin

Odzivi derivata vigabatrina so opisani v preglednici XI. Odebeljenih rezultatov nismo upoštevali pri določanju umeritvene premice.

Preglednica XI: Odzivi derivata vigabatrina

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	viga	IS	viga	IS	viga	IS
0,00	0,00	194,20	0,00	169,10	0,00	114,87
0,50	11,60	190,55	8,93	163,97	6,63	120,00
0,75	15,50	186,00	11,93	159,30	10,50	123,63
1,00	18,70	144,10	16,30	161,30	13,30	121,40
2,50	47,75	142,55	40,53	156,03	34,53	130,03
5,00	99,05	201,40	74,30	158,40	64,10	126,77
10,00	247,35	184,20	172,10	163,33	147,77	135,10
20,00	451,20	187,65	339,03	159,00	278,17	118,10
40,00	805,20	175,90	618,87	159,03	530,13	140,00

Enačba premice brez upoštevanja IS

1. dan: $y = 20,53x + 2,16$, $R^2 = 0,997$

2. dan: $y = 15,49x + 2,16$, $R^2 = 0,999$

3. dan: $y = 13,35x + 0,75$, $R^2 = 0,999$

Enačba premice z upoštevanjem IS

1. dan: $y = 0,115x + 0,005$, $R^2 = 0,999$

2. dan: $y = 0,97x + 0,011$, $R^2 = 0,999$

3. dan: $y = 0,094x + 0,016$, $R^2 = 1,000$

Točnost umeritvene premice vigabatrina je opisana v preglednici XII. Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah.

Preglednica XII: Točnosti odzivov derivata vigabatrina

c (µg/mL)			Točnost %			
	1. dan		2. dan		3. dan	
	brez IS	z IS	brez IS	z IS	brez IS	z IS
0,00	-	-	-	-	-	-
0,50	113,02	96,24	115,33	89,45	99,35	82,42
0,75	86,67	90,14	84,08	87,61	97,38	96,86
1,00	80,59	107,89	91,25	92,56	94,00	98,75
2,50	88,85	114,37	99,07	102,24	101,21	105,66
5,00	94,41	84,40	93,13	94,12	94,89	103,73
10,00	-	-	109,69	107,11	-	-
20,00	109,38	104,07	-	-	103,88	-
40,00	97,80	99,17	99,52	99,65	99,11	99,92

Metoda je vse dni ustrezala FDA zahtevam za določanje linearnosti.

Topiramat

Odzivi derivatov topiramata so opisani v preglednici XIII. Odebeljenih rezultatov nismo upoštevali pri določanju umeritvene premice.

Preglednica XIII: Odzivi derivata topiramata

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	topi	IS	topi	IS	topi	IS
0	18,80	194,20	19,27	169,10	23,03	114,87
0,63	31,20	190,55	29,10	163,97	28,87	120,00
0,94	47,50	186,00	27,90	159,30	36,70	123,63
1,25	35,30	144,10	32,33	161,30	38,23	121,40
3,13	57,75	142,55	51,90	156,03	48,40	130,03
6,25	109,05	201,40	68,87	158,40	62,17	126,77
12,50	291,45	184,20	188,53	163,33	139,57	135,10
25,00	461,05	187,65	328,30	159,00	210,10	118,10
50,00	834,05	175,90	636,90	159,03	340,00	140,00

Enačba premice brez upoštevanja IS

1. dan: $y = 16,54x + 19,10$, $R^2 = 0,998$

2. dan: $y = 12,40x + 19,48$, $R^2 = 0,999$

3. dan: $y = 6,43x + 28,39$, $R^2 = 0,994$

Enačba premice z upoštevanjem IS

1. dan: $y = 0,093x + 0,101$, $R^2 = 0,999$

2. dan: $y = 0,078x + 0,117$, $R^2 = 0,999$

3. dan: $y = 0,044x + 0,260$, $R^2 = 0,985$

Točnost umeritvene premice topiramata je opisana v preglednici XIV. Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah.

Preglednica XIV: Točnosti odzivov derivata topiramata

c (µg/mL)	Točnost %					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	brez IS	z IS	brez IS	z IS	brez IS	z IS
0	-	-	-	-	-	-
0,63	116,99	107,65	124,18	124,30	-46,80	-63,44
0,94	183,13	177,03	72,46	79,68	101,17	93,05
1,25	78,33	123,81	82,95	85,72	95,31	102,42
3,13	74,77	104,71	83,69	88,51	89,66	82,28
6,25	87,02	75,85	-	-	79,73	83,77
12,50	-	-	109,09	106,40	138,19	139,99
25,00	106,90	101,48	99,64	99,89	-	-
50,00	98,56	99,95	99,60	99,69	98,00	97,85

Metoda samo drugi dan ustreza zahtevam linearnosti metode

Pregabalin

Odzivi derivatov pregabalina so opisani v preglednici XV. Odebeljenih rezultatov nismo upoštevali pri določanju umeritvene premice.

Preglednica XV: Odzivi derivata pregabalina

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	pregabalin	IS	pregabalin	IS	pregabalin	IS
0,00	0,00	194,20	0,00	169,10	0,00	114,87
0,50	15,90	190,55	12,10	163,97	12,57	120,00
0,75	25,20	186,00	20,23	159,30	24,67	123,63
1,00	29,35	144,10	30,43	161,30	27,43	121,40
2,50	78,10	142,55	70,87	156,03	73,57	130,03
5,00	147,75	201,40	140,47	158,40	131,97	126,77
10,00	298,45	184,20	277,10	163,33	264,13	135,10
20,00	593,50	187,65	564,60	159,00	514,07	118,10
40,00	1210,35	175,90	1110,70	159,03	1079,40	140,00

Enačba premice brez upoštevanja IS

1. dan: $y = 30,15x - 0,64$, $R^2 = 1,000$

2. dan: $y = 27,83x + 0,81$, $R^2 = 1,000$

3. dan: $y = 26,74x - 0,51$, $R^2 = 0,999$

Enačba premice z upoštevanjem IS

1. dan: $y = 0,169x + 0,000$, $R^2 = 0,998$

2. dan: $y = 0,175x + 0,001$, $R^2 = 1,000$

3. dan: $y = 0,192x + 0,043$, $R^2 = 1,000$

Točnost umeritvene premice pregabalina je opisana v preglednici XVI. Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah.

Preglednica XVI: Točnosti odzivov derivata pregabalina

c (µg/mL)			Točnost %			
	1. dan		2. dan		3. dan	
	brez IS	z IS	brez IS	z IS	brez IS	z IS
0,00	-	-	-	-	-	-
0,50	109,75	99,49	81,17	82,93	97,84	64,86
0,75	114,29	107,36	93,08	95,85	125,56	109,13
1,00	99,49	120,85	106,47	107,14	104,52	95,64
2,50	104,47	129,76	100,71	103,57	110,82	109,10
5,00	98,44	-	100,38	101,24	99,09	104,10
10,00	99,20	95,86	99,29	96,91	98,97	99,70
20,00	98,53	93,54	101,30	101,46	96,22	-
40,00	100,42	101,74	99,71	99,79	100,97	99,92

Metoda vse dni ustreza FDA zahtevam za določanje linearnosti.

Gabapentin

Odzivi derivatov gabapentina so opisani v preglednici XVII. Odebeljenih rezultatov nismo upoštevali pri določanju umeritvene premice.

Preglednica XVII: Odzivi derivata gabapentina

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	gabapentin	IS	gabapentin	IS	gabapentin	IS
0,00	0,00	194,20	0,00	169,10	0,00	114,87
0,50	13,20	190,55	11,23	163,97	14,03	120,00
0,75	16,40	186,00	21,20	159,30	18,93	123,63
1,00	29,00	144,10	25,70	161,30	22,10	121,40
2,50	69,85	142,55	59,50	156,03	56,80	130,03
5,00	128,35	201,40	119,90	158,40	110,97	126,77
10,00	270,40	184,20	246,63	163,33	226,33	135,10
20,00	536,55	187,65	497,57	159,00	465,27	118,10
40,00	1081,05	175,90	974,17	159,03	914,80	140,00

Enačba premice brez upoštevanja IS

1. dan: $y = 27,02x - 1,09$, $R^2 = 1,000$

2. dan: $y = 24,43x + 0,83$, $R^2 = 1,000$

3. dan: $y = 22,92x + 0,16$, $R^2 = 1,000$

Enačba premice z upoštevanjem IS

1. dan: $y = 0,152x - 0,016$, $R^2 = 0,998$

2. dan: $y = 0,154x + 0,002$, $R^2 = 1,000$

3. dan: $y = 0,163x + 0,031$, $R^2 = 1,000$

Točnost umeritvene premice gabapentina je opisana v preglednici XVIII. Odebeljeni rezultati odstopajo več kot je dovoljeno po smernicah.

Preglednica XVIII: Točnosti odzivov derivata gabapentina

c (µg/mL)	Točnost %					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	brez IS	z IS	brez IS	z IS	brez IS	z IS
0,00	-	-	-	-	-	-
0,50	105,75	112,14	85,12	86,91	121,08	105,56
0,75	86,29	91,36	111,14	114,00	109,23	100,03
1,00	111,36	143,04	101,78	102,59	95,74	92,78
2,50	105,02	133,33	96,05	98,85	98,85	99,72
5,00	95,82	86,08	97,47	98,34	96,69	103,74
10,00	100,49	97,78	100,61	98,20	98,68	101,02
20,00	99,50	94,74	101,66	101,82	101,47	-
40,00	100,14	101,52	99,60	99,68	99,77	99,88

Metoda vse dni ustreza FDA zahtevam za določanje linearnosti.

4.7.2. Točnost

Točnost smo določali na podlagi smernic z zahtevo, da povprečna vrednost petih QC vzorcev ne odstopa več kot 15 % od predvidene oziroma 20 % pri meji kvantifikacije.

Vigabatrin

V preglednici XIX so določene točnosti na podlagi QC vzorcev brez upoštevanja IS.

Preglednica XIX: Točnost metode za določanje vigabatrina brez upoštevanja IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
78,54	89,06	86,07	107,94	117,95	81,57	98,34	114,58	103,85
90,47	82,70	52,28	93,33	110,01	110,41	112,24	118,24	112,35
94,94	105,60	86,07	118,25	123,19	107,34	117,66	128,71	122,89
93,95	98,61	111,00	116,84	119,81	112,59	116,17	129,23	118,78
98,42	88,43	75,61	111,01	117,70	103,08	108,13	121,56	121,80
Povprečna vrednost								
91,26	92,88	82,21	109,48	117,73	103,00	110,51	122,46	116,00

Točnost za vigabatrin ni zadovoljiva samo pri analitiki v drugem dnevu, ko odstopata dve povprečni vrednosti več kot 15 % pri srednjem in visokem QC vzorcu.

V preglednici XX je določena točnost derivata vigabatrina z upoštevanjem IS.

Preglednica XX: Točnost metode za določanje vigabatrina z upoštevanjem IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
74,01	92,94	80,64	111,77	113,20	101,97	110,43	107,54	138,28
94,47	85,00	54,29	129,34	106,80	131,31	108,73	113,80	129,64
111,15	111,34	79,58	109,96	138,64	151,43	110,03	125,01	134,95
100,65	103,30	127,61	109,44	130,34	141,38	106,58	122,15	136,28
112,92	93,47	47,67	121,33	116,39	-	111,20	113,63	137,15
Povprečna vrednost								
98,64	97,21	77,96	116,37	121,08	131,52	109,39	116,42	136,23

Točnost metode z upoštevanjem IS je primerna samo prvi dan.

Topiramat

Točnost metode za določanje topiramata na podlagi QC vzorcev brez upoštevanja IS je predstavljena v preglednici XXI.

Preglednica XXI: Točnost metode za določanje topiramata brez upoštevanja IS

c (1,09375 µg/mL)			c (9,375 µg/mL)			c (37,50 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
111,30	81,42	82,41	124,84	131,83	85,88	106,25	199,84	119,55
98,67	91,41	65,66	88,38	138,98	162,53	164,02	208,24	173,88
131,74	98,98	98,63	174,28	159,09	151,07	160,50	219,26	223,99
140,34	131,67	87,46	159,24	180,39	155,30	196,04	221,99	195,42
135,23	105,03	108,73	142,81	171,84	135,28	144,28	206,75	214,29
Povprečna vrednost								
123,45	101,70	88,58	137,91	156,43	138,01	154,22	211,22	186,09

Točnost pri določanju topiramata ni ustrezna pri nobenem od treh dni.

Točnost metode za določanje topiramata z upoštevanjem IS je predstavljena v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Točnost metode za določanje topiramata z upoštevanjem IS

c (1,09375 µg/mL)			c (9,375 µg/mL)			c (37,50 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
101,60	84,90	75,38	129,09	126,76	102,72	119,28	187,51	157,09
99,80	93,88	66,57	122,29	135,17	184,94	158,85	200,36	198,01
149,40	104,27	89,02	161,82	179,39	203,92	150,06	212,89	242,76
145,65	137,82	98,15	148,93	196,61	186,58	179,81	209,78	221,27
150,30	110,94	66,92	155,86	170,25	-	148,35	193,20	240,48
Povprečna vrednost								
129,35	106,36	79,21	143,60	161,64	169,54	151,27	200,75	213,75

Tudi z upoštevanjem IS točnost metode za določanje topiramata ne ustreza smernicam.

Pregabalin

Točnost metode za določanje pregabalina brez upoštevanja IS je predstavljena na preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Točnost metode za določanje pregabalina brez upoštevanja IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
112,68	92,23	118,87	95,49	97,13	99,84	93,76	94,90	100,19
117,73	102,17	86,96	94,33	94,70	95,99	102,97	95,65	93,37
96,36	94,61	109,25	96,42	98,28	92,29	105,32	99,65	99,48
102,19	85,47	112,31	100,37	84,58	103,59	101,82	101,74	100,53
96,36	82,29	101,82	102,89	96,75	87,99	94,64	100,39	94,84
Povprečna vrednost								
105,06	91,35	105,84	97,90	94,29	95,94	99,70	98,47	97,36

Metoda za določanje brez upoštevanja IS vse dni ustreza smernicam za določanje točnosti.

Točnost metode za določanje pregabalina z upoštevanjem IS je predstavljena na preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: : Točnost metode za določanje pregabalina z upoštevanjem IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
98,01	95,94	96,42	98,01	93,13	120,91	105,14	89,02	130,82
113,47	104,67	78,18	129,58	91,84	110,60	99,62	92,01	105,65
104,13	99,44	87,45	88,87	110,49	126,14	98,36	96,73	107,13
101,05	89,25	111,78	93,18	91,92	126,02	93,29	96,12	113,11
102,05	86,71	96,42	111,47	95,57	-	97,20	93,79	107,00
Povprečna vrednost								
103,74	95,20	85,88	104,22	96,59	120,92	98,72	93,53	112,59

Metoda ustreza smernicam za določanje točnosti. Edino odstopanje je 3. dan pri srednji koncentraciji.

Gabapentin

Točnost metode za določanje gabapentina brez upoštevanja IS je predstavljena na preglednici XXV.

Preglednica XXV: Točnost metode za določanje gabapentina brez upoštevanja IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
117,94	95,44	109,83	99,14	105,02	97,59	95,04	95,67	102,04
106,85	93,19	127,15	92,79	100,34	102,18	99,99	100,07	97,22
122,37	94,99	148,42	110,20	96,27	96,71	107,07	99,06	103,37
101,53	97,24	92,02	99,19	100,83	103,46	97,65	99,75	102,77
118,82	79,24	80,64	97,05	97,52	100,09	92,70	97,29	96,93
Povprečna vrednost								
113,50	92,02	111,61	99,67	100,00	100,00	98,49	98,37	100,59

Metoda vse dni ustreza smernicam za določanje točnosti.

Točnost metode za določanje gabapentina z upoštevanjem IS je predstavljena na preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Točnost metode za določanje gabapentina z upoštevanjem IS

c (0,875 µg/mL)			c (7,50 µg/mL)			c (30,00 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
113,20	99,36	95,44	102,73	100,70	120,291	106,72	89,75	134,8542
113,64	95,56	122,45	128,67	97,33	119,8253	96,85	96,26	111,3377
145,92	99,91	127,27	102,54	108,25	134,5407	100,12	96,16	112,6654
110,80	101,63	98,11	92,97	109,59	128,1015	89,58	94,24	117,0286
138,86	83,56	47,15	106,15	96,34	-	95,33	90,90	112,5161
Povprečna vrednost								
124,48	96,00	98,08	106,61	102,44	125,69	97,72	93,46	117,68

Metoda za določanje gabapentina z upoštevanjem IS ustreza smernicam za določanje točnosti prva dva dni, tretji dan pa so odstopanja prevelika.

4.7.3. Ponovljivost metode

Znotrajdnevna ponovljivost

Za določanje znotrajdnevne ponovljivosti smo uporabili podatke QC vzorcev drugega dne validacije. Najnižjo koncentracijo bomo označili s Ql, srednjo s Qm in visoko s Qh. Uporabili smo podatke o površini vrhov, iz katerih smo določil SD (standardni odklon) in CV (koeficient variacije). Rezultati znotrajdnevne ponovljivosti metode za naše analite so podani v preglednici XXVII.

Preglednica XXVII: Znotrajdnevna ponovljivost metode

	Ql			Qm			Qh		
Analit	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)
Vigabatrin	14,60	1,43	9,82	139,34	5,73	4,11	571,82	30,05	5,25
Topiramat	33,60	6,25	18,61	212,28	28,21	13,29	1023,12	44,60	4,36
Pregabalin	22,98	1,97	8,57	197,54	11,69	5,92	822,82	25,24	3,07
Gabapentin	20,44	1,62	7,92	184,06	6,25	3,39	721,80	13,59	1,88

Meddnevna ponovljivost

Meddnevno ponovljivost smo določili z uporabo QC vzorcev. Najnižjo koncentracijo bomo označili z Ql, srednjo z Qm in visoko z Qh. Uporabili smo vzorce vseh treh dni in z uporabo površin odziva analitov določili povprečno vrednost, standardni odklon ter koeficient variacije. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXVIII.

Preglednica XXVIII: Meddnevna ponovljivost metode

	Ql			Qm			Qh		
Analit	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)
Vigabatrin	15,03	1,09	7,17	135,03	18,56	13,75	545,30	57,94	10,63
Topiramat	35,70	1,41	4,14	159,63	17,14	10,73	748,73	194,08	25,92
Pregabalin	25,40	0,52	2,05	208,60	3,61	1,73	828,67	21,04	2,54
Gabapentin	22,10	0,85	3,87	183,23	4,68	2,55	725,03	21,93	3,03

4.7.4. Izkoristek ekstrakcije

V preglednici XXIX so podani izkoristki ekstrakcije naših analitov in internega standarda za ekstrakcijsko metodo, uporabljeno pri validaciji.

Preglednica XXIX: Izkoristki ekstrakcije

Koncentracija analitov	Vigabatrin	Topiramata	Pregabalin	Gabapentin	Interni standard
1 µg/mL	73,57	53,41	98,15	96,67	85,36
10 µg/mL	71,11	84,64	97,17	96,68	105,06

4.7.5. Limita kvantifikacije (LOQ)

Kot limito kvantifikacije po FDA smernicah smo uporabili najnižjo koncentracijo iz umeritvene krivulje, ki ustreza zahtevam, da je odstopanje v točnosti manjše od 20 %.

Pri vigabatrinu, pregabalinu in gabapentinu je bila ta vrednost 0,5 µg/mL. Pri določanju limite kvantifikacije topiramata pa je najnižja koncentracija ustrezala zahtevam samo prvi dan, ta koncentracija je 0,63 µg/mL, medtem ko je drugi dan zahtevam ustrezala koncentracija analita pri 1,25 µg/mL, tretji dan pa koncentracija 0,94 µg/mL.

4.7.6. Stabilnost analitov

Pri določanju linearnosti metode smo iste vzorce analizirali v dveh zaporednih dneh. Povprečni odziv se je po tem, ko so vzorci stali čez noč povečal za 4 %.

5. Razprava

V diplomski nalogi smo razvili analizno metodo z uporabo derivatizacijskega reagenta NBD-Cl za določanje štirih novejših antiepileptikov, ki ne absorbirajo UV svetlobe. Metodo smo želeli razviti za rutinsko uporabo v laboratoriju za TDM katerekoli od določenih štirih učinkovin. V literaturi analizne metode, ki bi omogočila hkratno določanje teh štirih učinkovin nismo zasledili. Metoda je izkazala zadovoljive rezultate za določanje vigabatrina, pregabalina in gabapentina. Za določanje topiramata se ni izkazala za ustrezno. Z ustreznimi modifikacijami metode bi verjetno lahko dosegli ustrezne validacijske podatke tudi za določanje topiramata.

5.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija tekoče-tekoče

Z DKM smo dosegli uspešno ekstrakcijo topiramata iz plazme, a nismo uspeli ekstrahirati ostalih spojin. Z uporabo acetona ali izopropanola v kombinaciji z DKM se je izboljšala ekstrakcija pregabalina in gabapentina. Bahrami in sod. so uporabili za ekstrakcijo gabapentina kombinacijo DKM in izopropanola skupaj s sušenjem organske faze z Na_2SO_4 (10). Z uporabo te metode je bil izkoristek približno 35 % in pri retencijskem času topiramata je bila vidna koelucija z vrhovi iz plazme. V našem primeru je bila ekstrakcija uspešnejša brez uporabe Na_2SO_4 . Poskusi s TBME in DKM so bili ravno tako primerni samo za ekstrakcijo topiramata. Nirogi s sod. so TBME in DKM uporabili za ekstrakcijo pregabalina, a pri nas ta s temi topili ni bila uspešna (16). Uporabili so kombinacijo TBME in DKM z dodatkom 1% ortofosforne kisline. Slednjo smo nadomestili s TFA zaradi njene boljše hlapnosti, saj bi nam prisotnost kisline po sušenju vzorca ovirala derivatizacijo. Ob dodatku TFA je bila ekstrakcija vseh spojin neuspešna, saj smo dobili dva vrhova v kromatogramu, kjer smo imeli prej vrh topiramata, ostalih analitov pa nismo uspeli detektirati.

Lipofilnost ekstrakcijskih topil glede na dielektrično konstanto poteka padajoče po naslednjem vrstnem redu: TBME>DKM>Aceton=iPr. Naši rezultati kažejo, da lipofilnejša topila omogočijo uspešno ekstrakcijo topiramata. Ob dodatku izopropanola ali acetona, ki sta bolj hidrofilna, pa lahko ekstrahiramo še pregabalin in gabapentin. Žal po tej metodi ekstrahiramo tudi ostale snovi, prisotne v plazmi.

Ekstrakcija na trdnih nosilcih

Za ekstrakcijo smo uporabili različne kolone. Vse učinkovine smo lahko uspešno ekstrahirali z uporabo metod SPE 2, in 4. Podatkov za SPE 3 z optimizirano HPLC metodo nimamo na voljo. Zaradi nižjih izkoristkov smo uporabo teh kolon namreč opustili, saj nismo dosegli zadovoljivih izkoristkov ekstrakcije pregabalina in gabapentina. Z uporabo kolone Strata-X smo dosegli ekstrakcijo vseh učinkovin, vendar je bil izkoristek ekstrakcije topiramata nizek. Pri ekstrakciji pregabalina in gabapentina so bile prisotne koelucije.

Metodo SPE 2 smo poskušali optimizirati za ekstrakcijo naših spojin. Nosilec stacionarne faze je mešanega tipa, saj vsebuje tako reverznofazne kot tudi kationsko izmenjevalne funkcionalne skupine. Z uporabo osnovne metode smo uspešno ekstrahirali vigabatrin, pregabalin in gabapentin. Za uspešno ekstrakcijo topiramata je bila potrebna nadaljnja optimizacija.

Izvedli smo spremembe pri spiranju. Volumen HCl smo povečali na 3 mL. Spremenili smo tudi volumen spiranja z MeOH. Nič od tega ni povzročilo bistvenih sprememb v odzivih. Ko smo zmanjšali volumen elucije, so se za približno 50 % zmanjšali odzivi analitov, zato smo vztrajali pri eluciji z 2 mL. Za elucijo smo uporabili tudi metanolno raztopino amoniaka, ki je zmanjšala čas sušenja vzorcev. Vzorci pri uporabi tega eluenta niso zgledali enako čisto, saj so bili rumenkasti. Po optimizaciji metode na HPLC smo odkrili, da za ustrezno čistost vzorcev ne potrebujemo spiranja z metanolom. Po tej spremembi smo lahko pri kromatografiji detektirali tudi topiramat. Namesto spiranja z metanolom smo vzorce spirali z 1 mL H₂O. Metodo SPE 2.6 smo uporabili tudi za ekstrakcijo pri validaciji.

Pri metodi SPE 2.6 smo pred elucijo sprali kolono z vodo namesto metanolom, kar nam je lahko nekoliko podaljšalo čas sušenja naših vzorcev pred derivatizacijo. Voda je bila prisotna tudi v elucijski raztopini. Za doseglo ponovljivejših rezultatov pri analizi topiramata bi lahko uporabili metanolno raztopino amoniaka. V primeru, da se naši vzorci niso ustrezno posušili je možno, da je voda preprečila dobro derivatizacijo topiramata. Neponovljivost rezultatov pri določanju topiramata je vidna pri postopku validacije.

Kot osnovo smo uporabili SPE, ki so ga uporabili Mercolini s sod. (14). Pri njihovi metodi so uporabili za ekstrakcijo topiramata drugačno kolono kot za ekstrakcijo gabapentina in vigabatrina. To pomeni, da so imeli za ekstrakcijo treh analitov dva različna postopka, kar

onemogoča sočasno ekstrakcijo analitov iz vzorca. Za ekstrakcijo gabapentina in vigabatrina so uporabili enako kolono kot mi (Oasis MCX), vendar je bila masa nosilca v njihovem postopku 30 mg, v našem pa 60 mg. Druga poglobitna razlika med postopkoma je bila, da smo mi namesto spiranja z metanolom vzorec sprali z vodo. Posledično se je topiramat v fazi spiranja v našem primeru zadržal na nosilcu, v njihovem pa se je spral.

5.2. Derivatizacija

Kot derivatizacijski reagent smo izbrali NBD-Cl, ker smo njegovo uporabo zasledili pri treh od štirih določenih spojin. Bahrami s sod. so ga uporabili pri določanju gabapentina in topiramata (7, 8). Za določanje gabapentina so NBD-Cl uporabili Erturk s sod. (6). Na podlagi njihovih rezultatov smo sklepali, da je možno določati vse tri spojine hkrati. Glede na to, da ima pregabalin podobne lastnosti kot vigabatrin in gabapentin smo sklepali, da bo derivatizacija potekla tudi z molekulo pregabalina. Derivati NBD-Cl so stabilni, kar daje taki derivatizaciji prednost pred metodami z uporabo OPA, kjer je ponavadi potrebno vse vzorce pripravljati sproti, kot so to delali Chollet s sod. (24). V nasprotnem primeru namreč pride do prevelikega razpada derivatov. Mercolini s sod. so uporabili danzil klorid, s katerim bi bilo možno izboljšati točnost metode pri določanju za topiramat (14). Ob uporabi danzil klorida se bistveno podaljša čas derivatizacije, saj reakcija poteka 30 do 120 minut, kar predstavlja veliko oviro pri rutinskem delu.

Pri izvajanju derivatizacije smo najprej uporabili metodo, ki so jo opisali Bahrami s sod. (8). Ta metoda je bila optimizirana za derivatizacijo topiramata, zato smo jo vzeli kot izhodišče. Pričakovali smo slabše odzive derivatov topiramata, saj se NBD-Cl navadno ne uporablja za derivatizacijo sulfamatne skupine. Derivatizacija vseh spojin je uspešno potekla, a smo potem, ko smo kromatografsko metodo optimizirali za plazemske vzorce, opazili razvlečene vrhove vigabatrina. Ko smo iste vzorce injicirali naslednji dan, so bili vrhovi vigabatrina bistveno ožji. Sklepali smo, da nam je v tem času izhlapel DKM, ki je bil uporabljen v prvotni metodi derivatizacije. Posledično smo ga zamenjali s topilom, v katerem smo raztopili NBD-Cl. Ob zamenjavi DKM z ACN/MeOH 1/1 (vol/vol) ni prišlo do bistvene razlike pri vrhu topiramata, nasprotno pa se je razvlečenost vrhov vigabatrina bistveno zmanjšala.

5.3. Kromatografija

Razvita kromatografska metoda je zaradi hkratnega določanja 4 novejših antiepileptikov zelo kompleksna. Izokratske metode analize so se posledično izkazale za neuspešne. Uporabili smo gradientno metodo s spreminjanjem odstotka organskega dela mobilne faze in konstantnim pretokom.

Kljub temu, da bi lahko naše analite določali tudi v UV območju, saj derivati NBD-Cl absorbirajo UV svetlobo, smo izbrali fluorescenčno detekcijo. Ta nam je omogočila izboljšane odzive topiramata pri nižjih koncentracijah. Z ojačitvijo fotopomnoževalke smo lahko znižali mejo kvantifikacije v primerjavi z UV detekcijo istega analita.

Za izvajanje kromatografije smo uporabili Gemini C18 kolono s 5 μm delci. Ta kolona nam je omogočila relativno kratek čas analize. Zadnji vrh, ki je predstavljal interni standard se je eluiral ob času 10,3 minute. Razvoj metode smo začeli z vodnimi vzorci, da ne bi po nepotrebnem uporabljali plazme in tako omogočili detekcijo analitov brez motečih vrhov ostalih spojin, ki se eluirajo iz plazme. Pri razvoju metode z vodnimi vzorci smo uporabljali izokratsko metodo za določanje vseh analiziranih spojin in dosegli zadovoljivo ločbo. Ko smo metodo prenesli na plazemske vzorce, smo lahko z njo detektirali samo pregabalin in gabapentin, ki sta se kot zadnji dve spojini eluirala iz plazemskih vzorcev. Tu smo imeli mobilno fazo sestavljeno iz 60 % metanola in 40 % 50 mM fosfatnega pufru s pH 2,4. Ker s to metodo nismo dosegli ustrezne ločbe vseh spojin, smo poskusili zmanjšati odstotek organske mobilne faze. Ko smo odstotek organske faze zmanjšali na 50 %, smo lahko uspešno detektirali vigabatrin, ki se je sedaj umestil med več vrhov, ki so izhajali iz plazme. Poskušali smo še s spremembo pH in ugotovili, da ob uporabi pufru s pH 4,5 lahko detektiramo tudi topiramat, saj do koelucije, ki je prej zakrivala njegov vrh ni več prišlo. Z nadaljnjim poskušanjem smo odkrili, da potrebujemo nizek odstotek organske faze le prvih 5 minut, da ločimo vigabatrin. Kasneje lahko odstotek organske faze zvišamo, da skrajšamo čas analize. Uporabili smo spremembo iz 50 na 56 %, saj nam je to omogočilo tudi dobro ločbo internega standarda od gabapentina. Pretok, ki smo ga uporabili na začetni metodi smo povečali z 1,2 na 1,3 mL, da smo skrajšali čas analize. Pri naši metodi so se vsi analiti ločili v 11 minutah, kar je primerljivo z metodo Mercolini s sod., ki je trajala 12 minut za 3 različne učinkovine (14). Pri metodi, ki so jo razvili Vermeij s sod. za določanje treh učinkovin po derivatizaciji z OPA se je zadnji analit eluiral pri času 22 minut (12). Metode, ki so prilagojene določanju ene učinkovine so ponavadi krajše. Pri

določanju gabapentina z NBD-Cl so Bahrami s sod. potrebovali 5,2 minut za ločbo analita (8).

Za istočasno določanje vseh štirih spojin smo morali med analizo spreminjati ojačitev fotopomnoževalke. To je bilo potrebno, ker je imel derivat topiramata za približno 16 krat nižji odziv od naših ostalih analitov na fluorescenčnem detektorju. Zvišanje ojačitve fotopomnoževalke za eno enoto podvoji višino odziva analita. Ob retencijskem času topiramata smo zato imeli ojačitev 13, pri retencijskem času ostalih analitov pa 9.

Kolono smo segrevali na temperaturo 45°C, saj tako nismo pospešili njene obrabe, do katere lahko pride pri uporabi visokih temperatur, in ohranili ustrezno ločbo analitov.

Derivatizirane antiepileptike z NBD-Cl smo identificirali s pomočjo tekočinske kromatografije z masnim spektrometrom. Potrdili smo predviden potek reakcije.

5.4. Validacija HPLC metode

Validacijo smo ovrednotili s pomočjo FDA smernic za določanje bioloških vzorcev. Izvedli pa smo teste za linearnost, točnost, ponovljivost ter za 12 urno stabilnost vzorcev.

5.4.1. Linearnost

Metoda je bila linearna v območju med 0,5 do 40 µg/mL za vigabatrin, pregabalin in gabapentin. Linearnost za topiramat smo ugotovljali v območju od 0,63 - 50 µg/mL, a je nismo uspeli potrditi. Rezultati so vse dni precej nihali in določanje linearnosti ni bilo zanesljivo.

5.4.2. Točnost

Pri določanju točnosti za vigabatrin, pregabalin in gabapentin brez upoštevanja IS točnost ustreza FDA smernicam, po katerih naj bi povprečna vrednost točnosti QC vzorcev odstopala za manj kot 15 %, pri meji kvantifikacije pa manj kot 20 %. Pri določanju točnosti z upoštevanjem IS tretji dan točnost ne ustreza smernicam. Vzrok za slabšo točnost vigabatrina z upoštevanjem IS je lahko tudi relativno nizek volumen IS (10 µl), ki smo ga dodajali k vzorcu. Nižji volumni so lahko slabše ponovljivi in točni. Zato bi bilo smiselno za bodoče delo volumen IS povečati na 20 µl.

Pri določanju točnosti metode za določanje topiramata smo z ali brez upoštevanja IS imeli velika odstopanja od pričakovanih rezultatov. Bahrami s sod. so pri metodi z istim derivatizacijskim reagentom dosegli točnost, ki ni odstopala več kot 10 % (8). Uporabili so LL, mi pa SPE ekstrakcijo. To bi lahko bil eden od dejavnikov, zakaj so pri nas odstopanja tako velika. Predvsem pri najvišjem QC vzorcu je bil odziv večkrat 200 % pričakovanega. Možno, da je do tega prišlo zaradi nepopolnega sušenja pri povišanem tlaku z N₂. To napako bi morda lahko odpravili, če bi za elucijo pri ekstrakciji uporabili spojino, ki ne vsebuje vode.

5.4.3. Ponovljivost

Pri določanju znotrajdnevne ponovljivosti metode se je metoda izkazala kot ponovljiva za določanje vseh štirih spojin.

Meddnevna ponovljivost je bila pri vseh analitih razen pri topiramatu znotraj zahtevanih meja. Pri topiramatu je bilo odstopanje večje od 15 % pri srednjem in visokem QC vzorcu.

5.4.4. Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije vigabatrina je med 71 do 73 %, izkoristek ekstrakcija pregabalina in gabapentina med 96 in 98 %, izkoristek ekstrakcije internega standarda pa je med 85 in 105 %.

Najbolj problematičen je izkoristek ekstrakcije topiramata, ki niha med 50 in 85 %. Zanimivo je, da se je ob uporabi elucijskega topila, ki ne vsebuje vode izkoristek ekstrakcije povečal za več kot 100 %. Na podlagi tega sklepamo, da prisotnost vode pri derivatizaciji lahko vpliva na obseg derivatizacije topiramata z NBD-Cl, ki bi lahko bila prisotna v primeru nepopolno posušenega vzorca. Izkoristek ekstrakcije internega standarda precej niha, kar nam lahko razloži nekoliko slabše rezultate linearnosti pri določanju le-te z upoštevanjem internega standarda.

5.4.5. Limita kvantifikacije

Limita kvantifikacije, ki smo jo določili za vigabatin, pregabalin in gabapentin je 0,5 µg/mL. To mejo bi lahko z uporabo večje ojačitve fotopomnoževalke še precej znižali, saj smo odzive teh treh analitov z zmanjšano ojačitvijo ob času njihove elucije prilagodili jakosti odziva topiramata. Pri teh analitih smo uporabili ojačitev, ki da približno

šestnajstkrat nižje rezultate kot ojačitev, ki smo jo uporabili pri času elucije topiramata. Ta limita kvantifikacije je primerljiva z ostalimi metodami, ki so že bile razvite z uporabo istega ali drugih derivatizacijskih reagentov, saj so tam dosegali limite kvantifikacije med 0,05 in 1 $\mu\text{g/mL}$ (6, 12, 14, 25). To bi z ustrezno spremembo ojačitve fotopomnoževalke lahko dosegli tudi mi. Metoda, ki so jo razvili Bahrami s sod. za določanje gabapentina je imela LOQ pri 0,002 $\mu\text{g/mL}$ (10), kar bi nam morda uspelo pri razvijanju metode, specifične za gabapentin. V metodi, ki so jo razvili Nirogi s sod. sega LOQ za določanje pregabalina do 1 ng/mL , a je ta razvita s pomočjo masne spektrometrije (16).

Limita kvantifikacije za topiramat, ki smo jo določili na dan z najboljšimi rezultati je 0,625 $\mu\text{g/mL}$. Bahrami s sod. so z istim derivatizacijskim reagentom dosegli limito kvantifikacije 0,01 $\mu\text{g/mL}$ kar kaže, da je pri nas derivatizacija potekla nekoliko drugače kot pri njih (8). Pri nas takšna kvantifikacija ne bi bila možna niti z vzorci brez ekstrakcije.

6. Sklepi

V diplomski nalogi smo razvili enostavno in hitro HPLC metodo s fluorescenčno detekcijo za določanje štirih novejših antiepileptikov: vigabatrina, topiramata, pregabalina in gabapentina. Metoda je primerljiva z ostalimi, podanimi v literaturi. Njena prednost je v določanju štirih različnih učinkovin hkrati. Primerna je za uporabo v večini laboratorijev, saj ne zahteva dragih analiz, kot je masna spektrometrija. Za uspešno analizo je bilo potrebno določane učinkovine derivatizirati, saj same ne absorbirajo svetlobe v UV ali vidnem območju. Derivatizacijo smo izvedli z NBD-Cl, poteka namreč hitro in na detektorju ne povzroča dodatnega šuma. Plazemske vzorce smo pred derivatizacijo očistili z ekstrakcijo na trdnih nosilcih

Metodo smo validirali po FDA smernicah. Uspešno smo jo validirali za določanje vigabatrina, pregabalina in gabapentina, kjer smo limite kvantifikacije določili pri 0,5 $\mu\text{g/mL}$ in linearno območje med 0,5 in 40 $\mu\text{g/mL}$. Metoda je izkazala ustrezno znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Končna razvita metoda je potekla v času 11 minut.

Težave smo imeli pri validaciji metode za topiramat, saj tam nismo dosegli ustrezne točnosti, linearnosti in ponovljivosti. Za to je možnih več vzrokov: slaba ekstrakcija, neuspešna derivatizacija ali neuspešno sušenje vzorca pred postopkom derivatizacije. Z ustrezno modifikacijo postopka bi verjetno lahko dosegli ustrezne rezultate tudi za določanje topiramata.

Metoda je uporabna za TDM pri vigabatrinu, pregabalinu in gabapentinu, saj je linearna v celotnem terapevtskem območju. Vigabatrini ima najširši terapevtski razpon in sicer sega od 0,8 do 36 $\mu\text{g/mL}$. Naša metoda v celoti pokriva to koncentracijsko območje.

LITERATURA

1. Engel J: Epilepsy : global issues for the practicing neurologist, Demos Medical Pub., New York, N.Y., 2005: 1-3.
2. Čebular B, Zgonc V: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. Zdravstveni vestnik 2006; 75: 379-88.
3. Patsalos PN, Bourgeois BFD: The epilepsy prescriber's guide to antiepileptic drugs, Cambridge University Press, Cambridge, 2010: 95-297.
4. Toyo'oka T: Modern derivatization methods for separation sciences, Wiley, Chichester, 1999: 103-21.
5. Bahrami G, Mirzaeei S, Kiani A: Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 813 (1-2): 175-80.
6. Erturk S, Aktas ES, Atmaca S: Determination of vigabatrin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 760 (2): 207-12.
7. Bahrami G, Mohammadi B: Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 837 (1-2): 24-8.
8. Bahrami G, Mohammadi B: A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007; 850 (1-2): 400-4.
9. Olgun N, Erturk S, Atmaca S: Spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of vigabatrin in tablets. J Pharm Biomed Anal 2002; 29 (1-2): 1-5.
10. Bahrami G, Kiani A: Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 835 (1-2): 123-6.
11. Belal F, Abdine H, Al-Majed A, et al.: Spectrofluorimetric determination of vigabatrin and gabapentin in urine and dosage forms through derivatization with fluorescamine. J Pharm Biomed Anal 2002; 27 (1-2): 253-60.

12. Vermeij TA, Edelbroek PM: Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 810 (2): 297-303.
13. Vermeij TA, Edelbroek PM: High-performance liquid chromatographic analysis of vigabatrin enantiomers in human serum by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde-N-acetyl-L-cysteine and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 716 (1-2): 233-8.
14. Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, et al.: Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53 (1): 62-7.
15. Oertel R, Arenz N, Pietsch J, et al.: Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC-MS. *J Sep Sci* 2009; 32 (2): 238-43.
16. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, et al.: Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of pregabalin in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877 (30): 3899-906.
17. Matar KM: Therapeutic drug monitoring of topiramate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010; 411 (9-10): 729-34.
18. Zhu Z, Neirinck L: High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 779 (2): 307-12.
19. Jalalizadeh H, Souri E, Tehrani MB, et al.: Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 854 (1-2): 43-7.
20. Johannessen SI, Landmark CJ: Value of therapeutic drug monitoring in epilepsy. *Expert Rev Neurother* 2008; 8 (6): 929-39.
21. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, 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): 1239-76.
22. Johannessen SI, Tomson T: Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed? *Clin Pharmacokinet* 2006; 45 (11): 1061-75.

23. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for drug evaluation and research, Rockville, MD, maj 2001.
24. Chollet DF, Goumaz L, Juliano C, et al.: Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 746 (2): 311-4.
25. Sagirli O, Cetin SM, Onal A: Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-vis detection. J Pharm Biomed Anal 2006; 42 (5): 618-24.