

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KONJEDIC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KONJEDIC

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA  
KVANTIFIKACIJO HALOPERIDOLA IN NJEGOVIH  
METABOLITOV V PLAZMI S TEKOČINSKO  
KROMATOGRAFIJO S TANDEMŠKO MASNO  
DETEKCIJO**

**DEVELOPEMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL  
METHOD FOR QUANTIFICATION OF HALOPERIDOL  
AND ITS METABOLITES IN HUMAN PLASMA USING  
LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS  
SPECTROMETRY DETECTION**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, na Fakulteti za Farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

## ZAHVALA

Za mentorstvo se iskreno zahvaljujem doc. dr. Tomažu Vovku. Posebno se zahvaljujem asist. dr. Juriju Trontlju za njegovo somentorstvo in pomoč pri delu ter za vse koristne nasvete. Hvala tudi vsem sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi v laboratoriju pomagali.

Zahvaljujem se svojim staršem, da so mi študij omogočili in ostalim članom družine, ki so mi stali ob strani in vedno verjeli vame. Hvala vsem prijateljem in sošolcem, brez katerih leta študija ne bi bila tako zanimiva in edinstvena. Najlepša hvala pa najbližnjim prijateljicam in prijatelju za zaupanje, podporo in čas, ki smo ga preživeli skupaj.

## Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Urška Konjedic

Ljubljana, marec 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

**VSEBINA**

POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 SPLOŠNO O HALOPERIDOLU .....	1
1.2 FARMAKOKINETIKA HALOPERIDOLA .....	4
1.2.1 Metabolizem .....	4
1.2.2 Encimi.....	5
1.3 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE HALOPERIDOLA IN NJEGOVIH METABOLITOV V PLAZMI .....	9
2. NAMEN DELA.....	11
3. MATERIALI IN METODE .....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Biološki materiali .....	12
3.1.2 Standardi .....	13
3.1.3 Reagenti .....	14
3.1.4 Mobilne faze in topila.....	14
3.1.5 Naprave in pribor.....	16
3.2 METODE .....	17
3.2.1 Priprava osnovnih raztopin, topil in mobilnih faz .....	17
3.2.2 Razvoj tekočinske kromatografije sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (UHPLC–MS/MS) .....	23
3.2.3 Razvoj ekstrakcije.....	24
3.2.4 Validacija metode .....	29
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	34
4.1 Biosinteza halopridol glukuronida .....	34
4.2 Razvoj tekočinske kromatografije sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (LC–MS/MS) .....	36
4.3 Razvoj ekstrakcije .....	40
4.3.1 Obarjanje proteinov z organskim topilom .....	40
4.3.2 Hibridna ekstrakcija na trdnem nosilcu– Hybrid SPE.....	41
4.3.3 Ionsko-izmenjevalna ekstrakcija na trdnem nosilcu.....	43

4.4	Validacija metode.....	45
4.4.1	Linearnost .....	45
4.4.2	Točnost .....	51
4.4.3	Ponovljivost.....	54
4.4.4	Uporabno območje metode.....	55
4.4.5	Spodnja meja kvantifikacije .....	56
4.4.6	Selektivnost / specifičnost .....	56
4.4.7	Izkoristek ekstrakcije.....	57
4.4.8	Stabilnost .....	58
4.5	Aplikacija metode na realne vzorce .....	61
5.	SKLEPI.....	66
6.	LITERATURA .....	68

## POVZETEK

Haloperidol je antipsihotik iz skupine butirofenonov z močnim antagonističnim delovanjem na dopaminske receptorje. Analizne metode za določanje koncentracije haloperidola in njegovih metabolitov v bioloških vzorcih so potrebne za raziskovanje dejavnikov, ki vplivajo na njegovo farmakokinetiko kot tudi na farmakodinamiko. Do sedaj objavljene analizne metode omogočajo določanje haloperidola ter njegovih treh metabolitov (reducirani, piperidinski ter propionski metabolit) z različnimi metodami ekstrakcije ter detekcije. Glavna pomanjkljivost teh metod je prešibka občutljivost in ekstrakcija, ki navadno ne omogoča sočasne določitve učinkovine in vseh metabolitov. V diplomski nalogi smo razvili novo analizno UHPLC metodo z masno detekcijo za sočasno kvantifikacijo haloperidola in njegovih najpomembnejših metabolitov v plazmi: reducirani haloperidol (M2), haloperidol glukuronid in 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin (M1). Vzorce smo ločevali na koloni z obrnjeno fazo Kinetex 100x3mm C18 z gradientno mobilno fazo sestavljenou iz 0,1 %-mravljične kisline in acetonitrila. Za pripravo vzorcev smo preizkusili več možnih načinov ekstrakcije: z obarjanjem proteinov, s hibridno ekstrakcijo na trdnem nosilcu in z različnimi mešanimi ionsko-izmenjevalnimi ekstrakcijami na trdnem nosilcu. Za najboljšo se je izkazala kationsko-izmenjevalna ekstrakcija, saj smo na njej dosegli dobro občutljivost in visok izkoristek, zmanjšali pa smo učinek matrice in s tem dosegli ustrezno točnost in ponovljivost ter visoko selektivnost. Metodo smo nato validirali po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila. Dokazali smo, da je metoda za vse analite točna, ponovljiva, selektivna in linearja v območju 0,1 – 50,0 µg/L za haloperidol in M2, v območju 0,5 – 25,0 µg/L za haloperidol glukuronid ter 0,6 – 10,0 µg/L za M1. Pri M1 nam je validacija uspela le delno, zaradi njegove nestabilnosti v plazmi in prisotnosti nekoliko večjega relativnega učinka matrice. Dosežena spodnja meja kvantifikacije za haloperidol in M2 je bila 0,1 µg/L, za haloperidol glukuronid 0,5 µg/L, za M1 pa 0,6 µg/L s čimer naša metoda po občutljivosti doseže ali preseže vse do sedaj objavljene metode za haloperidol ali njegove metabolite. Z razvito analizno metodo smo uspešno analizirali realne biološke vzorce iz dveh kliničnih študij, kjer je bilo pomembno hkratno spremljanje tako haloperidola kot tudi njegovih metabolitov. S tem predstavlja naše delo pomemben prispevek k znanosti.

## ABSTRACT

Haloperidol is an antipsychotic drug from the butyrophenone class with potent antagonistic effect at dopamine receptors. Analytical methods for the quantitation of haloperidol and its metabolites in biological samples are needed to explore factors that influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics. So far, several analytical methods have been developed to quantify haloperidol and its three metabolites (reduced haloperidol, propionic and piperidine metabolite) but with different methods of extraction and detection. The main disadvantage of these methods is the poor sensitivity and extraction, which usually does not allow simultaneous extraction of haloperidol and its metabolites. In this thesis we have developed a new analytical UHPLC method for simultaneous determination of haloperidol and its major metabolites in plasma: reduced haloperidol (M2), haloperidol glucuronide and 4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidine (M1) using tandem mass spectrometry detection. Analytes separation was achieved on reversed-phased Kinetex column  $100 \times 3\text{mm C18}$  with gradient washing using 0,1% formic acid and acetonitrile as mobile phase. We tested several possible ways of extraction: the precipitation of proteins, with hybrid solid phase extraction and with various mixed ion-exchange solid phase extractions. The best results were obtained with mixed cation-exchange solid phase extraction (MCX). We achieved good sensitivity, high efficiency, reduced matrix effect, and high selectivity. The method was then validated according to the guidelines of U.S. Food and Drug Administration. We demonstrated that the method is accurate, reproducible, and selective for all analytes. It was linear in the range 0.1 to 50.0  $\mu\text{g/L}$  for haloperidol and M2, in the range 0.5 to 25.0  $\mu\text{g/L}$  for haloperidol glucuronide, and 0.6 to 10.0  $\mu\text{g/L}$  for M1. Validation for M1 succeeded only partly, because of poor plasma stability and the presence of matrix effect. The lower limit of quantitation for haloperidol and M2 is 0.1  $\mu\text{g/L}$ , 0.5  $\mu\text{g/L}$  for haloperidol glucuronide and for M1 0.6  $\mu\text{g/L}$ . For all analytes, with the exception of M1, we managed to prove the absence of relative matrix effect. The latter is essential for detection in the mass spectrometer. The developed analytical method was successfully used in real biological samples from two clinical studies, where the simultaneous quantification of haloperidol and its metabolites was important.

## ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

[m/z]	razmerje med maso in nabojem (angl. mass-to-charge ratio)
ACN	acetonitril
adrenergični $\alpha$ 1	adrenergični alfa 1 receptorji
area counts	površina pod kromatografskim vrhom
BLQ	pod spodnjo mejo kvantifikacije (angl. below the limit of quantification)
c	koncentracija
CE	kolizijska energija
CV	koeficient variacije
CŽS	centralni živčni sistem
D1	dopaminski receptorji tipa 1
D2	dopaminski receptorji tipa 2
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
ESI	elektrosprej (angl. electrospray ionization)
FDA	ameriška Agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
FR	fragmentor
GIT	gastrointestinalni trakt
Hal	haloperidol
Hal-g	haloperidol O – glukuronid
HLB	hidrofilno-lipofilni sorbent z obrnjeno fazo
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high performance liquid chromatography)
IM	intramuskularno
IS	interni standard
IS 1	raloksifen
IS 2	$^{13}\text{C}_6$ haloperidol
IV	intravensko
k	naklon premice
LLOQ	spodnja meja kvantifikacije (angl. lower limit of quantification)
M1	metabolit 1 – 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin
M2	metabolit 2 – reducirani haloperidol
M3	metabolit 3 – 3-(4-fluorobenzoil) propanojska kislina
MAX	mešani anionski izmenjevalni sorbent na trdnem nosilcu

	(angl. Mixed-mode Anion eXchange)
MCX	mešani kationski izmenjevalni sorbent na trdnem nosilcu (angl. Mixed-mode Cation eXchange)
Me	učinek matrice (angl. matrix effect)
MF	mobilna faza
MRM	multirezidualna analiza (angl. Multiple Reaction Monitoring)
MS	masni spektrometer
n	odsek na ordinati
PS	primarna osnovna raztopina
Q	kvadrupol ali masni filter
QC h	kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji
QC l	kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
QC m	kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
Re	izkoristek (angl. recovery)
RSD	relativni standardni odklon
SD	standardni odklon
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu (angl. solid phase extraction)
SS	sekundarna osnovna raztopina
SSmix	sekundarna osnovna raztopina mešanice vseh analitov
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil v plazmi (angl. therapeutic drug monitoring)
t <sub>max</sub>	čas za doseg maksimalne koncentracije v plazmi
UDPGA	uridin-5'-difosfoglukuronska kislina
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza (uridin-difosfat-glukuroniltransferaza)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (angl. ultra high performance liquid chromatography)
UV	ultravijolično
WAX	mešani šibki anionski izmenjevalni sorbent na trdnem nosilcu (angl. Mixed-mode Weak Anion eXchange sorbent)
WCX	mešani šibki kationski izmenjevalni sorbent na trdnem nosilcu (angl. Mixed-mode Weak Cation eXchange sorbent)
WS	delovna raztopina
x	neodvisna spremenljivka (koncentracija)
y	odvisna spremenljivka (odziv - površina pod kromatografskim vrhom)

## 1. UVOD

### 1.1 SPLOŠNO O HALOPERIDOLU

#### *Shizofrenija*

Shizofrenija je psihična bolezen, za katero so značilni predvsem prividi, halucinacije in miselne motnje (pozitivni simptomi), poznamo pa tudi negativne simptome, ki zajemajo socialni odmik in oslabljen čustveni odziv. Navadno se bolezen diagnosticira preko akutnih pozitivnih znakov, ki se pojavljajo preko daljšega časovnega obdobja, in lahko nato preide v kronično shizofrenijo, kjer prevladajo negativni znaki. Za to psihično motnjo zboli približno 1 % prebivalstva, navadno je prisotna močna dedna predispozicija. Farmakološka hipoteza shizofrenije je, da imajo bolniki oboleni za shizofrenijo prekomerno aktivnost dopamina. Slednja hipoteza je bila postavljena pri odkritju klorpromazina, predstavnika skupine fenotiazinov, ki je bila prva relativno varna in učinkovita antipsihotična učinkovina z inhibitornim delovanjem na dopaminske receptorje. S shizofrenijo tako povezujemo porast dopaminskih receptorjev v limbičnem sistemu (predvsem v levi hemisferi), nekaj pa je tudi dokazov o vpletenuosti serotonina ter drugih mediatorjev (npr. glutamata). Za zdravljenje akutne in kronične shizofrenije uporabljamo nevroleptike oz. antipsihotike (1-4).

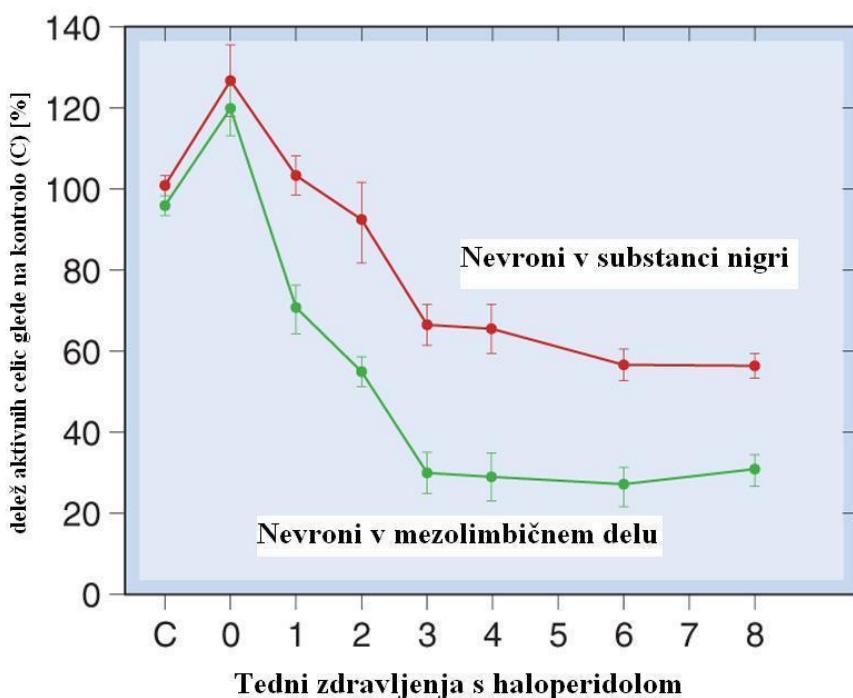
Nevroleptike razdelimo glede na razvoj na dve večji skupini: *klasične* oz. *tipične* in *atipične* antipsihotike. V prvo skupino spadajo učinkovine odkrite pred letom 1980, katerim je bila dokazana inhibicija osrednjih dopaminskih receptorjev D2. Mednje uvrščamo fenotiazine, tioksantene in butirofenone. Atipični nevroleptiki pa so novejše učinkovine z bolj raznolikimi strukturami in z manjšo tendenco povzročanja neželenih učinkov (klozapin, risperidon, olanzapin, kvetiapin...) (2, 5).

#### *Mehanizem delovanja nevroleptikov*

Dopaminske receptorje v centralnem živčnem sistemu (CŽS) razdelimo v dve pomembnejši skupini. Receptorje D1, ki povečajo aktivnost adenilat ciklaze, in receptorje D2, ki posredujejo glavni presinaptični inhibitorni učinek dopamina in postsinaptični stimulatorni učinek dopamina (6).

Antipsihotiki dosežejo terapevtski učinek predvsem z blokado receptorjev D2. Da je antipsihotični učinek terapevtsko izražen, mora antipsihotik centralno blokirati vsaj 80 % receptorjev D2. V srednjih možganih so dopaminergični nevroni prisotni predvsem v substanci nigri in ventralnemu tegmentumu – centralnem delu možganskega debla (mezolimbična in mezokortikalna pot). Vpliv na slednje je odgovoren za antipsihotično delovanje, medtem ko je vpliv na dopaminske nevrone v substanci nigri povezan z neželenimi motoričnimi učinki. Klasični nevroleptiki delujejo na dopaminske nevrone v obeh področjih, zato so za to skupino nevroleptikov značilni zelo izraženi neželeni učinki. Atipični nevroleptiki pa bolj selektivno inhibirajo predvsem dopaminske nevrone v ventralnem tegmentumu, zato so tudi neželeni učinki redkeje izraženi (4, 7).

V začetnem obdobju terapije z vsemi antipsihotiki je zaznana povečana produkcija dopamina. Prav tako tudi začetna povečana aktivnost dopaminergičnih nevronov v srednjih možganih. Zato vsa antipsihotična zdravila začnejo učinkovati šele po nekaj tednih zdravljenja (slika 1) (7).



Slika 1. Prikazan je delež aktivnosti dopaminergičnih nevronov glede na kontrolo (C) v substanci nigri (odgovorna za neželene motorične učinke) in v mezolimbičnem delu, ki je odgovoren za antipsihotično delovanje. Iz slike je razvidno, da se aktivnost dopaminergičnih receptorjev na začetku jemanja antipsihotikov poveča in zmanjša šele po nekaj tednih ter ustali po šestih tednih, ko je dosežen tudi želen antipsihotičen učinek (7).

### ***Haloperidol***

Haloperidol močno centralno inhibira dopaminske receptorje, predvsem receptorje tipa D2. V manjši meri pa inhibira tudi adrenergične  $\alpha_1$  in serotonininske receptorje. Zaradi neselektivne inhibicije dopaminskih receptorjev D2 izstopajo neželeni ekstrapiramidalni učinki (akutne in reverzibilne distonije, parkinsonoidni simptomi in počasi razvijajoča se tardivna diskinezija, ki je velikokrat irreverzibilna). Kot posledica inhibicije drugih receptorjev pa se lahko pojavi suha usta, zamegljen vid, hipotenzija, zlatenica, obstipacija, povečanje telesne teže, daljšanje Q-T intervala... Lahko se pojavi tudi otekanje prsi in laktacija kot posledica porasta prolaktina v krvi (zaradi blokade receptorjev D2 preko tuberohipofizne poti) (3, 7).

Haloperidol spada glede na strukturo med butyrofenone in je še danes najpogosteje uporabljen predstavnik tipičnih antipsihotikov. Je najbolj uporabljen nevroleptik za zdravljenje *akutne* kot tudi *kronične shizofrenije* (7). Želena terapevtska koncentracija je 10 µg/L oz. 4,2 – 11,0 µg/L (8). Predvsem pri akutni shizofreniji je zelo pomembno individualno zdravljenje s spremeljanjem plazemskih koncentracij, saj ima haloperidol ozko referenčno območje (5,6 – 16,9 µg/L) in pomembne interindividualne razlike v farmakokinetiki. Za zdravljenje bolnikov s kronično shizofrenijo pa je referenčno območje v med 17 – 42 µg/L (9).

Haloperidol se uporablja tudi pri:

- paranoji in akutnih stanjih zmedenosti,
- psihomotorični agitaciji (pri maniji, demenci, duševni manj razvitosti, odvisnosti od alkohola) (3),
- kontroliranju trzajev (tikov), predvsem vokalnih pri Tourettejevem sindromu,
- vedenjskih motnjah hiperaktivnih otrok (za obvladovanje prekomerne motorične aktivnosti v povezavi z impulzivnostjo, agresivnostjo, manjšo koncentracijo...) (4),
- Huntingtonovi horei (dedna atrofija bazalnih ganglijev in možganske skorje, ki privede v hudo demenco, ki jo spremljajo nenehni izraziti horeatični zgibki) (5) in
- kot antiemetik pri akutnih emezah po kemoterapijah (10).

Haloperidol igra pomembno vlogo tudi v paliativni medicini, kjer spada med 25 najbolj uporabljenih zdravil. Uporablja ga predvsem za lajšanje simptomov demence, agitacije, migrenskih glavobolov... Prednost je predvsem v različnih načinih

administracije in zaradi možnosti uporabe tudi pri bolnikih z jetrno in ledvično insuficienco (11).

## 1.2 FARMAKOKINETIKA HALOPERIDOLA

### 1.2.1 Metabolizem

Primarni namen metabolizma je, da se navadno visoko lipofilni ksenobiotiki pretvorijo v snovi z nižjo lipofilnostjo in s tem zmanjšajo zadrževanje v tkivih in zvečajo izločanje iz telesa preko urina (12). Ksenobiotiki so v telesu podvrženi različnim biotransformacijam, ki metabolizem glede na vrsto reakcije, razdelijo na prvo in drugo fazo.

Metabolizem prvega reda katalizirajo predvsem encimi citokroma P450. V tej fazi pride do najpomembnejših biotransformacij učinkovin. Drugi fazi metabolizma, v kateri je najpomembnejša konjugacija z glukuronsko kislino, pa se velikokrat posveča premalo pozornosti. Zapostavlja se jo predvsem zato, ker v večini primerov pride do tvorbe bolj polarnih konjugatov, ki se hitro izločajo in so navadno neaktivni. Nemalokrat pa obsežna konjugacija z glukuronsko kislino privede do podaljšanega ali večjega učinka zdravila (enterohepatična cirkulacija, aktiven glukuronid), kot na primer pri morfin-6-glukuronidu. Obstajajo pa tudi primeri, ko pride do novega biološkega učinka ali do toksičnosti. Prav O-glukuronid haloperidola je med vsemi metaboliti haloperidola najbolj zastopan in je morda prav ta odgovoren za enterohepatično kroženje haloperidola, tako kot pri številnih drugih spojinah. Zato se ga ne sme zapostavljati (13).

Zaradi visoke lipoflinosti haloperidola se le-ta obsežno metabolizira. Prav obsežen metabolismus je vzrok velikim interindividualnim razlikam v farmakokinetiki haloperidola. Te pa niso le posledica genetskih polimorfizmov, ampak tudi interetničnih razlik. Pomemben vpliv ima tudi kajenje (14).

Haloperidol se hitro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (GIT). Po peroralni aplikaciji doseže v plazmi najvišjo vrednost po 2 do 6 urah. Porazdeli se predvsem v CŽS in v jetra. V preglednici I lahko primerjamo biološko uporabnost, čas za dosego maksimalne koncentracije v plazmi ( $t_{max}$ ) in razpolovni čas eliminacije haloperidola pri različnih načinu aplikacije (15).

Preglednica I. Primerjava deleža absorpcije, časa za doseg maksimalne koncentracije v plazmi in razpolovni čas eliminacije za haloperidol pri različnih načinih aplikacije; IM – intramuskularno, IV – intravensko (15)

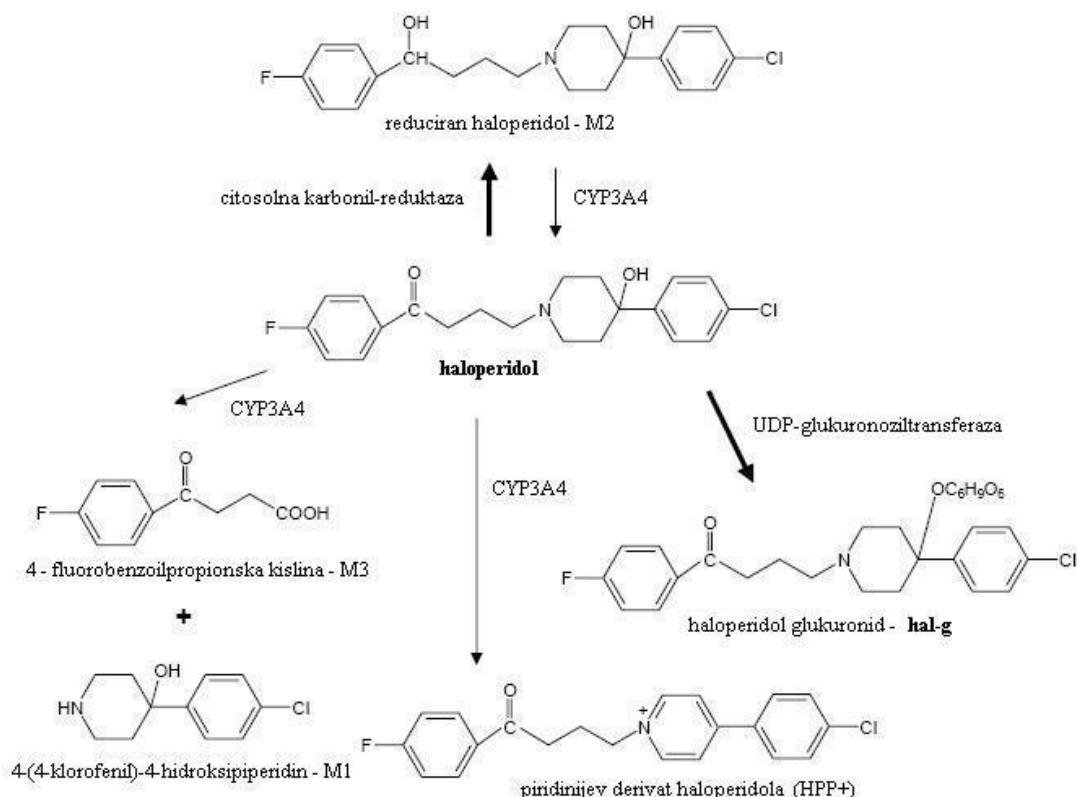
način aplikacije	biološka uporabnost [%]	čas za doseg $t_{max}$	razpolovni čas eliminacije
Per os	60	3 – 5 ur	24 (12 – 38) ur
IM laktat – vodni medij	75	0,33 ur	21 (13 – 36) ur
IM dekanoat – oljni vehikel	75	6 (4 – 11) dni	3 tedne
IV	100	takojšen	14 (10 – 19) ur

V plazmi se ga veliko veže na plazemske proteine (med 70 – 90 %). V prosti obliki pa ga je le 7,5 – 11,6 % (4, 16). Največji del metabolizma haloperidola poteka v jetrih. Približno 15 % zaužitega odmerka se izloči v žolč in okrog 30 – 40 % se eliminira preko ledvic (4, 17, 18). V urinu je največ haloperidol glukuronida (18 % zaužitega odmerka), nespremenjenega haloperidola pa približno 1 % apliciranega odmerka (19-21).

### 1.2.2 Encimi

Številne *in vivo* in *in vitro* študije so dokazale, da je pri biotransformaciji haloperidola citokrom P450 ključnega pomena (14, 22). Najpomembnejše biotransformacije *prve faze metabolizma* haloperidola so naslednje (slika 2):

- N-dealkilacija, ki vodi do nastanka *4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidina (metabolit 1)* in *4-fluorobenzoilpropionske kisline (metabolit 3)*
- redukcija ketonske skupine s citosolno karbonil reduktazo (23), ki vodi do nastanka reduciranega haloperidola (*metabolita 2*)
- reverzna oksidacija reduciranega haloperidola v haloperidol
- N-dealkilacija reduciranega haloperidola (*metabolita 2*) do *metabolita 1*
- nastanek piridinijevega analoga haloperidola ( $HPP^+$ )
- dehidratiran haloperidol, preko katerega nastane haloperidol 1,2,3,6-tetrahidropiridin (HTP)
- piridinijev analog reduciranega haloperidola (*metabolita 2*) ( $RHP^+$ )
- oksidacija piridinijevega analoga reduciranega haloperidola ( $RHP^+$ ) nazaj do piridinijevega analoga haloperidola ( $HPP^+$ ) (14)



Slika 2. Shema biotransformacije haloperidola pri ljudeh; CYP = citokrom P450, UDP = uridin-difosfat [8].

Najpomembnejšo biotransformacijo *druge faze metabolizma* haloperidola predstavlja konjugacija z glukuronsko kislino, v kateri imajo najpomembnejšo vlogo UDP-glukuronoziltransferaze. Pri metabolizmu nastajata dva glukuronida haloperidola: N – glukuronid in O – glukuronid (v nadaljevanju haloperidol glukuronid), vendar je slednjega za več kot 10 krat več, kot N – glukuronida. Glukuronidaciji je podvržen tudi reducirani haloperidol in sicer na hidroksilni skupini, ki nastane po redukciji. Iz urina so izolirali tudi konjugat s sulfatom, ki nastane na isti hidroksilni skupini reduciranega haloperidola (21). V plazmi je največ prisotnega O – glukuronidiranega metabolita (50 – 60 %), sledi mu nespremenjen haloperidol, reducirani analog in reducirani haloperidol glukuronid. Ostali metaboliti, ki smo jih našeli pa so prisotni v manjših deležih (24).

### **Citokrom P450**

Metabolizem prve faze haloperidola še vedno ni popolnoma raziskan in jasen. Fang s sodelavci je identificiral poleg zgoraj naštetih metabolitov tudi nekaj do tedaj neznanih produktov v biotransformaciji haloperidola (25). V *in vitro* študijah so ugotovili, da ima CYP3A4 pri skoraj vseh metabolnih poteh haloperidola najpomembnejšo vlogo (14).

Dokazali so, da je rekombinantni CYP3A4 sposoben katalizirati N – dealkilacijo haloperidola in reduciranega haloperidola, reverzno oksidacijo reduciranega haloperidola do haloperidola in aromatizacijo piridinskega obroča haloperidola, kot tudi reduciranega haloperidola. Redukcija haloperidola do reduciranega haloperidola poteka enantioselektivno. S citosolno karbonil-reduktazo nastane predvsem S(-)-enantiomer reduciranega haloperidola (26).

Vpletenost izoencima CYP2D6 v metabolizem haloperidola kljub številnim raziskavam še vedno ni pojasnjena. V primerjavi z encimom CYP3A4 je vpletenost encima CYP2D6 v metabolizem haloperidola manjša (27). Da je temu tako, priča dejstvo, da je za encim CYP2D6 značilna visoka afiniteta, a majhna kapaciteta, medtem ko ima CYP3A4 nizko afiniteto, a veliko kapaciteto kataliziranja reakcij (14). Vendar *in vivo* študije dokazujejo, da je encim CYP2D6 klinično pomembno vpletен v metabolizem haloperidola, saj prikazujejo, da so plazemske koncentracije haloperidola in reduciranega haloperidola po enkratnem odmerku haloperidola višje pri bolnikih s počasnim CYP2D6 metabolizmom kot pri skupini s hitrim CYP2D6 metabolizmom (28, 29). Veliko raziskovalcev se je ukvarjalo z vplivom polimorfizma CYP2D6 na plazemske koncentracije haloperidola, predvsem na azijski rasi. Ugotovili so, da so encimi kodirani z enim ali dvema aleloma \*3, \*4 in \*5 neaktivni, encimi kodirani z enim ali obema aleloma \*10 izkazujejo zmanjšano metabolno sposobnost (30), alel \*1 pa ohranja aktivnost encima (31).

Genotip najpomembnejšega citokroma CYP3A4 pri metabolizmu haloperidola ne izraža pomembnega vpliva na plazemske koncentracije haloperidola (31). Ker pa se preko citokroma CYP3A4 metabolizira velik delež haloperidola, je le-ta pomemben iz vidika interakcij med učinkovinami. Pri sočasnem jemanju haloperidola in induktorjev ali inhibitorjev encima CYP3A4, lahko pride do pomembnih znižanj / zvišanj plazemskih koncentracij haloperidola in posledično do manjšega učinka antipsihotika ali do zvečanja neželenih učinkov (4, 22, 27). Močni inhibitorji CYP3A4 so ketokonazol, itrakonazol in eritromicin. Močni induktorji CYP3A4, ki s sočasno aplikacijo s haloperidolom zmanjšajo njegove plazemske koncentracije, pa so: karbamazepin, fenitoin, fenobarbital in rifampicin (32).

Iz vidika toksičnosti do dopaminergičnih nevronov (pojav tardivne diskinezije in ekstrapiramidalnih simptomov) je najpomembnejši metabolit strukturni analog nevrotoksične spojine *1-metil-4-fenilpiridinijevega kationa* ( $\text{MPP}^+$ ) - piridinijev analog haloperidola ( $\text{HPP}^+$ ). Odgovoren je za ekstrapiramidalne neželene učinke, ki pogosto spremljajo zdravljenje s haloperidolom. Značilni so predvsem tako imenovani parkinsonski simptomi (33). V plazmi in urinu bolnikov, ki prejemajo haloperidol predstavljata toksičen metabolit  $\text{HPP}^+$  in njegov reducirani analog ( $\text{RHP}^+$ ) približno 3 % dnevnega odmerka haloperidola (34) oz.  $\sim 0,69 \mu\text{g/L}$   $\text{HPP}^+$  in  $\sim 0,41 \mu\text{g/L}$   $\text{RHP}^+$  (35). Tvorbo  $\text{HPP}^+$  katalizira predvsem CYP3A4. Obstajajo pa tudi študije, ki dokazujejo da so slednje katalize sposobni tudi CYP3A5 in CYP3A7 (36).

### ***UDP-glukuronoziltransferaza***

V nedavno objavljenem članku je Kato s sodelavci podrobneje preučil vpliv izooblik UDP-glukuronoziltransferaz (UGT) in njihov kvantitativni prispevek pri nastanku glukuronidov. Ugotovili so, da so za nastanek glukuronidov haloperidola odgovorne različne izooblike UDP-glukuronoziltransferaz. Katera izmed njih ima največjo aktivnost pri glukuronidaciji haloperidola, so preučevali preko kinetičnih analiz na rekombinantnih UGT in na človeških jetrnih mikrosomih, korelacijskih študijah za glukuronidacijo haloperidola in značilnih substratov za UGT1A4, UGT1A9 in UGT2B7 na podganjih jetrnih mikrosomih ter analiz z značilnimi inhibitorji izbranih izooblik UGT (hekogenin, niflumična kislina, gemfibrozil) na rekombinantnih encimih. Ugotovili so, da nastanek O – glukuronida v največji meri katalizira izooblika **UGT2B7** ( $\sim 70 \%$ ), v manjši meri pa UGT1A4 ( $\sim 10 \%$ ) in UGT1A9 ( $\sim 20 \%$ ). Tvorbo haloperidol N – glukuronida pa katalizira izključno izooblika UGT1A4 (37).

Raziskave metabolnih poti zdravilnih učinkovin so pomembne, ker nam omogočijo, da predvidimo morebitne interakcije z drugimi učinkovinami, ki te encime inducirajo ali pa jih inhibirajo in tako prispevajo k spremembam plazemske koncentracije učinkovine. Pomemben dejavnik je lahko tudi genotip, ki je prisoten predvsem med različnimi rasami, saj lahko privede do hitrejšega ali počasnejšega metabolizma in je tako pomemben dejavnik pri korelaciji odmerka in plazemskimi koncentracijami učinkovine (38). V veliko oporo pri določanju oz. vzdrževanju odmerkov ima terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil v plazmi (TDM), kateremu se predpisuje vedno večji pomen. Predvsem je priporočljivo pri učinkovinah z ozkim terapevtskim oknom v izogib toksičnim učinkom ter

učinkovinah z velikimi interindividualnimi razlikami v farmakokinetiki. Haloperidol ima prav tako ozko referenčno območje. Tako je bilo do danes razvitetih že veliko analiznih metod, ki nam omogočajo določitev koncentracij haloperidola v plazmi bolnikov na terapiji z le-tem.

### **1.3 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE HALOPERIDOLA IN NJEGOVIH METABOLITOV V PLAZMI**

Dosedanje metode so v večini razvite za hkratno določanje različnih antipsihotikov v plazmi (39-42), veliko pa je takih, s katerimi se določa le koncentracijo haloperidola (43-45) ali pa haloperidola in njegovega aktivnega metabolita – reducirane haloperidola (46, 47). Razvite so tudi metode, ki poleg haloperidola in metabolita 2 kvantificirajo tudi metabolit 1 in metabolit 3 (48-50).

V omenjenih analiznih metodah so za ločevanje učinkovin in njenih metabolitov največkrat uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (rp-HPLC). Ločitev analitov je torej potekala na nepolarni stacionarni fazi, spiranje pa z mobilno fazo, ki so jo največkrat predstavljala polarna topila v zmesi z vodnimi pufri. Fujii pa je s sodelavci za kvantifikacijo haloperidola v plazmi razvil plinsko kromatografijo (GC) (43).

Priprava bioloških vzorcev je odvisna od njihove čistosti ter vrste kromatografskega sistema in detektorja. Osnovni koraki, ki jih lahko vključimo v proces priprave vzorca, so: homogeniziranje, obarjanje, centrifugiranje, filtriranje, ekstrakcija tekoče / tekoče, ekstrakcija na trdni fazi (SPE), sušenje in »rekonstituiranje« oz. ponovno raztopljanje. Glede na potrebe vzorca in analizne metode se uporablja različne kombinacije opisanih osnovnih korakov. Najpogostejsa ekstrakcija v zgoraj naštetih analiznih metodah je bila eno- ali dvo-stopenjska ekstrakcija tekoče / tekoče (39, 40, 45-47). Dobre izkoristke ekstrakcije (>70 %) pa so dobili predvsem s SPE (44, 49).

Dosedanje metode, razvite za hkratno določanje haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi, zajemajo široka koncentracijska območja. Spodnja meja kvantifikacije za haloperidol v slednjih metodah je 10 µg/L, medtem ko je zgornja meja območja med 200 in 800 µg/L (48-50). Hempenius in sodelavci so limito kvantifikacije za haloperidol spustili na 0,1 µg/L, vendar sočasno ne določajo nobenega od metabolitov (44). Hoja s

sodelavci se je najbolj približal terapevtskemu območju haloperidola (linearno območje 0,1 – 50 µg/L) in hkrati v analizo vključil tudi aktivni metabolit - M2 (47).

Metode, ki se ponašajo z nizko spodnjo mejo kvantifikacije za detekcijski sistem pri kromatografiji največkrat uporabijo masni detektor. Zaradi zaželene zelo nizke limite kvantifikacije (cilj 0,1 µg/L) smo se tudi mi odločili uporabiti tekočinski kromatograf sklopljen z masnim detektorjem tipa trojni kvadrupol (QQQ). Za masne detektorje tega tipa je značilna visoka selektivnost, saj spremljamo tako maso starševskih kot maso hčerinskih ionov. Še pomembnejše pa je, da omogočajo tovrstni inštrumenti izjemno občutljive kvantitativne analize analitov v zapletenih bioloških vzorcih. Za kvantifikacijo se na masnem spektrometru uporablja predvsem tako imenovano multirezidualno analizo - MRM (angl.: *Multiple Reaction Monitoring*). Osnova tovrstnih analiz je kromatografska ločba analitov in detekcija kromatografskih vrhov z masnim spektrometrom, ki analite razbije in detektira nastale fragmente oz. hčerinske ione.

Potek kvantifikacije na masnem spektrometru z MRM:

1. Prvi masni filter oz. kvadrupol (Q1) prepušča starševske ione z določeno vrednostjo  $m/z$ .
2. V drugem kvadrupolu (Q2) oz. v kolizijski celici poteka fragmentacija z inertnim kolizijskim plinom ( $N_2$  ali Ar) na več hčerinskih ionov.
3. Vzopredno pa tretji kvadrupol (Q3) prepušča po eno ali največ dve vrsti starševskemu ionu pripadajočih hčerinskih ionov.
4. Odziv je odvisen od števila hčerinskih ionov, ki priletijo v elektronsko pomnoževalko.

Nobena od prej naštetih analiznih metod sočasno ne določa haloperidola in njegovih najpomembnejših, najbolj zastopanih in potencialno aktivnih metabolitov. Predvsem ne zasledimo metode za določanje haloperidol glukuronida, ki je v plazmi bolnikov, ki se zdravijo s haloperidolom, najpogostejši metabolit. Slednji bi lahko predstavljal aktivno obliko z večjim učinkom, kot se to zgodi pri morfinu, ali bi se v telesu pretvoril ponovno v haloperidol in tako podaljšal učinek antipsihotika. Bistveno je tudi, da območje analizne metode zajema referenčno, kot tudi terapevtsko območje haloperidola.

## 2. NAMEN DELA

Haloperidol je antipsihotik iz skupine butirofenonov z močnim antagonističnim delovanjem na dopaminske receptorje. Analizne metode za določanje koncentracije haloperidola in njegovih metabolitov v bioloških vzorcih so potrebne za raziskovanje dejavnikov, ki vplivajo na njegovo farmakokinetiko kot tudi na farmakodinamiko in predvsem na njegovo toksično delovanje. Do sedaj objavljene analizne metode omogočajo določanje haloperidola ter njegovih treh glavnih metabolitov (reducirani, piperidinski ter propionski metabolit) oz. njegovega glukuronida z različnimi metodami ekstrakcije ter detekcije. Glavna pomanjkljivost dosedanjih metod je slaba občutljivost in priprava vzorcev, ki navadno ne omogoča sočasne ekstrakcije učinkovine in vseh metabolitov.

Namen naloge bo razviti metodo za spremljanje haloperidola in njegovih najpomembnejših metabolitov ([4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin] (M1), [4-(4'-klorofenil)-(4'-fluorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinbutanol] (M2) in haloperidol-β-D-glukuronid (hal-g) v človeški plazmi.

Raziskovalno delo bo obsegalo več možnih načinov ekstrakcije: z obarjanjem proteinov, s hibridno ekstrakcijo na trdnem nosilcu (Hybrid-SPE) in z ionsko-izmenjevalno ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Ekstrakciji bo sledila analitika na tekočinskem kromatografu sklopljenem s tandemskim masnim spektrometrom (LC–MS/MS).

Cilj naloge bo izbor najustreznejše metode ekstrakcije in validacija metode (limita kvantifikacije, točnost, ponovljivost, linearost, specifičnost, stabilnost, učinek matrice) ter analiza vzorcev iz dveh kliničnih študij.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Biološki materiali

###### *Plazma*

Uporabljali smo humano plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana. Imeli smo več različnih plazem, ki smo jih hranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Uporaba človeške plazme za razvoj analiznih metod je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 77/1/07).

*Priprava:* plazmo smo pustili, da se odtaja pri sobni temperaturi, izjemoma smo jo odtalili pod mrzlo tekočo vodo. Pred pipetiranjem smo počakali da se je plazma segregala na sobno temperaturo in jo nato premešali. S tem smo si zagotovili boljšo ponovljivost pipetiranja.

Realne vzorce bolnikov na terapiji s haloperidolom smo dobili iz dveh študij: doktorske disertacije iz leta 2008 in klinične študije iz leta 2011. Vzorce iz doktorske disertacije doc. dr. Igorja Locatellija (51) smo označili z A + št. vzorca in B + št. vzorca (primer: A7, B7). Vzorce iz klinične študije Marije Boškovič mag. farm. z naslovom: »Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami« pa smo označili s št. vzorca in št. vzorca + P (primer: 2, 2P). Vzorca, ki se nanašata na genetiko smo označili z A in B.

Podatki plazem:

Plazma A: odvzem 7.2.2011 alikvot 22.4.2011

Plazma B: odvzem 15.9.2006 alikvot 21.2.2007

Plazma C: odvzem 21.4.2005 alikvot 30.5.2007

Plazma D: odvzem 10.6.2011 alikvot: 21.6.2011

Plazma E: odvzem 14.6.2011 alikvot: 21.6.2011

Plazma F: odvzem 20.9.2011 alikvot 4.10.2011

Plazma G: odvzem 23.9.2011 alikvot 4.10.2011

### **$\beta$ -glukuronidaze**

- $\beta$ -glukuronidaza, tip H-1 iz *Helix pomatia* (Sigma, Steinheim, Nemčija), 1.926.000 enot/g praška
- rekombinantna  $\beta$ -glukuronidaza iz *Escherichie coli* (Sigma, Steinheim, Nemčija), 7.790.000 enot/g praška
- $\beta$ -glukuronidaza izolirana iz govejih jeter (Bovine liver) (Sigma, Steinheim, Nemčija), 10.000.000 enot/g praška

**Človeški jetrni mikrosomi 20 mg/mL, Sigma (Microsomes from liver, Pooled);** gre za združene mikrosome več različnih dajalcev z različnimi genotipi.

Tik pred poskusom smo mikrosome vzeli iz zamrzovalnika, kjer smo jih hranili pri -80 °C. Odtalili smo jih pod tekočo vodo in takoj postavili na led.

#### **3.1.2 Standardi**

- HALOPERIDOL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); **M = 375,87 g/mol**  
4-[4-(4-klorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinil]-1-(4-fluorofenil)-1-butanon
- METABOLIT 1, 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); **M = 211,69 g/mol** 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin
- METABOLIT 2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); **M = 377,9 g/mol**  
 $(\pm)$ -4-(4'klorofenil)-(4'-fluorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinbutanol
- METABOLIT 3, 97 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija);  
**M = 196,18 g/mol** 3-(4-fluorobenzoil) propanojska kislina
- KLORIRAN HALOPERIDOL(Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija);  
**M = 392,3 g/mol** 4-[4-(4-klorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinil]-1-(4-klorofenil)-1-butanon
- HALOPERIDOL GLUKURONID ( $c = 1800,95 \mu\text{g/L}$ ); biosintetiziran, karakteriziran in očiščen na Fakulteti za farmacijo, Ljubljana;  
**M = 552,00 g/mol**
- RALOKSIFEN – *interni standard 1*, ekstrahiran z metanolom iz tablet Evista® (Lilly & Co.), stopnja čistosti: več kot 98,5 %, **M = 474,20 g/mol**
- $^{13}\text{C}_6$  HALOPERIDOL 98,6 % (99 %  $^{13}\text{C}$ ) – *interni standard 2* (Alsa Chim, Francija); **M = 381,9 g/mol**

### 3.1.3 Reagenti

- *Bidestilirana voda* – mili-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost 18,2 mΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) 6 ppb (pri T = 25 °C), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- *Metanol* - CH<sub>3</sub>OH Chromasol V® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *Mravljična kislina* - HCOOH 98-100 % Suprapur® (Merck KGaA, Nemčija)
- *Amonijev acetat* - NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- *Acetonitril* - CH<sub>3</sub>CN, MS Grade (J.T.Baker , ZDA)
- *Ocetna kislina* - CH<sub>3</sub>COOH (J.T.Baker , Deventen, Nizozemska)
- *Fosforna kislina* - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *Puferske raztopine* s pH = 4, pH = 5, pH = 6, pH = 7 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)
- 25 %-amonijak (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- 2,0 M amonijak v metanolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *Natrijev hidroksid* NaOH (Zorka, Šabac, Srbija)
- *Klorovodikova kislina* - HCl kadeča 37 % (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- *UDPGA* – uridin-5'-difosfoglukuronska kislina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *Alameticin* 5 mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

### 3.1.4 Mobilne faze in topila

Vsa spodaj navedena topila in mobilne faze smo pripravili ali pa so že bile pripravljene na Fakulteti za farmacijo (Ljubljana, Slovenija) iz zgoraj navedenih reagentov.

- **MF1 - 0,1 %-mravljična kislina v vodi:** v 0,5 L stekleno posodo, ki jo predhodno speremo z vodo, damo 0,5 L vode in vanjo odpipetiramo 500 µL mravljične kisline. Dobimo mobilno fazo s pH okoli 3.
- **MF2 - 2mM amonijev acetat v vodi:** za pripravo 1 L mobilne faze potrebujemo 154,16 mg amonijevega acetata, ki mu dodamo 1 L vode.

- **MF3 - 0,01 %-mravljična kislina v vodi:** v 1,0 L-stekleno posodo, ki jo predhodno speremo z vodo, damo 1,0 L vode in vanjo odpipetiramo 100 µL 100 %-mravljične kisline.
- **10 %-metanol v vodi - topilo za standarde:** 10 %-metanol smo izbrali zato, da se izognemo vezavi analitov na stene plastike in stekla. Vsak dan smo pripravili sveže topilo. Za 10 mL topila smo v 10 mL-bučko odpipetirali 1 mL metanola iz z vodo dopolnili do oznake.
- **1 %-mravljična kislina v acetonitrilu:** raztopina za obarjanje proteinov pred ekstrakcijo na HybridSPE. Za pripravo 10 mL raztopine odpipetiramo v 10 mL-bučko 100 µL mravljične kisline in z ACN dopolnimo do oznake.
- **4,5 mM amonijev formiat v 10 %-metanolu** smo uporabili kot rekonstitucijsko topilo. Natehtali smo potrebno količino amonijevega formiata in ga raztopili v 10 %-metanolu.
- **4 %-fosforna kislina v vodi:** v 100 mL-bučko smo odpipetirali 4,706 mL 85 %-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in z vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo uporabili pri pripravi vzorca pred ekstrakcijo na Oasis SPE, z namenom razbitja kompleksa haloperidola in ostalih analitov s plazemskimi proteini.
- **2 %-mravljična kislina v vodi - »wash1«:** v 50 mL-bučko smo odpipetirali 1 mL mravljične kisline in z vodo dopolnili do oznake. V kolikor smo raztopino pripravili dan pred ekstrakcijo, smo jo hranili v hladilniku pri 4 °C v bučki, ki smo jo zaščitili s parafilmom.
- **5 %-amonijak v vodi - wash1:** v 100 mL-bučko smo odpipetirali 20 ml 25 %-amonijaka in z vodo dopolnili do oznake.
- **5 %-amonijak v acetonitrilu in metanolu (60:40 = V/V) – elute 2:** v 10-mL-bučko odpipetiramo 2 mL 25 %-amonijaka, 4,8 mL acetonitrila in 3,2 mL metanola. Če smo topilo pripravili dan prej, smo ga hranili v hladilniku pri 4 °C v bučki, ki smo jo zaščitili s parafilmom, da smo preprečili izgubo hlapnih topil.
- **5 %-mravljična kislina:** v 100 mL-bučko smo odpipetirali 5 mL mravljične kisline in z vodo dopolnili do oznake. Uporabili smo jo za nevtralizacijo vzorcev, ki smo jih pridobili po ekstrakciji na Oasis SPE.
- **25 mM raztopina UDPGA – raztopina A:** 25 mg UDPGA smo v originalnem vsebniku dodali 1,548 mL vode in premešali z vibracijskim mešalnikom.

- **Raztopina B:** za pripravo 20 mL raztopine smo zatehtali 0,605 g Tris-HCl, 0,16264 g MgCl<sub>2</sub> heksahidrata, 500 µL alameticina s koncentracijo 5 mg/mL, da smo dobili 250 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub> in alameticin s koncentracijo 125 mg/L. pH smo uravnali na 7,4 s pomočjo 1 mM HCl.
- **Substrat - 4 g/L haloperidol v metanolu:** v mikrocentrifugirko smo zatehtali 4,174 mg haloperidola in mu dodali 1044 µL metanola.
- **10 %-acetonitril v vodi:** v 5 mL-bučko smo odpipetirali 500 µL ACN in z vodo dopolnili do oznake. Pripravljeno raztopino smo uporabili kot rekonstitucijsko topilo za glukuronid haloperidola.
- **0,15 M acetatni pufer z ionsko močjo 0,061 M in s pH 4,5:** pufer smo pripravili v 100 mL-bučki v katero smo odpipetirali 0,857 mL ocetne kisline in z vodo dopolnili do oznake. pH smo uravnali z 1 mM NaOH na 4,5.
- **1 M natrijev hidroksid:** zatehtali smo 272,3 mg trdnega natrijevega hidroksida, ki smo ga raztopili v 592 µL vode. Dobili smo 11,5 M NaOH, ki smo ga nato razredčili z 6,808 mL vode, da smo dobili 1 M NaOH.

### 3.1.5 Naprave in pribor

Hladilnik 4 °C (LTH, Škofija Loka, Slovenija)

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

Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C)

Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Tehnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R

Stresalnik Vortemp 56 (Tehnica®, Železniki, Slovenija)

Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)

TurboVap 96 (Zymark, Hopkinton, MA, ZDA)

Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)

Mešalnik Vibromix 114EV (Tehnica, Železniki, Slovenija)

Mešalnik LabDancer (IKA, Staufen, Nemčija)

Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskara, Kranj, Slovenija)

Polavtomatske pipete 2-20 µL, 20-200 µL in 200-1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

SPE aparatura: Vakumska črpalka DOA-P504-BN (Gast, Michigan, ZDA)

SPE kolone: HybridSPE (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); MCX, WAX, MAX, WCX (*Oasis 2 x 4 Method development*, Waters corporation, Milford, MA, ZDA)

HPLC-UV kolone: Zorbax Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm 5µm delci (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Programska oprema MassHunter (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Zaščitna predkolona za HPLC in MS:

- Phenomenex 4x2mm C18 (Phenomenex, Kalifornija, ZDA)

MS kolone:

- Kinetex 50x2,1mm C18 2,6 µm delci (Phenomenex, Kalifornija, ZDA)
- Kinetex 100x3mm C18 (Phenomenex, Kalifornija, ZDA)

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viale, inserti za vijale, presesalna buča, lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje, Parafilm® M.

HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

UHPLC–MS/MS: UHPLC Agilent 1290 (Agilent Techologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA) sklopljen z vakuumskim »degaserjem«, binarno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom, termostatom in 6460 trojim kvadrupolnim masnim spektrometrom (Agilent Techologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava osnovnih raztopin, topil in mobilnih faz

**3.2.1.1 Haloperidol glukuronid:** biosinteza: v mikrocentrifugirko smo odpipetirali 25 µL mikrosomov, jim dodali 238 µL raztopine B in kratko premešali z vibracijskim mešalnikom ter postavili na led. Po 15 min smo zmesi dodali 841 µL substrata. Reakcijo smo predinkubirali 10 min pri 37 °C v termostatiranem stresalniku in 65 obratih / min. Reakcijo smo začeli z dodatkom 96 µL raztopine A. Celoten volumen reakcije je bil 1200 µL. Reakcija je potekala 48 ur pod istimi pogoji. Sledilo je čiščenje nastalega glukuronida in določanje koncentracije. Slednjo smo določili s pomočjo HPLC–UV preko umeritvene

krivulje za haloperidol ob predpostavki, da imata oba analita isti kromofor in s tem isti molarni ekstinkcijski koeficient.

**3.2.1.2 Primarno osnovno raztopino (PS)** s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili v 2 mL-mikrocentrifugirkah. V mikrocentrifugirke smo zatehtali približno 1 mg učinkovine, ki smo jo raztoplili v metanolu tako, da smo dobili želeno koncentracijo.

**3.2.1.3 Sekundarno osnovno raztopino (SS)** s koncentracijo 10 mg/L smo pripravili preko dveh redčenj. Odpipetirali smo 20 µL primarne osnovne raztopine, jo razredčili s 10 %-metanolom v vodi (v nadaljevanju topilo) do 1000 µL in tako dobili raztopino s koncentracijo 20 mg/L. Slednjo raztopino smo razredčili v razmerju 1 : 1 s topilom in tako dobili želeno koncentracijo sekundarne osnovne raztopine.

**3.2.1.4 Sekundarno osnovno raztopino mešanice vseh analitov (SSmix)** s koncentracijo 10 mg/L smo pripravili po naslednjem postopku: odpipetirali smo 20 µL primarne osnovne raztopine vsakega od analitov in s topilom dopolnili do 2 mL.

**3.2.1.5 Delovno raztopino internega standarda 1 (WS<sub>IS1</sub>) - raloksifena** smo pripravili s koncentracijo 560 µg/L. Za 25 mL slednje raztopine smo v 25 mL-bučko odpipetirali 700 µL SS<sub>IS1</sub> in s topilom dopolnili do oznake. Pri postopku priprave vzorca pride do sedemkratnega redčenja in dobimo plazemska koncentracijo internega standarda 1, ki znaša 80 µg/L.

**3.2.1.6 Delovno raztopino internega standarda 2 (WS<sub>IS2</sub>) – s C13 označen haloperidol** smo pripravili s koncentracijo 70 µg/L. Za 25 mL raztopine IS2 smo v 25 mL-bučko odpipetirali 175 µL SS<sub>IS2</sub> in s 4 %-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dopolnili do oznake. Plazemska koncentracija IS2 znaša 10 µg/L, ker pri postopku priprave vzorca WS<sub>IS2</sub> sedemkrat redčimo.

### **3.2.1.7 Delovne raztopine (WS)**

Delovne raztopine smo pripravili z namenom priprave umeritvene krivulje za haloperidol in ostale analite. Koncentracije delovnih raztopin so predstavljale dvajsetkrat višje koncentracije od želenih plazemskih koncentracij. Pripravili smo jih v 2,0 mL-mikrocentrifugirkah, kamor smo odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine in s topilom dopolnili do 1000 µL. Izjemoma smo pripravili 2,0 mL WS, če smo pripravljeno WS potrebovali za pripravo WS z nižjimi koncentracijami. Le-te so v tabeli označene z

zvezdico (\*). S tem smo se izognili pipetiranju volumnov manjših od 20 µL in si tako zagotovil bolj natančno pipetiranje. Primer priprave WS je prikazana v preglednici II.

Preglednica II. Izračun potrebnih raztopin za pripravo delovnih raztopin z želenimi koncentracijami. Z zvezdico (\*) so označene koncentracije delovnih raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo WS z nižjimi koncentracijami, da smo si zagotovili bolj natančno pipetiranje.

c (plazma) hal [µg/l]	c (plazma) hal-g [µg/l]	c (WS) [µg/L]	V (hal-g) [µL]	V (SS <sub>mix</sub> ) [µL]	V (WS <sub>400*</sub> ) [µL]	V (WS <sub>800*</sub> ) [µL]	V (WS <sub>200*</sub> ) [µL]	V (topila) [µL]
0	0	0	/	/	/	/	/	1000
0,2	0,1	4	/	/	/	/	20	980
0,4	0,2	8	/	/	20	/	/	980
0,8	0,4	16	/	/	40	/	/	960
1	0,5	20	/	/	50	/	/	950
2	1	40	/	/	100	/	/	900
4	2	80	/	/	200	/	/	800
6	3	120	/	/	/	150	/	850
10	5	200*	/	/	500	/	/	500
14	7	280	/	/	/	350	/	650
20	10	400*	222	40	/	/	/	1738
30	15	600	167	30	/	/	/	803
40	20	800*	444	80	/	/	/	1476
50	25	1000	278	50	/	/	/	672
100	/	2000	/	100	/	/	/	900

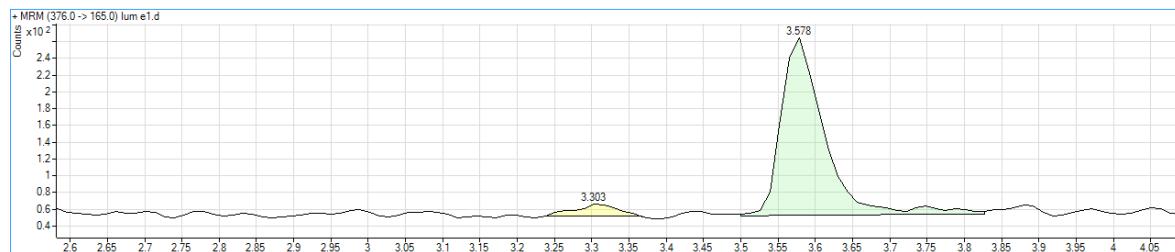
### 3.2.1.8 Obogateni vodni vzorci

Pripravili smo želen koncentracijski razpon obogatenih vodnih vzorcev. V 1,5 mL-mikrocentrifugirke smo odpipetirali 950 µL vode in mu dodali 50 µL WS ter premešali z vibracijskim mešalnikom, da smo zagotovili enakomerno koncentracijo obogatenih vzorcev. Pripravili smo tudi paralelo v vialah (steklo).

### 3.2.1.9 Obogateni plazemski vzorci

V ustrezno označene 1,5 mL-mikrocentrifugirke smo najprej odpipetirali 950 µL plazme in ji nato dodali 50 µL WS, potrebne za pripravo želene plazemske koncentracije. Obogateno plazmo smo nato 60 s mešali z vibracijskim mešalnikom in s tem zagotovili porazdelitev haloperidola in metabolitov po celotnem volumnu plazme. Na slikah 3 – 14 so prikazani

MRM kromatogrami praznih vzorcev, obogatenih vzorcev na limiti kvantifikacije in realnih vzorcev za haloperidol, metabolit 2, haloperidol glukuronid in metabolit 1.



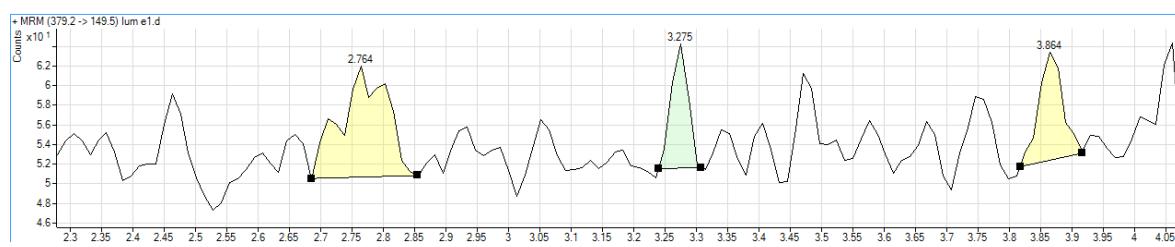
Slika 3. MRM kromatogram praznega vzorca za haloperidol; masni prehod  $[m/z]$ :  $376 \rightarrow 165$ . Z zeleno so označeni integrirani vrhovi, ki ustrezajo referenčnemu retencijskemu času analita. Z rumeno pa so označeni vrhovi, ki so značilno nad bazno linijo, vendar ne ustreza referenčnemu retencijskemu času analita. Ista barvna karakterizacija vrhov velja tudi pri slikah 4-14.



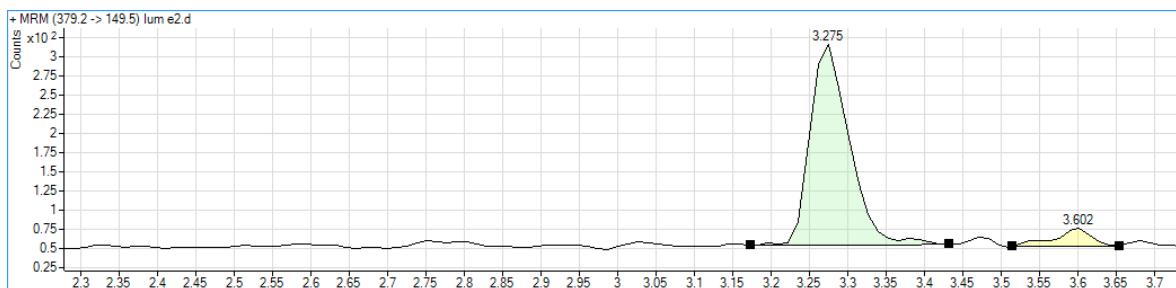
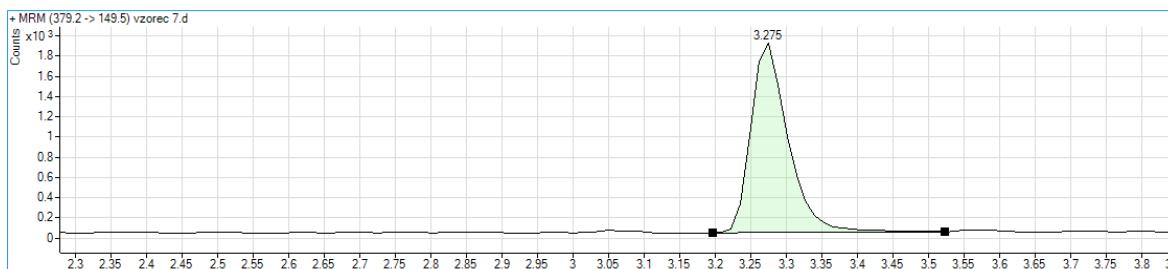
Slika 4. MRM kromatogram haloperidola na limiti kvantifikacije ( $c = 0,1 \mu\text{g}/\text{L}$ )



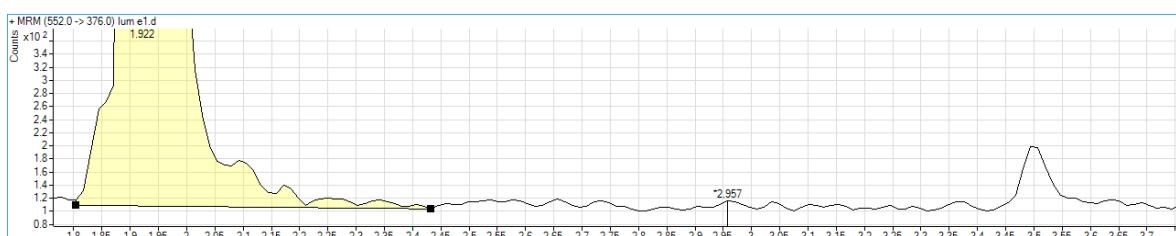
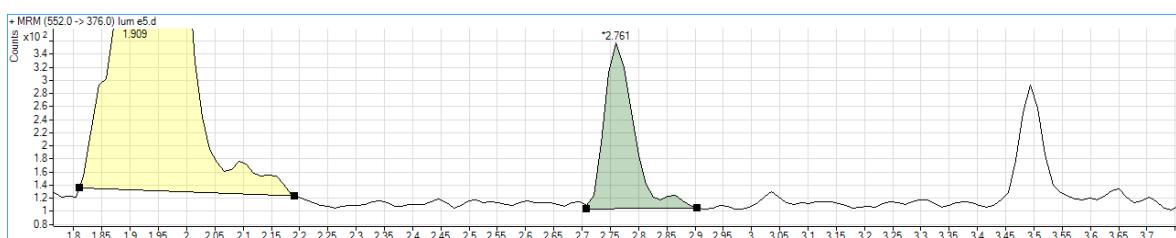
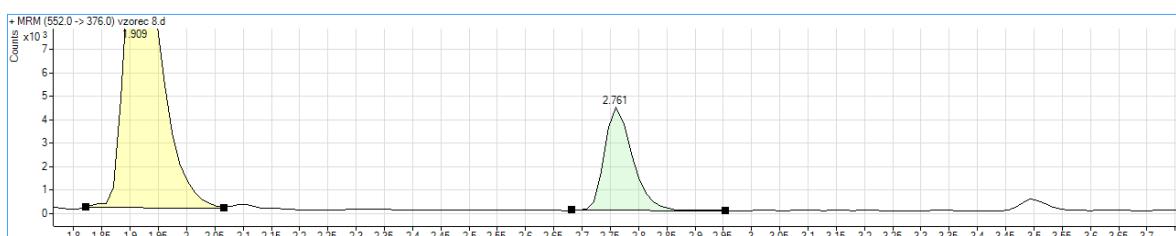
Slika 5. MRM kromatogram realnega vzorca za haloperidol (vzorec št. 8)



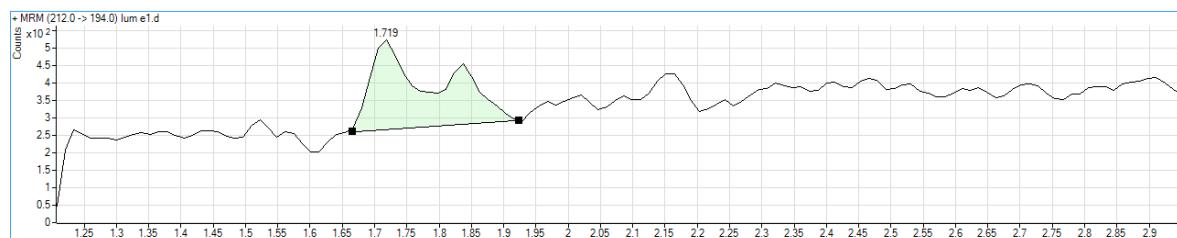
Slika 6. MRM kromatogram praznega vzorca za metabolit 2; masni prehodi  $[m/z]$ :  $379,17 \rightarrow 149,50$

Slika 7. MRM kromatogram na limiti kvantifikacije za M2 ( $c = 0,1 \mu\text{g}/\text{L}$ )

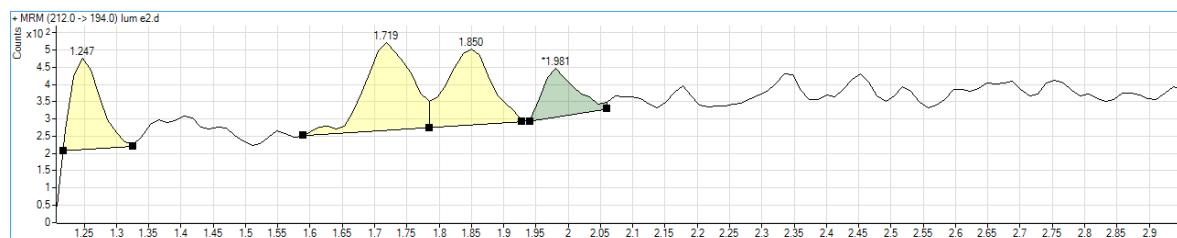
Slika 8. MRM kromatogram realnega vzorca za M2 (vzorec št. 7)

Slika 9. MRM kromatogram praznega vzorca za haloperidol glukuronid; masni prehod  $[m/z]: 552 \rightarrow 165$ Slika 10. MRM kromatogram na limiti kvantifikacije za hal-g ( $c = 0,5 \mu\text{g}/\text{L}$ )

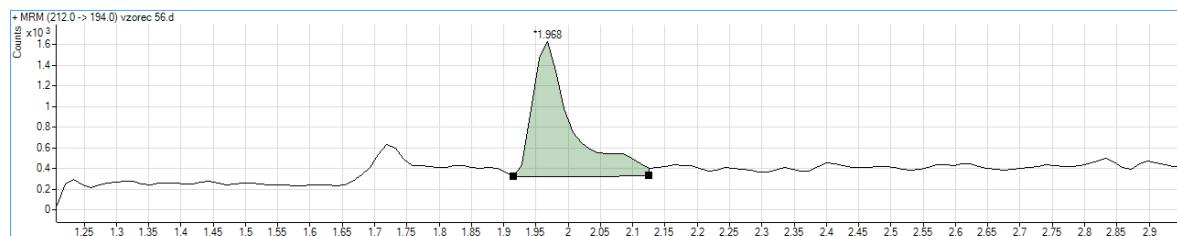
Slika 11. MRM kromatogram realnega vzorca za hal-g (vzorec št. 8)



Slika 12. MRM kromatogram praznega vzorca za metabolit 1; masni prehod  $[m/z]$ :  $212 \rightarrow 194$



Slika 13. MRM kromatogram na limiti kvantifikacije za M1 ( $c = 0,1 \mu\text{g}/\text{L}$ )



Slika 14. MRM kromatogram realnega vzorca za M1 (vzorec št. 56)

**3.2.1.10 Raztopina za poznejše obogatenje:** Za izračun učinka matrice in izkoristka smo pri razvoju ekstrakcije na Oasis SPE potrebovali raztopino za poznejše obogatenje. Z namenom primerjave odzivov smo jih pripravili v dvakrat višji koncentracij, kot so bile koncentracije obogatenih plazem, ki smo jih ekstrahirali, kajti pri pripravi vzorca je prišlo do dvakratnega redčenja.

### 3.2.2 Razvoj tekočinske kromatografije sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (UHPLC–MS/MS)

#### 3.2.2.1 Izbera kolone

Preizkusili smo dve koloni z obrnjeno fazo:

- Kinetex 50x2,1mm C18 2,6 µm delci
- Kinetex 100x2mm C18

Preučevali smo vpliv posamezne MS kolone na ločitev kromatografskih vrhov analitov, njihovo resolucijo ter čas (trajanje) analize.

#### 3.2.2.2 Izbera mobilne faze

Preizkusili smo tri različne mobilne faze:

- 0,1 %-mravljična kislino
- 0,01 %-mravljična kislina
- 2 mM amonijev acetat

in dva različna organska modifikatorja: acetonitril in metanol.

#### 3.2.2.3 Tipi meritev masnega spektrometra

S pomočjo krmilnega programa »Optimizer« ter programske opreme MassHunter smo pridobili optimalne masne prehode in retencijske čase za haloperidol in metabolite ter optimizirali posamezne parametre masnega spektrometra. Za kvantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov smo uporabili multirezidualno metodo (MRM).

#### 3.2.2.4 Optimizacija parametrov masnega spektrometra

Optimizacijo parametrov masnega spektrometra za posamezne metabolite smo izvajali na predkoloni s pomočjo standardnih raztopin metabolitov s koncentracijo 5 mg/L in volumnom injiciranja 1 µL. Optimizirali smo parametre ionskega izvora (ESI) v podanih obsegih:

- način ionizacije: ESI+ / ESI-
- temperatura sušilnega plina: od 240 °C do 275 °C
- temperatura plašča: od 280 °C do 320 °C

- napetost na kapilari: od 3000 do 4000 V
- napetost na šobi (angl. nozzle voltage): od 1000 do 2000 V

ter parametre trojnega kvadrupola:

- fragmentor (FR): od 100 do 180 V
- kolizijska energija (CE): od 1 do 8 eV
- čas zadrževanja na eni masi (angl.: dwell time): od 80 ms/ion do 200 ms/ion
- polarnost: pozitivna / negativna

Vse naštete parametre smo lahko določili brez HPLC kolone.

### **3.2.2.5 Flexible cube**

je posebna komponenta LC-MS/MS-a, s katero smo zmanjšali navzkrižni prenos med vzorci.

### **3.2.3 Razvoj ekstrakcije**

Analizo vzorcev smo izvajali na LC-MS/MS, katerega odziv je lahko zelo odvisen od prisotnosti nečistot in vpliva matrice. Zato je stopnja priprave vzorcev še posebej pomembna. Plazemske vzorce smo z namenom očiščenja preiskovanih analitov od nečistot oz. komponent, ki so prisotne v plazmi, ekstrahirali na različne načine. Preizkusili smo obarjanje proteinov s pomočjo organskega topila, ekstrakcijo na različnih trdnih nosilcih (SPE) ter kombinacijo obojega.

#### **3.2.3.1 Obarjanje proteinov z organskim topilom**

Odločili smo se za razmerje 1:4 (V/V), v korist organskega topila. Za organsko topilo smo izbrali acetonitril.

Postopek: Najprej smo v 1,5 mL-mikrocentrifugirke odpipetirali 400 µL hladnega ACN. Zaprete mikrocentrifugirke smo postavili na ledeno kopel. Hladnemu ACN smo nato dodali 100 µL kalibracijskega / realnega vzorca. Vse skupaj smo mešali z vibracijskim mešalnikom 60 s in čez noč dali v zamrzovalnik pri -20 °C. Naslednji dan smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 min pri 4 °C na 15.000 × g. Supernatant smo previdno odpipetirali na mikrotitrsko ploščico in ga analizirali na LC-MS/MS.

### **3.2.3.2 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)**

SPE predstavlja postopek podoben kromatografiji z obrnjeno fazo, kjer izkoristimo večjo afiniteto analitov v vzorcu do adsorbenta, kot jo imajo nečistote v vzorcu. S spiranjem odplaknemo nečistote v odpad, v naslednji stopnji pa analite izperemo z močnejšim topilom ter jih uporabimo za nadaljnjo kromatografsko analizo. Adsorbente razdelimo glede na interakcije med analiti in adsorbentom. Poznamo: normalno-fazne, z obrnjeno fazo, ionsko-izmenjevalne (kationske in anionske) ter mešane oz. kombinirane.

#### **3.2.3.2.1 Hibridna ekstrakcija na trdnem nosilcu – Hybrid SPE**

Kolona oz. kartuša predstavlja filter, ki zadrži oborjene proteine na podlagi fizične pregrade. Fosfolipidi in drugi lipidi, prisotni v plazmi, pa se odstranijo iz plazemskega vzorca na podlagi visoko selektivnih Lewisovih kislinsko-baznih interakcij med cirkonijevimi ioni, ki so prisotni v koloni, in fosfatno skupino fosfolipidov. Med celotnim postopkom ekstrakcije ostaja kolona neselektivna za vezavo bazičnih, kislih ali neutralnih spojin.

Postopek:

- 1) *Obarjanje proteinov z organskim topilom v razmerju 1:3 (V/V) v korist organskega topila:*

V 1,5 mL-mikrocentrifugirke smo odpipetirali 300 µL vzorca, ki smo mu dodali 900 µL 1 % formične kisline v acetonitrilu, mešali z vibracijskim mešalnikom 60 sekund in čez noč postavili v zamrzovalnik na -20 °C, da je poteklo izobarjanje do konca. Mikrocentrifugirke smo nato centrifugirali na 15.000 x g in 4 °C 10 min.

- 2) *Ekstrakcija na trdnem nosilcu:*

Supernatant smo previdno prenesli na mikrotitrsko ploščico Hybrid SPE. S pomočjo podtlaka (med -10 in -15 Hg), ki smo ga dosegli s pomočjo oljne črpalke povezane z aparaturo za SPE, je supernatant prešel hibridne kolone, kjer so se odstranili proteini in fosfolipidi. Eluat z našimi analiti pa se je zbral v spodnji mikrotitrski ploščici.

### 3) Sušenje in rekonstitucija:

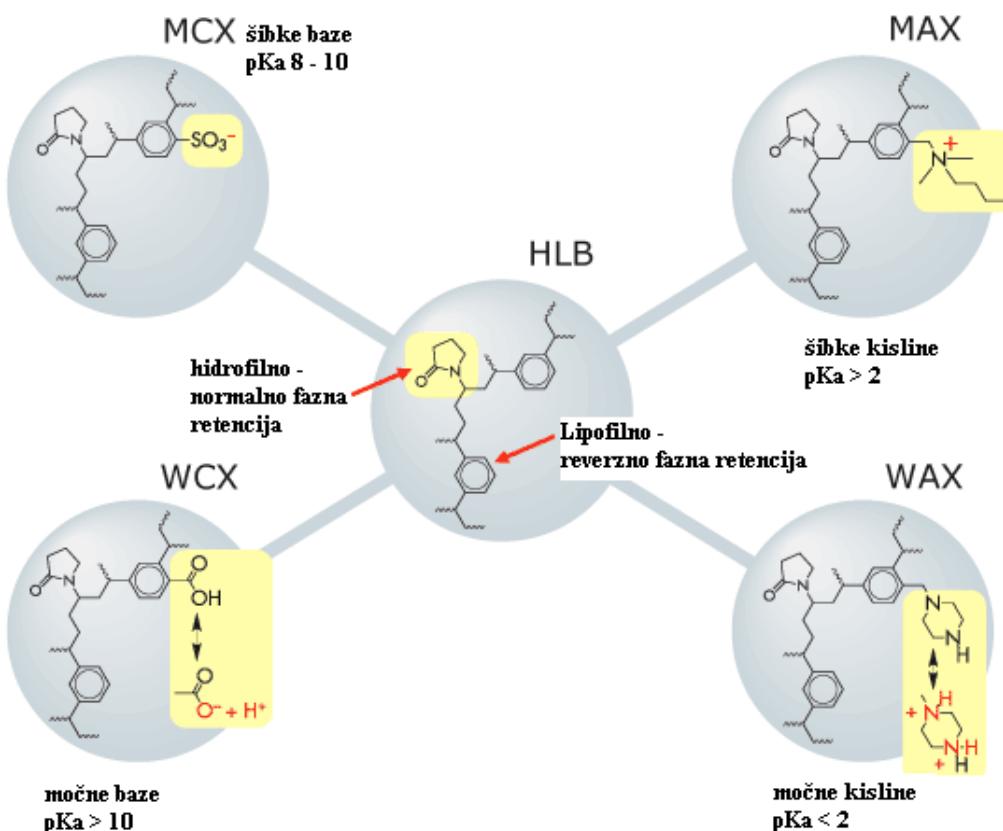
Preizkusili smo dva možna načina:

- a) Iz mikrotitrsko ploščice smo odpipetirali ves supernatant in ga prenesli v 1,5 mL-mikrocentrifugirke. Vsebino smo nato sušili z N<sub>2</sub> na TurboVap®-u pri 60 °C in tlaku 2-3 psi (14 – 21 kPa). Vsebino smo rekonstituirali z 150 µL 4,5 mM amonijevega formiata v 10 %-metanolu in mešali z vibracijskim mešalnikom 60 s. Mikrocentrifugirke smo dali na centrifugo za 5 minut pri 15.000 × g in 4 °C. Nato smo vsebino previdno prenesli v mikrotitrsko ploščico za analizo z LC-MS/MS.
- b) Elucijsko topilo smo iz vzorcev odstranili s prepohovanjem z dušikom v napravi TurboVap 96, kar v primarni mikrotitrski ploščici. Vsebino smo rekonstituirali s 150 µL 4,5 mM amonijevega formiata v 10 %-metanolu in za 20 min dali na stresalnik pri 24 °C in 128 obratih na minuto. Nato smo z vibracijskim mešalnikom mešali 2 min in postavili za 1 min na ultrazvok. V zadnjem koraku, pred analizo na LC-MS/MS, pa smo mikrotitrsko ploščico centrifugirali 60 min pri 4 °C in 1500 × g.

#### 3.2.3.2.2 Ionsko-izmenjevalna ekstrakcija na trdnem nosilcu

Ionsko-izmenjevalna ekstrakcija temelji predvsem na ionskih interakcijah med analiti in adsorbentom. Ker pa so ionske izmenjevalne skupine pogosto vezane na hidrofobno ogrodje, poteka ločitev analitov na podlagi kombinacije ionskih in reverznofaznih interakcij (slika 15).

Preizkusili smo različne ionsko-izmenjevalne kolone: MCX, WAX, MAX, WCX (preglednica III). V prvi stopnji smo želeli ugotoviti, katera izmed kolon je najprimernejša za hkratno ekstrakcijo vseh analitov. Za ionsko-izmenjevalne kolone MCX smo se odločili, ker spadajo med novejše različice SPE, s katerimi dosežemo večjo občutljivost in večji izkoristek, zmanjšamo učinek matrice in nam omogočajo visoko selektivnost. Prav večja občutljivost in zmanjšan učinek matrice igrata pomembno vlogo pri našem postopku.



Slika 15. Primeri različnih ionsko-izmenjevalnih adsorbentov, vezanih na hidro-lipofilno ogrodje, ki se uporabljajo pri SPE. Iz slike lahko razberemo kateri adsorbent je, glede na njegove lastnosti, najprimernejši za ločitev analitov ter na podlagi katerih interakcij poteče ločitev (52).

Postopek:

1. *Predpriprava vzorca:* vzorec smo redčili s 4 %-fosforno kislino v razmerju 1 : 1 (V/V). V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  vzorca, mu dodali 100  $\mu\text{L}$  4 %-fosforne kisline in 20 s mešali z vibracijskim mešalnikom.
2. *Kondicioniranje kolone:*
  - 1) 200  $\mu\text{L}$  metanola
  - 2) 200  $\mu\text{L}$  vode

Kondicioniranje je potekalo pri podtlaku 5 mm Hg.

3. *Nanos vzorca:* na kolono smo nanesli 180  $\mu\text{L}$  obogatene plazme. Začeli smo pri podtlaku 3 mm Hg in postopoma povečevali do 7 mm Hg. Pazili smo, da prehod vzorca ni bil hitrejši od 1 kapljice / sekundo.
4. *Spiranje 1:* 200  $\mu\text{L}$  predpisanega pufra (odvisno od kolone)
5. *Elucija 1:* dvakrat po 25  $\mu\text{L}$  100 %-metanola. Elucijo smo zbirali v elucijsko ploščico 1.

6. *Elucija 2:* dvakrat po 25 µL določenega elucijskega topila (odvisno od kolone)

Obe eluciji sta potekali pri podtlaku do 10 mm Hg.

7. *Redčenje eluata:* eluat obogatene plazme smo redčili s 50 µL vode, stresali 5 min pri sobni temperaturi in 128 obratih / minuto na stresalniku Vortemp 56.

Preglednica III. Postopek ekstrakcije na različnih ionsko-izmenjevalnih kolonah na trdnem nosilcu. Po vsakem koraku smo uporabili podtlak, ki je omogočil prehod topila skozi kolone – začeli smo pri podtlaku 3 mm Hg in postopoma povečevali do 7 mm Hg.

	MCX – šibke baze	WAX – močne kisline	MAX – šibke kisline	WCX – močne baze
Priprava vzorca	1 : 1 s 4 %-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>			
Kondicioniranje	1) 200 µL MeOH 2) 200 µL H <sub>2</sub> O			
Nanos vzorca	180 µL pri podtlaku 3-7 mm Hg, max hitrost prehoda: 1 kapljica / s			
Spiranje 1	200 µL 2 %-HCOOH	200 µL 5 %-NH <sub>3</sub>		
Elucija 1 v elucijsko ploščico 1	2 x 25 µL 100 % MeOH			
Elucija 2 v elucijsko ploščico 2	2 x 25 µL 5 %-NH <sub>3</sub> v ACN : MeOH = 60 : 40 (V/V)	2 x 25 µL 2 %-HCOOH v ACN : MeOH = 60 : 40 (V/V)		

### 3.2.3.4 Optimizacija ekstrakcije na koloni MCX

- Nanos vzorca: dvakrat po 100 µL
- Sprememba elucije 1 v spiranje 2: preizkusili smo različne volumne metanola (50 µL, 100 µL in 200 µL) – s povečanjem volumna metanola smo elucijo (ki je z metanolom odstranila vse, kar se je vezalo po reverznofaznem mehanizmu) spremenili v spiranje, s katerim smo odstranili endogene fosfolipide.

Končni postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) s kolono MCX:

- 1) *Predpriprava vzorca:* v 1,5 mL-mikrocentrifugirko smo odpipetirali 125 µL 4 %-fosforne kisline, 25 µL IS2 in 150 µL vzorca. Z vibracijskim mešalnikom smo mešali 20 s.
- 2) *Kondicioniranje kolone:*
  - 1) 200 µL metanola
  - 2) 200 µL vode
- 3) *Nanos vzorca:* 2 x 100 µL plazme
- 4) *Spiranje 1:* 200 µL 2 %-mravljične kisline
- 5) *Spiranje 2:* 200 µL 100 %-metanola
- 6) *Elucija 2:* 2 x 25 µL 5 %-amonijaka v acetonitrilu in metanolu (60 : 40 = V/V )
- 7) *Redčenje eluata:* eluatu smo v mikrotitrsko ploščico dodali 50 µL vode, stresali 5 min pri sobni temperaturi in 128 obratih / minuto na stresalniku Vortemp 56.
- 8) *Analiza z UHPLC–MS/MS.*

### 3.2.4 Validacija metode

Metodo smo validirali po smernicah za validacijo bioanalitičnih metod, ki jih je za industrijo predpisala ameriške agencija za hrano in zdravila (FDA) (53).

#### 3.2.4.1 Linearnost

Linearnost je lastnost metode, da znotraj določenega intervala (območja) daje odzive, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami prenosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost opredelimo s pomočjo statistične obdelave odzivov standardnih vzorcev, in sicer z metodo linearne regresije določimo umeritveno premico z enačbo  $y = kx + n$ , pri čemer je  $y$  odziv (površina kromatografskega vrha analita ali razmerje površine kromatografskega vrha analita in IS),  $x$  koncentracija analita v vzorcu,  $k$  naklon premice in  $n$  odsek na ordinati. Umeritvena premica predstavlja statistični model celotne metode, ki opisuje odnos med koncentracijo in odzivom. Korelacijo med koncentracijo v vzorcu in odzivom ovrednotimo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom ( $r$ ) oz. determinacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Če je razmah med koncentracijo najvišjega in najnižjega kalibracijskega standarda zelo velik, npr. 1:500 in več, običajno uporabimo uteženo linearno regresijo (npr.  $1/c$  ali  $1/c^2$ ). Naklon in odsek utežene umeritvene premice smo izračunali s pomočjo reševalca v programu Excel, ki je s

spreminjanjem naklona in odseka izbral tiste vrednosti, kjer je vsota produkta odstopa in uteži za vse koncentracije najmanjša. Odstop predstavlja razliko med dejanskim odzivom analita oz. njegovega razmerja z IS (y) in izračunano vrednostjo odziva oz. njegovega razmerja z IS s parametri utežene premice ( $k_2$ ,  $n_2$ ). Izračunamo ga po *enačbi 1*.

$$odstop = y - (k_2 * x + n_2) \quad (\text{enačba 1})$$

Za določanje umeritvene premice in linearnosti se priporoča uporaba vsaj šestih standardnih vzorcev in slepi vzorec. Vsaj 75 % standardov (vsaj štiri od šestih), vključno s standardom pri spodnji limiti kvantifikacije (LLOQ) in pri najvišji koncentraciji, mora po izračunu njihove koncentracije iz umeritvene premice odstopati manj kot 15 % od njihove nominalne koncentracije oz. manj kot 20 % pri LLOQ. V nasprotnem primeru metoda ne ustreza smernicam FDA glede linearnosti v danem območju (53).

### **3.2.4.2 Točnost**

Točnost analizne metode izraža ujemanje vrednosti s sprejeto pravo (referenčno) vrednostjo. Točnost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). Iz odziva vsakega QC vzorca s pomočjo umeritvene premice izračunamo njegovo koncentracijo (z in brez upoštevanja IS). Nato izračunamo povprečno koncentracijo petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ter jo primerjamo z dejansko (referenčno), kot je prikazano v *enačbi 2*. Povprečna vrednost sme odstopati manj kot 15 % od dejanske vrednosti oz. manj kot 20 % pri LLOQ (53).

$$Odstopanje [\%] = \frac{\bar{c}(\text{izračunana}) - c(\text{referenčna})}{c(\text{referenčna})} \times 100 \quad (\text{enačba 2})$$

### **3.2.4.3 Ponovljivost**

Ponovljivost je natančnost znotraj postopka. Natančnost analizne metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Običajno jo izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variance (CV) oz. relativni standardni odklon (RSD). Ponovljivost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). CV petih ponovitev pri

posamezni koncentraciji QC ne sme biti večji od 15 % oz. 20 % pri LLOQ. Navadno določamo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. (53).

#### **3.2.4.4 Uporabno območje metode**

Uporabno območje analizne metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, ponovljivost in linearost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti (53).

#### **3.2.4.5 Meja kvantifikacije**

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z metodo še lahko kvantitativno ovrednotimo z ustrezeno točnostjo in natančnostjo. Po smernicah FDA je to najnižja točka (standard) na umeritveni premici, ki ustreza naslednjim zahtevam:

- Odziv standarda pri LLOQ je vsaj 5-krat višji od odziva pri analizi slepega vzorca
- Odziv standarda pri LLOQ mora ustrezati že prej omenjenim pogojem glede točnosti in ponovljivosti (točnost med 80 in 120 %,  $CV \leq 20\%$ ) (53).

#### **3.2.4.6 Selektivnost / specifičnost**

Selektivnost analizne metode je njena sposobnost, da nedvoumno določi analit ob prisotnosti drugih komponent, za katere domnevamo, da so prisotne v vzorcu (komponente matrice, metaboliti, ostale učinkovine, ki jih jemlje bolnik...). Pri metodah, sklopljenih z masnim spektrometrom, je potrebno raziskati vpliv matrice ter dokazati, da slednji ne vpliva na točnost, ponovljivost in občutljivost metode (53). Zavedati se moramo, da je učinek matrice prisoten, kljub temu da v slepem vzorcu ni prisotnih nobenih vidnih kromatografskih vrhov (54). Komponente iz matrice, ki vstopijo v masni spektrometer sočasno z analitom, lahko motijo proces njegove ionizacije (55) in s tem povzročijo zmanjšanje ali povečanje ionizacije (56-58).

Učinek matrice lahko preprosto zmanjšamo že z manjšim volumnom injiciranja ali z redčenjem vzorca, vendar le v primerih, ko ostane občutljivost metode zadostna (59). Drugi način zmanjšanja ali odprave učinka matrice je optimizacija priprave vzorca in / ali kromatografskih parametrov (56, 57, 60). Učinek matrice lahko zmanjšamo tudi z uporabo

internega standarda (IS), s katerim kompenziramo spremembe v odzivih, ter mnogimi drugimi. Matuszewski in sodelavci so v svojem članku opisali strategije za ocenitev učinka matrice v kvantitativnih bioanaliznih metodah, ki temeljijo na HPLC–MS/MS in podali strokovne smernice za njihovo validacijo (61).

- ***Absolutni učinek matrice:***

Absolutni učinek matrice smo določili na podlagi primerjave odziva ekstrahirane slepe plazme, ki ji je bila dodana raztopina za naknadno obogatitev, z odzivom analitov v naknadno obogatenem topilu. Izmerili smo odziv analitov v vsakemu od uporabljenih elucijskih topil in po *enabči 3* izračunali absolutni učinek matrice (52, 61).

Preglednica IV. Postopek priprave vzorcev za določanje absolutnega učinka matrice za vse preiskovane ionskoizmenjevalne kolone.

	MCX	WAX	MAX	WCX
Elucijska ploščica 1	50 µL MeOH + 50 µL raztopine za naknadno obogatitev			
Elucijska ploščica 2	50 µL 5 %-NH <sub>3</sub> v ACN : MeOH = 60 : 40 (V/V) + 50 µL raztopine za naknadno obogatitev	50 µL 2 %-HCOOH v ACN : MeOH = 60 : 40 (V/V) + 50 µL raztopine za naknadno obogatitev		

Enačba za izračun učinka matrice (52):

$$\% Me = - \left( 1 - \left( \frac{\text{odziv (naknadno obogatena ekstrahirana slepa plazma)}}{\text{odziv (naknadno obogateno topilo)}} \right) \right) * 100 \quad (\text{enačba 3})$$

- ***Relativni učinek matrice***

Relativni učinek matrice se nanaša na primerjavo vpliva matrice v različnih plazmah – plazmah pridobljenih od različnih bolnikov. Odsotnost relativnega učinka matrice smo dokazali s primerjavo naklonov umeritvenih premic v petih različnih plazmah pridobljenih od zdravih prostovoljcev. Nakloni umeritvenih premic ne smejo odstopati za več kot 4-5 % (61). Zmanjšanje učinka matrice smo dosegli že s samo ekstrakcijo vzorca ter z uporabo izotopno označenega internega standarda.

### **3.2.4.7 Izkoristek ekstrakcije**

Izkoristek ekstrakcije za posamezen analit smo določili iz razmerja odziva ekstrahirane obogatene plazme z odzivom ekstrahirane slepe plazme, ki ji je bila po ekstrakciji dodana raztopina za poznejše obogatenje. Ekstrahiran plazemski vzorec smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.1.9. Uspešnost ekstrakcije smo izračunali po *enačbi 4*.

Enačba za izračun izkoristka ekstrakcije (52):

$$\% Re = \frac{Odziv (ekstrahirana obogatena plazma)}{Odziv (naknadno obogatena ekstrahirana slepa plazma)} * 100 \quad (\text{enačba 4})$$

### **3.2.4.8 Stabilnost**

- ***Stabilnost pri sobni temperaturi***

Določili smo stabilnost osnovnih in delovnih raztopin ter obogatenih plazemskih raztopin pri sobni temperaturi, ter stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev, razredčenih s 4 %-fosforno kislino v razmerju 1 : 1 (V/V). Vzorce smo analizirali v času 0 in po 6 h. Ves ta čas so bili vzorci hranjeni pri sobni temperaturi. 6 h zajema maksimalen čas, v katerem se je opravila celotna analiza.

- ***Stabilnost med zamrzovanjem in odtajevanjem***

Določili smo stabilnost vseh analitov v osnovnih in delovnih raztopinah ter v obogatenih plazemskih raztopinah med procesi zamrzovanja in odtajanja. Vzorce (dve različni koncentraciji, nižji in višji nivo) smo podvrgli trem ciklom zamrzovanja in odtajanja: zamrznili smo jih za najmanj 6 h, jih pustili na sobni temperaturi, da so se sami odtalili in jih ponovno zamrznili. Vzorce smo v treh paralelah analizirali v času 0 in po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja.

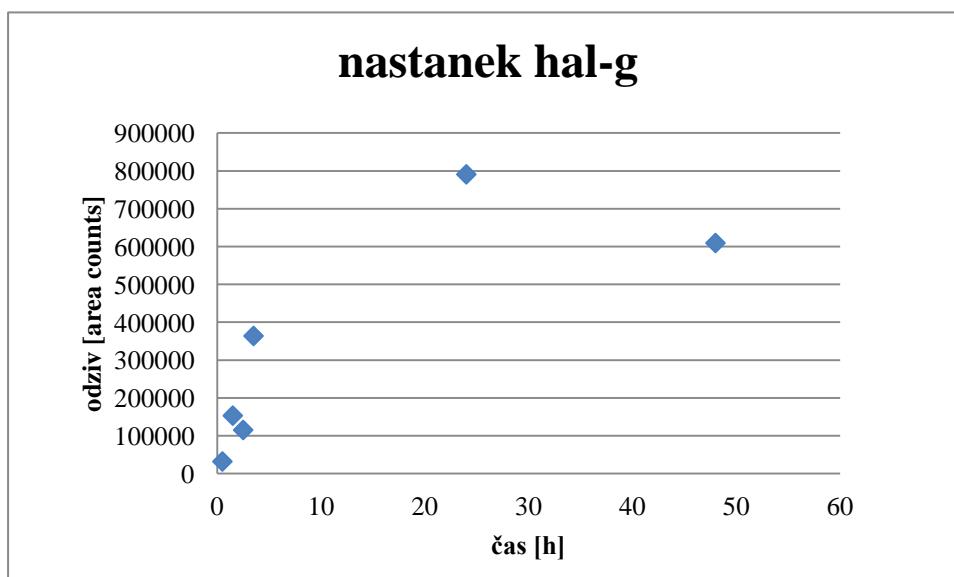
- ***Postpreparativna stabilnost***

Določili smo stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku (postpreparativna stabilnost). Vzorce (dve različni koncentraciji, ki ustreza QC1 in QCm) smo v petih paralelah analizirali v času 0 in po 24 urah. Ves ta čas so bili vzorci v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Opazovali smo spremembo odziva posameznih analitov.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Biosinteza haloperidol glukuronida

Za razvoj analitike najpomembnejših metabolitov haloperidola potrebujemo njihove avtentične analitske standarde. Standardi metabolitov M1, M2 in M3 so bili komercialno dostopni, haloperidol glukuronid pa žal ne. Zato smo ga poskusili sami sintetizirati s pomočjo človeških jetrnih mikrosomov. Reakcijsko zmes smo inkubirali 48 ur. Na sliki 16 lahko vidimo, kako se s časom spreminjajo odzivi haloperidol glukuronida na masnem spektrometu. Zaradi relativno dragih človeških jetrnih mikrosomov in ostalih reagentov je bil izkupiček haloperidol-glukuronida premajhen, da bi ga lahko po čiščenju točno natehtali, zato smo bili primorani ugotoviti njegovo koncentracijo v raztopini.

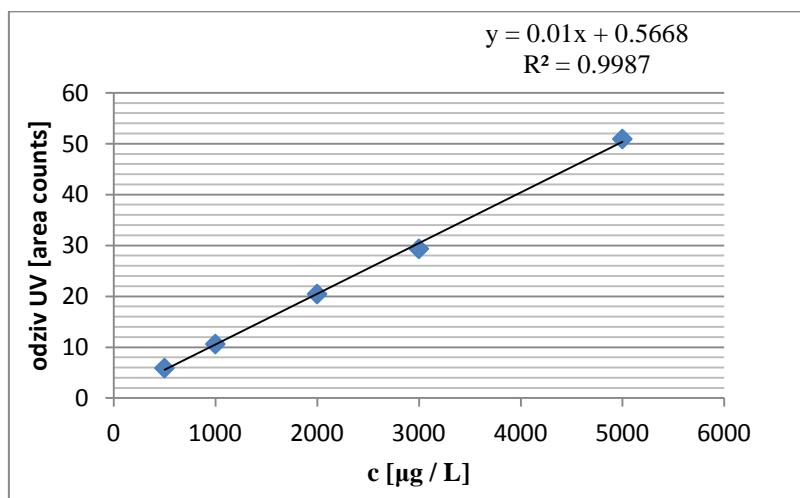


Slika 16. Časovno spremljanje nastanka haloperidol glukuronida; area counts – površina pod kromatografskim vrhom

Koncentracijo nastalega haloperidol glukuronida smo poskušali določiti tako, da bi ga cepili do aglikona (haloperidola), tega pa potem določili prek umeritvene premice za sam haloperidol. Tovrstni pristopi so bili opisani v literaturi (62) in uspešno uporabljeni tudi v našem laboratoriju (63, 64):

- Inkubacija z  $\beta$ -glukuronidazami (rekombinantna iz *E. coli* in izolirana iz govejih jeter)
- Kisla in bazična hidroliza (s 6 M NaOH in 6 M HCl)

Žal nobena od navedenih reakcij hidrolize ni bila uspešna na haloperidolovem glukuronidu. Ustreznost reakcijskih pogojev smo preverili z dvema drugima glukuronidoma (metabolitoma raloksifena), ki sta se pri navedenih pogojih kvantitativno cepila. Neuspešnost hidrolize haloperidolovega glukuronida pripisujemo večji stabilnosti estrske  $\beta$ -glukuronidne vezi v primerjavi z drugimi glukuronidi. Oda in sodelavci stabilnost te estrske vezi pripisujejo steričnim oviram, saj jo obkrožajo trije obroči, kar  $\beta$ -glukuronidazi onemogoča dostop (21). Zato nam ni preostalo drugega, kot da smo koncentracijo haloperidol glukuronida določili prek umeritvene premice za sam haloperidol, ki smo jo naredili na HPLC-UV. Pri tem smo se opirali na predpostavko, da je molarni ekstinkcijski koeficient za obe spojini enak, saj haloperidol in njegov glukuronid vsebuje isto kromoforno skupino, ki absorbira v UV območju: glukuronska kislina namreč pri 254 nm ne absorbira. Na sliki 17 je predstavljena umeritvena premica, ki predstavlja površino pod kromatografskim vrhom v odvisnosti od koncentracije na HPLC-UV za haloperidol, preko katere smo določili koncentracijo glukuronida v standardni raztopini. Ločitev je potekala na koloni Zorbax Eclipse XBD-C8 150 x 4,6 mm z 5- $\mu\text{m}$  delci, pri pretoku 2 mL/min, mobilni fazi 0,1 %-mravljična kislina in tlaku 152 bar. Volumen injiciranja je bil 20  $\mu\text{L}$ . Odziv, ki smo ga dobili na UV detektorju za glukuronid v standardni raztopini, je bil 18,5 – iz česar prek umeritvene premice in z upoštevanjem razlik v molekulski masi izračunamo koncentracijo 1801  $\mu\text{g/L}$ .



Slika 17. Umeritvena premica za haloperidol na HPLC z UV detektorjem

#### **4.2 Razvoj tekočinske kromatografije sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (LC–MS/MS)**

Razvoj LC–MS/MS smo začeli na predkoloni, s pomočjo programa Optimizer ter programske opreme MassHunter. Optimizirali smo posamezne parametre masnega spektrometra. Za najboljšo mobilno fazo se je izkazala 0,01 %-mravljijačna kislina in acetonitril kot organski modifikator. Začetni volumen injiciranja je bil 1 µL zmesi vseh analitov s koncentracijo 100 µg/L. Ločitev analitov smo nadaljevali na koloni Kinetex 50x2,1 mm C18. Določili smo masne prehode in retencijske čase haloperidola in njegovih metabolitov (preglednica V).

Preglednica V. Masni prehodi multirezidualne metode vzorčenja (MRM) in retencijski časi (RT) posameznih analitov, na koloni Kinetex 50x2,1mm C18

Analit	MRM prehod [ $m/z$ ]	RT [min]
HALOPERIDOL	376,0 → 165,0	1,560
METABOLIT 1	212,0 → 194,0	0,873
METABOLIT 2	378,0 → 167,0 379,17 → 149,5	1,472
METABOLIT 3	195,0 → 151,1 150,9 → 150,9	1,342
HALOPERIDOL GLUKURONID	552,0 → 165,0 552,0 → 376,0	1,128

*Optimiziranje metabolita 3:*

S spremenjanjem parametrov smo odziv metabolita 3 na LC - MS/MS-u povečali iz 94.000 [area counts] na 286.000. Končni parametri so predstavljeni v preglednici VI.

Preglednica VI. Optimizacija parametrov na LC–MS/MS za metabolit 3

Parameter	začetna vrednost	optimalna vrednost
prekurzorski ion	195,0 $m/z$	195,0 $m/z$
hčerinski ion	195,0 $m/z$	150,9 $m/z$
kolizijska energija	5 eV	3 eV
fragmentor	135 V	135 V
mobilna faza	0,1 % -mravljična kislina	0,01 % -mravljična kislina
temperatura plina	275 °C	240 °C
temperatura plina v plašču	320 °C	280 °C
napetost na kapilari	4000 V	3500 V
napetost na šobi	2000 V	2000 V

*Optimiziranje metabolita 1:* v preglednici VII so predstavljeni le spremenjeni parametri, ostali so isti kot pri M3.

Preglednica VII. Optimizacija parametrov na LC–MS/MS za metabolit 1

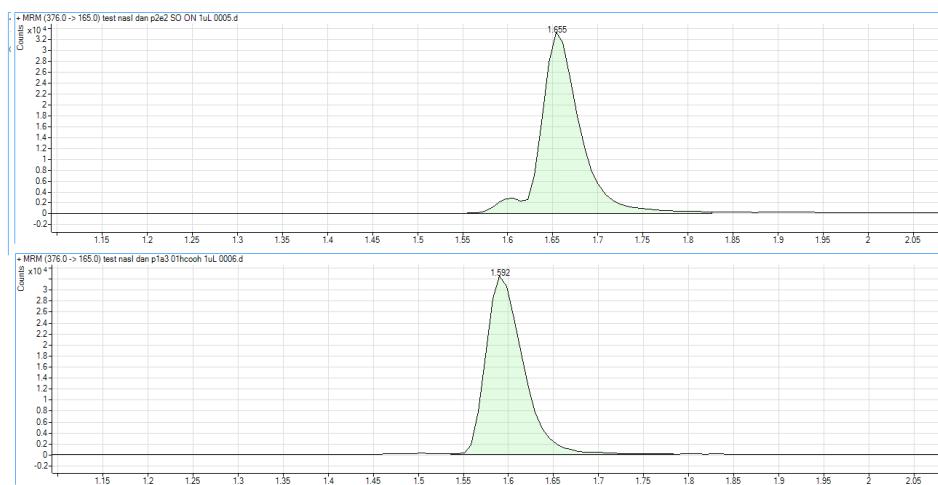
Parameter	začetni	optimalen
prekurzorski ion	212 $m/z$	212 $m/z$
hčerinski ion	194 $m/z$	194 $m/z$
kolizijska energija	5 eV	5 eV
fragmentor	135 V	100 V
čas zadrževanja na eni masi	80 ms	80 ms
način ionizacije ESI	negativen	pozitiven

*Optimizacijo kromatografske ločitve haloperidola in reduciranega haloperidola (metabolita 2) smo izvedli z optimizacijo gradiента, saj sta se kromatografska vrhova zaradi velike podobnosti obeh analitov prekrivala. Končna metoda gradientnega izpiranja za Kinetex 50x2,1mm C18 je prikazana v preglednici VIII.*

Preglednica VIII. Program gradientnega izpiranja na koloni Kinetex 50x2,1mm C18 z organskim modifikatorjem acetonitrilom (B)

t [min]	B %	pretok (mL/min)
0,00	10	0,5
0,50	20	0,5
1,00	37	0,5
1,25	39	0,5
1,85	41	0,5
2,20	55	0,5
2,25	10	0,5

Vse zgoraj naštete parametre smo določili na kromatografski koloni Kinetex 50x2,1mm C18 z 2,6 µm-delci. Zaradi spremembe pH vzorca eluata (močno bazičen) pri ionsko-izmenjevalni ekstrakciji MCX se je pojavil pri odzivu haloperidola dodaten kromatografski vrh, ki je izginil ob spremembji mobilne faze na 0,1 %-mravljično kislino. S povečanjem kislosti MF smo namreč povečali njeno pufrno kapaciteto in s tem preprečili cepljenje kromatografskega vrha, ki je predstavljal neprotonirano obliko haloperidola (slika 18). Z namenom izboljšanja resolucije med haloperidolom in metabolitom 2 smo uporabili daljšo kolono – Kinetex 100x3mm C18. Čas analize enega vzorca se je tako podaljšal iz 2,7 na 6,50 minute, vendar so se pri tem tudi pomembno izboljšali odzivi na detektorju. Novi retencijski časi analitov so prikazani v preglednici X. Kljub podaljšanemu času analize enega vzorca je čas še vedno krajši v primerjavi s časi analiz dosedanjih metod, ki je v povprečju nad 18 min (46, 48, 49). Končna metoda, ki smo jo uporabili na kromatografski koloni Kinetex 100x3mm C18, je prikazana v preglednici IX.



Slika 18. Odzivi haloperidola na masnem spektrometru; zgornji kromatografski vrh je posnet v mobilni fazi 0,01 %-mravljična kislina, drugi kromatografski vrh pa v mobilni fazi z večjo pufrno kapaciteto - 0,1 %-mravljična kislina

Preglednica IX. Program gradientnega izpiranja na koloni Kinetex 100x3mm C18 z organskim modifikatorjem acetonitrilom (B), MF = 0,1 %-mravljična kislina

t [min]	B %	Pretok(mL/min)
0,0	10,0	0,80
0,5	10,0	0,65
0,6	20,0	0,60
0,8	21,8	0,50
2,5	37,0	0,50
3,0	39,0	0,50
3,7	40,1	0,50
3,8	10,0	0,50
3,9	10,0	0,50
4,0	10,0	0,80
4,3	10,0	0,80

Preglednica X. Retencijski časi analitov na koloni z obrnjeno fazo Kinetex 100x3mm C18

Analit	RT [min]
Hal	3,582
M1	1,957
M2	3,273
Hal-g	2,759
IS2	3,579

## 4.3 Razvoj ekstrakcije

### 4.3.1 Obarjanje proteinov z organskim topilom

Obarjanje proteinov z acetonitrilom je predstavljal naš prvi izbor ekstrakcije, s katerim smo naredili prvo umeritveno premico za haloperidol in njegove metabolite. Na podlagi podatkov iz literature in predhodne diplomske naloge in terapevtskega območja haloperidola smo se odločili za koncentracijsko območje od 1 – 300 µg/L (3, 41, 48-50).

Z uteženo ( $1/c^2$ ) linearno regresijo smo za umeritveno premico haloperidola dobili ustreznoučnost za celotno koncentracijsko območje (odstopanje manjše od  $\pm 4\%$ ). Odzivi metabolitov pa so bili prešibki in linearnost slaba, da bi na podlagi pridobljenih umeritvenih premic z gotovostjo določili koncentracije želenih analitov. Limita kvantifikacije, ki smo jo pri tem dosegli, je bila 1 µg/L za haloperidol in metabolit 2. Limita kvantifikacije za ostale metabolite ter koeficient korelacije ( $r^2$ ) umeritvenih premic za preiskovane analite so prikazani v preglednici XI. Rezultati so bili boljši, kot so jih dobili Arinobu in sodelavci z isto metodo ekstrakcije. Nižjo limito kvantifikacije, ki smo jo dobili za vse analite, lahko pripisemo boljšemu detekcijskemu sistemu, ki smo ga uporabili v primerjavi z Arinobujevo ekipo, ki je uporabila UV detekcijo (48).

Preglednica XI. Limita kvantifikacije za posamezne analite, pri obarjanju proteinov z organskim topilom

analit	LLOQ	$r^2$
hal	1 µg/L	0,9986
M2	1 µg/L	0,9981
M1	2 µg/L	0,9997
M3	50 µg/L	0,9667

Koncentracije analitov v realnem vzorcu smo izračunali na podlagi umeritvene premice, ki smo jo dobili z linearno regresijo in utežili s kvadratom koncentracije. Umeritvena premica za haloperidol je: odziv [area counts] =  $1111 \times c$  [µg/L] – 55,545. Po analizi realnega vzorca (rezultati so predstavljeni v preglednici XII) smo se odločili, da razpon umeritvene premice spremenimo na **0,5 – 50 µg/L**. Ker v realnem vzorcu nismo zaznali M3, smo se odločili, da njegovo kvantifikacijo opustimo. K odločitvi so pripomogla tudi dejstva, da M3 klinično nima bistvenega pomena in da je po kemijski strukturi kislina in se zato po

lastnostih bistveno razlikuje od ostalih analitov. Optimizacijo metode smo nadaljevali brez kvantifikacije M3.

Preglednica XII. Izračunane koncentracije haloperidola in metabolitov iz realnega vzorca, na podlagi utežene umeritvene premice (ekstrakcija: obarjanje proteinov z organskim topilom)

bolnik št. 44	odziv [area counts]	izračunana c [ $\mu\text{g/L}$ ]
hal	1530	1,43
M1	50	/
M2	236	0,18
M3	39	/

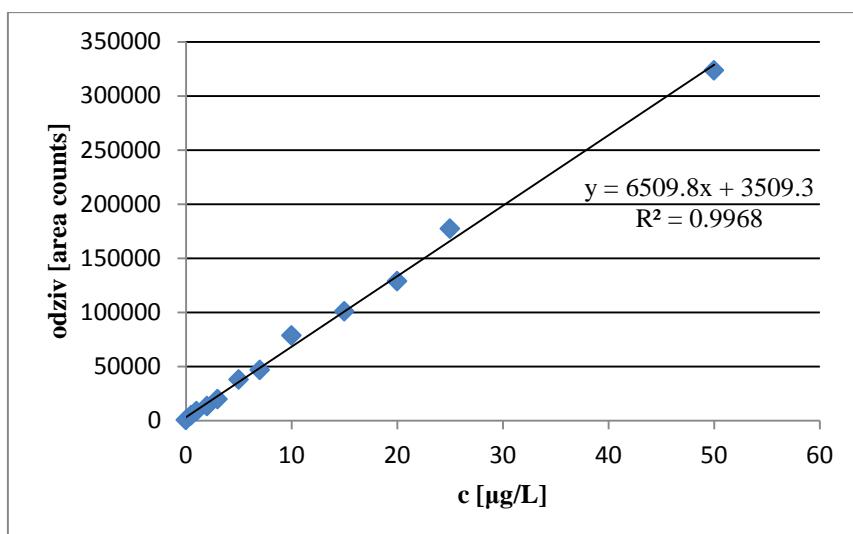
#### 4.3.2 Hibridna ekstrakcija na trdnem nosilcu– Hybrid SPE

Z ekstrakcijo na hibridni SPE smo se znebili več motečih elementov iz matrice. Saj smo poleg obarjanja proteinov z organskim topilom izvedli čiščenje vzorca še na hibridnih kolonah. Tako smo uspeli znižati limito kvantifikacije pri vseh analitih. Spodne meje detekcije za posamezne analite so predstavljene v preglednici XIII.

Preglednica XIII. Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) za posamezen analit pri ekstrakciji s HybridSPE

analit	LLOQ
hal	0,5 $\mu\text{g/L}$
M2	0,5 $\mu\text{g/L}$
M1	0,5 $\mu\text{g/L}$
M3	5 $\mu\text{g/L}$

Zadovoljiva je bila tudi linearost uteženih umeritvenih premic in njihova točnost. Na sliki 19 je prikazana ne-utežena umeritvena preica za haloperidol iz plazme B.



Slika 19. Umeritvena premica za haloperidol v plazmi B po ekstrakciji na HybridSPE

Poskusili smo ovreči tudi relativni efekt matrice s primerjavo naklonov umeritvenih premic v različnih plazmah po strokovno priznanih smernicah Matuszewskega (61). Vendar so se nakloni v različnih plazmah razlikovali za več kot 5 % (meja sprejemljivosti je 4-5 %): CV naklonov za haloperidol je znašal 6 % za metabolit 2 pa 9 % (preglednica XIV). Priznati pa je treba, da pri razvoju te ekstrakcije še nismo imeli na voljo izotopno označenega haloperidola, ki bi učinek matrice zagotovo močno zmanjšal.

Preglednica XIV. Koeficienti variacije (CV) naklonov uteženih umeritvenih premic za posamezen analit v različnih plazmah, po ekstrakciji na HybridSPE

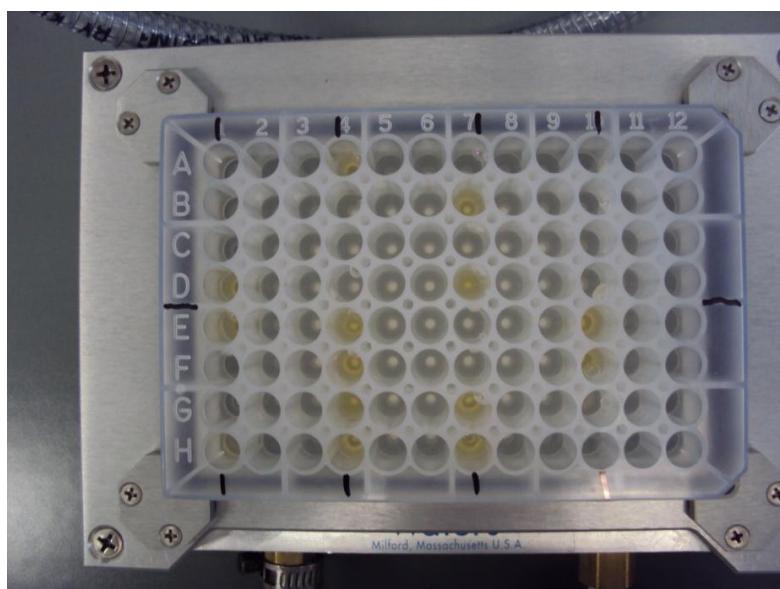
analit	CV naklonov [%]
hal	6,1
M2	8,9
M1	3,7

Največja pomankljivost metode je bila, da so kolone HybridSPE zadržale glukuronide, kar nam je onemogočalo njihovo kvantitativno določitev. Tako smo pri analizi realnega vzorca izmerili nepričakovano nizke koncentracije haloperidol glukuronida v primerjavi z metodo obarjanja proteinov. Ugotovili smo, da je moralno priti do nenadejane izgube glukuronida pri procesu čiščenja vzorca s hibridno SPE; adsorbent pri hibridni SPE bi moral selektivno zadržati le fosfolipide, ne pa majhnih hidrofilnih molekul, kot so glukuronidi. Da je hibridna SPE neprepustna za glukuronide, piše tudi Silvestro s sodelavci v svojem nedavno objavljenem članku, kjer opisuje razvoj metode za kvantifikacijo klopidogrela in raznih

glukuronidiranih metabolitov (65). Zaradi očitne izgube relativno zelo pomembnega metabolita glukuronida haloperidola smo ta postopek priprave vzorcev opustili, čeprav so bili začetni rezultati vzpodbudni.

#### **4.3.3 Ionsko-izmenjevalna ekstrakcija na trdnem nosilcu**

Izmed ionsko-izmenjevalnih kolon, ki smo jih imeli na razpolago: MCX, WAX, MAX in WCX, se je za najboljšo izkazala kolona MCX. Pri slednji smo dobili najvišje odzive analitov in najboljši izkoristek ekstrakcije ter najnižji učinek matice. Eksperimentalni del na ionsko-izmenjevalnih SPE kolonah je prikazan na sliki 20.

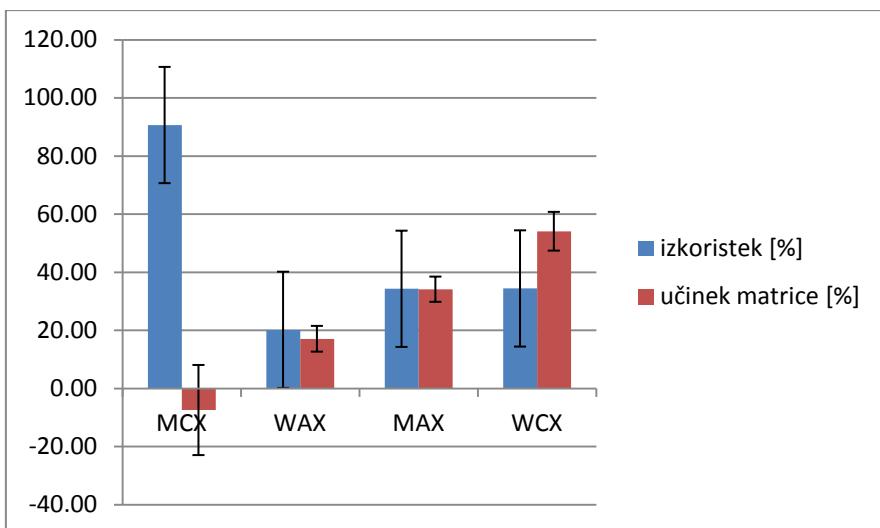


Slika 20. Ionsko-izmenjevalne kolone tipa MCX, WAX, MAX in WCX. Eksperimentalni del določanja izkoristka in učinka matice na vseh ionsko-izmenjevalnih SPE kolonah.

V preglednici XV in sliki 21 vidimo, kakšen je izkoristek ekstrakcije in učinek matice pri haloperidolu pri ekstrakcijah na različnih ionsko-izmenjevalnih kolonah (MCX, WAX, MAX, WCX).

Preglednica XV. Izkoristki ekstrakcije in absolutni učinek matrice za haloperidol pri različnih SPE kolonah

elucijska plošča 2				
	MCX	WAX	MAX	WCX
Izkoristek [%]	91± 16	20 ± 19	30 ± 28	34 ± 15
Učinek matrice [%]	-7 ± 16	17 ± 4	34 ± 4	54 ± 7



Slika 21. Spreminjanje izkoristka ekstrakcije in učinka matrice za haloperidol pri različnih ionsko-izmenjevalnih kolonah, elucijska plošča 2. Predstavljena je tudi relativna standardna napaka.

Odzivi haloperidola po ekstrakciji na MCX pri plazemski koncentraciji 10 µg/L so prikazani v preglednici XVI.

Preglednica XVI. Odzivi haloperidola pri plazemski koncentraciji 10 µg/L

MCX – odzivi [area counts]			
ponovitev	predhodno obogaten vzorec	samo v topilu	naknadno obogaten vzorec
1	128998	153433	136910
2	120327	141011	130885
3	104254	131423	120379
4	108086	124121	121054
povprečje	115416	137497	127307

Ker so bili odzivi vseh analitov pri 10 µg/L dovolj visoki, pri tej metodi namreč vzorcev nismo efektivno nič redčili, hkrati pa so bili izkoristki ekstrakcije za najpomembnejše analite nad 90 %, smo se odločili, da bo ionsko-izmenjevalna ekstrakcija na trdnem nosilcu na koloni MCX ekstrakcija izbora za validacijo metode za kvantitativno določanje haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi. V preglednici XVII so prikazani odzivi na LC–MS/MS za vse analite pri koncentraciji 10 µg/L (predhodno obogateni vzorci) po ionsko-izmenjevalni ekstrakciji ter izkoristki ekstrakcije izbora za validacijo naše metode.

Preglednica XVII. Odzivi predhodno obogatenih vzorcev analitov po ionsko-izmenjevalni ekstrakciji na kolonah MCX pri koncentraciji 10 µg/L, in izkoristki kationsko-izmenjevalne ekstrakcije

	odziv predhodno obogatenega vzorca [area counts]	izkoristek [%]
hal	115416	90,7
M1	45466	67,0
M2	88874	95,8
hal-g	2406	90,7

#### 4.4 Validacija metode

Validirali smo analizno metodo za kvantitativno določanje haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi s kationsko-izmenjevalno ekstrakcijo na trdnem nosilcu in detekcijo na UHPLC–MS/MS.

##### 4.4.1 Linearnost

###### Haloperidol

Za določitev linearnosti metode smo izmerili površino pod kromatografskimi vrhovi pri različnih koncentracijah z in brez upoštevanja internega standarda 2 (izotopno označen haloperidol). Preglednica XVIII prikazuje odzive haloperidola [area counts] v obogatenih plazemskih vzorcih, z in brez upoštevanja IS2.

Preglednica XVIII. Odzivi haloperidola v obogatenih plazemskih vzorcih, z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol) po ekstrakciji na kolonah MCX

koncentracija [ $\mu\text{g/L}$ ]	odziv [area counts]	odziv / IS2
0	735	7,043E-03
0,1	2279	2,137E-02
0,2	3708	3,647E-02
0,4	6009	6,568E-02
1	16279	1,540E-01
2	31626	3,015E-01
10	162083	1,491E+00
20	332086	2,962E+00
50	772473	7,291E+00

Na podlagi odzivov iz preglednice XVIII smo izračunali naklon (k), odsek (n) in Pearsonov koeficient korelacije ( $r^2$ ). Umeritveno premico smo tudi utežili z utežjo  $1/c^2$  in s tem dosegli boljšo točnost nižjih koncentracij. Rezultati so prikazani v preglednici XIX.

Preglednica XIX. Nakloni, odseki in linearost umeritvenih premic za haloperidol z in brez IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol), ter utežene z utežjo  $1/c^2$

	brez IS2	z IS2	z IS2 utežena z $1/c^2$
k	15549,41	0,145871	<u>0,14747</u>
n	2865,766	0,013423	<u>0,006689</u>
$r^2$	0,99918	0,999963	1,000

Podčrtane vrednosti smo uporabili pri izračunu vrednosti analitov realnih vzorcev. Preglednica XX prikazuje izračunane vrednosti koncentracij haloperidola z uteženimi parametri umeritvene premice. Za utež smo vzeli  $1/c$  – utež 1 in  $1/c^2$  – utež 2. Točnost je bila pri vseh analitih najboljša z utežjo 2. Enačba utežene umeritvene premice za haloperidol je odziv [area counts] =  $0,14747 \times c$  [ $\mu\text{g/L}$ ] + 0,006689.

Preglednica XX. Točnost utežene umeritvene premice za haloperidol

c [µg/L]	odziv / IS2	utež 2	izračunana c - pri upoštevanju uteži 2 [µg/L]	točnost 2 [%]
0	7,043E-03	/	2,404E-03	/
0,1	2,137E-02	100	9,952E-02	-0,48
0,2	3,647E-02	25	2,019E-01	0,97
0,4	6,568E-02	6,25	4,000E-01	0,00
1	1,540E-01	1	9,988E-01	-0,12
2	3,015E-01	0,25	1,999E+00	-0,03
10	1,491E+00	0,01	1,007E+01	0,67
20	2,962E+00	0,0025	2,004E+01	0,19
50	7,291E+00	0,0004	4,940E+01	-1,21

## Metabolit 2

Preglednica XXI prikazuje odzive metabolita 2 (površina pod kromatografskim vrhom) v obogatenih plazemskih vzorcih z in brez upoštevanja IS2.

Preglednica XXI. Odzivi metabolita 2 v obogatenih plazemskih vzorcih z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol) po ekstrakciji na kolonah MCX

c [µg/L]	odziv met 2 [area counts]	odziv / IS2
0	34	3,260E-04
0,1	1133	1,062E-02
0,2	2155	2,119E-02
0,4	3999	4,370E-02
1	11720	1,109E-01
2	22950	2,188E-01
10	119798	1,102E+00
20	244403	2,180E+00
50	559438	5,280E+00

Na podlagi odzivov iz preglednice XXI smo izračunali naklon (k), odsek (n) in Pearsonov koeficient korelacije ( $r^2$ ). Umeritveno premico smo tudi utežili z utežjo  $1/c^2$ . Rezultati so prikazani v preglednici XXII.

Preglednica XXII. Nakloni, odseki in linearost umeritvenih premic za metabolit 2 z in brez IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol), ter utežene z utežjo  $1/c^2$

	brez IS2	z IS2	z IS2 utežena z $1/c^2$
k	11288,55	0,105894	<u>0,109066</u>
n	2308,736	0,011612	<u>-0,00031</u>
$r^2$	0,999344	0,999905	1,000

Podčrtane vrednosti smo uporabili pri izračunu vrednosti analitov realnih vzorcev.

Preglednica XXIII. Točnost utežene umeritvene premice za metabolit 2

c [µg/L]	odziv / IS2	utež 2	izračunana c – pri upoštevanju uteži 2 [µg/L]	točnost 2 [%]
0	3,260E-04	/	5,842E-03	/
0,1	1,062E-02	100	1,003E-01	0,27
0,2	2,119E-02	25	1,972E-01	-1,42
0,4	4,370E-02	6,25	4,036E-01	0,89
1	1,109E-01	1	1,019E+00	1,94
2	2,188E-01	0,25	2,009E+00	0,46
10	1,102E+00	0,01	1,011E+01	1,09
20	2,180E+00	0,0025	1,999E+01	-0,06
50	5,280E+00	0,0004	4,842E+01	-3,17

### Haloperidol glukuronid

Preglednica XXIV prikazuje odzive haloperidol glukuronida (površina pod kromatografskim vrhom) v obogatenih plazemskih vzorcih, z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol).

Preglednica XXIV. Odzivi haloperidol glukuronida v obogatenih plazemskih vzorcih z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol) po ekstrakciji na kolonah MCX

c [µg/L]	odziv [area counts]	odziv / IS2
0	41	3,897E-04
0,5	898	8,495E-03
1	1868	1,781E-02
5	8760	8,059E-02
10	22081	1,969E-01
25	49922	4,712E-01

Na podlagi odzivov iz preglednice XXIV smo izračunali naklon (k), odsek (n) in Pearsonov koeficient korelacije ( $r^2$ ). Umeritveno premico smo tudi utežili z utežjo  $1/c^2$ . Rezultati so prikazani v preglednici XXV.

Preglednica XXV. Prikazani so nakloni, odseki in linearost umeritvenih premic za haloperidol glukuronid z in brez IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol), ter utežene z utežjo  $1/c^2$

	brez IS2	z IS2	z IS2 utežena z $1/c^2$
k	2022,045	0,01903	<u>0,018872</u>
n	-101,293	-0,00294	<u>-0,00211</u>
$r^2$	0,996585	0,998402	1,000

Podčrtane vrednosti smo uporabili pri izračunu vrednosti analitov realnih vzorcev.

Preglednica XXVI. Prikazana je točnost utežene umeritvene premice za haloperidol glukuronid

c [µg/L]	odziv / IS2	utež 2	izračunana c – pri upoštevanju uteži 2 [µg/L]	točnost 2 [%]
0	3,897E-04	/	1,323E-01	/
0,5	8,495E-03	4	5,618E-01	12,36
1	1,781E-02	1	1,056E+00	5,55
5	8,059E-02	0,04	4,382E+00	-12,35
10	1,969E-01	0,01	1,055E+01	5,47
25	4,712E-01	0,0016	2,508E+01	0,32

## Metabolit 1

Preglednica XXVII prikazuje odzive metabolita 1 (površina pod kromatografskim vrhom) v obogatenih plazemskih vzorcih, z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol).

Preglednica XXVII. Odzivi metabolita 1 v obogatenih plazemskih vzorcih z in brez upoštevanja IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol) po ekstrakciji na kolonah MCX

c [µg/L]	odziv M1 [area counts]	odziv / IS2
0	118	1,127E-03
0,1	605	5,676E-03
0,2	747	7,346E-03
0,4	1010	1,104E-02
1	2391	2,261E-02
2	3749	3,574E-02
10	19887	1,830E-01

Na podlagi odzivov iz preglednice XXVII smo izračunali naklon (k), odsek (n) in Pearsonov koeficient korelacije ( $r^2$ ). Umeritveno premico smo tudi utežili z utežjo  $1/c^2$ .

Rezultati so prikazani v preglednici XXVIII.

Preglednica XXVIII. Prikazani so nakloni, odseki in linearnost umeritvenih premic za metabolit 1 z in brez IS2, ter utežene z utežjo  $1/c^2$

	brez IS2	z IS2	z IS2 utežena z $1/c^2$
k	2550,285	0,017968	<u>0,017504</u>
n	1455,253	0,002908	<u>0,003919</u>
$r^2$	0,949704	0,999269	1,000

Podčrtane vrednosti smo uporabili pri izračunu vrednosti analitov realnih vzorcev.

Preglednica XXIX. Prikazana je točnost utežene umeritvene premice za metabolit 1

c [µg/L]	odziv / IS2	utež 2	izračunana c – pri upoštevanju uteži 2 [µg/L]	točnost 2 [%]
0	1,127E-03	/	-1,595E-01	/
0,1	5,676E-03	100	1,004E-01	0,38
0,2	7,346E-03	25	1,958E-01	-2,12
0,4	1,104E-02	6,25	4,069E-01	1,74
1	2,261E-02	1	1,068E+00	6,81
2	3,574E-02	0,25	1,818E+00	-9,10
10	1,830E-01	0,01	1,023E+01	2,29

Metoda je bila linear na območju 0,1 – 50 µg/L za haloperidol in metabolit 2. Metoda torej pokriva oz. se celo krepko razteza čez meje celotnega terapevtskega območja za haloperidol, ki je pri zdravljenju bolnikov z akutno shizofrenijo od 5,6 – 16,9 µg/L (66), pri bolnikih s kronično shizofrenijo pa je v območju od 17 – 42 µg/L (9). Za metabolit 1 je metoda linear na območju 0,1 – 10 µg/L. Kljub ožjemu območju linearnosti je metoda zadovoljiva, saj pri nobenem od realnih vzorcev vrednosti metabolita 1 niso presegle zgornje meje linearnosti. Pri najbolj zastopanem metabolitu haloperidola – haloperidol glukuronidu je bila kalibracijska premica pripravljena le v območju 0,5 – 25 µg/L zaradi majhne količine standarda glukuronida, ki smo ga imeli na razpolago.

#### 4.4.2 Točnost

##### Haloperidol

Točnost analitov smo določali z analizo kontrolnih vzorcev. Iz povprečja petih meritev kontrolnih vzorcev smo izračunali koncentracijo preko utežene umeritvene premice (glej poglavje 4.4.1). Podan je procent odstopanja povprečne vrednosti vsakega QC-ja glede na pravo vrednost. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXX.

Preglednica XXX. Točnost podana kot odstopanje [%] izračunane povprečne vrednosti koncentracije haloperidola kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. QC 1 - kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji, QC m - kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji in QC h - kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji;

ponovitve		QC 1 (0,3034 µg/L)	QC m (3,034 µg/L)	QC h (15,17 µg/L)
1.	Odziv / IS <sub>2</sub>	5,074E-02	4,229E-01	2,454E+00
2.		5,255E-02	4,152E-01	2,437E+00
3.		4,845E-02	4,392E-01	2,492E+00
4.		4,758E-02	4,235E-01	2,445E+00
5.		4,994E-02	4,171E-01	2,274E+00
povprečje		4,985E-02	4,236E-01	2,421E+00
izračunana c [µg/L]		0,293	2,827	16,37
odstopanje [%]		<b>-3,53</b>	<b>-6,83</b>	<b>7,90</b>

## Metabolit 2

Preglednica XXXI. Točnost podana kot odstopanje [%] izračunane povprečne vrednosti koncentracije metabolita 2 kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. QC 1 - kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji, QC m - kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji in QC h - kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji;

ponovitve		QC 1 (0,60 µg/L)	QC m (6,00 µg/L)	QC h (30,00 µg/L)
1.	Odziv / IS <sub>2</sub>	6,177E-02	5,995E-01	2,821E+00
2.		6,394E-02	6,136E-01	2,847E+00
3.		6,542E-02	6,160E-01	2,900E+00
4.		6,323E-02	5,830E-01	2,892E+00
5.		6,203E-02	5,896E-01	2,736E+00
povprečje		6,328E-02	6,003E-01	2,839E+00
izračunana c [µg/L]		0,583	5,507	26,03
odstopanje [%]		<b>-2,83</b>	<b>-8,22</b>	<b>-13,22</b>

## Haloperidol glukuronid

Preglednica XXXII. Točnost podana kot odstopanje [%] izračunane povprečne vrednosti koncentracije haloperidol glukuronida kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. QC 1 - kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji, QC m - kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji in QC h - kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji

ponovitve		QC 1 (0,6 µg/L)	QC m (6 µg/L)	QC h (30 µg/L)
1.	Odgiv	461	4928	/
2.		576	4553	/
3.		565	4862	/
4.		460	5036	/
5.		529	5315	/
povprečje		518	4939	/
izračunana c [µg/L]		0,582	5,880	/
odstopanje [%]		<b>-2,91</b>	<b>-2,01</b>	/

Ker nismo imeli zadostne količine haloperidol glukuronida, smo lahko izvedli kontrolo vzorcev le na dveh nivojih in sicer pri nizki in srednji koncentraciji. Le-te ustrezajo smernicam FDA.

## Metabolit 1

Pri metabolitu 1 kontrolni vzorec odstopa več, kot dovoljujejo smernice FDA, vendar je njegova prava vrednost (0,6 µg/L) na limiti kvantifikacije, zato je dovoljeno odstopanje 20 %. Za zgornji QC smo se odločili, da ga izločimo na podlagi dejstva, da nobeden od realnih vzorcev ni bil v območju koncentracij, ki jih QC h pokriva (najvišja izmerjena vrednost M1 pri pacientih je bila 6,76 µg/L, večina ostalih pa še mnogo nižje – preglednica XLVI in XLVII).

Preglednica XXXIII. Točnost podana kot odstopanje [%] izračunane povprečne vrednosti koncentracije metabolita 1 kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. QC 1 - kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji; QC m - kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji in QC h - kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji;

ponovitve		QC 1 (0,6 µg/L)	QC m (6 µg/L)	QC h (30 µg/L)
1.	Odziv / IS <sub>2</sub>	2,225E-02	1,829E-01	/
2.		1,987E-02	1,760E-01	/
3.		2,200E-02	1,732E-01	/
4.		2,045E-02	1,688E-01	/
5.		2,084E-02	1,687E-01	/
povprečje		2,108E-02	1,739E-01	/
izračunana c [µg/L]		0,710	6,405	/
odstopanje [%]		<b>18,33</b>	<b>6,75</b>	/

Točnost metode je za vse analite ustrezna, saj ne odstopa za več kot 15 % oz. za več kot 20 % na limiti kvantifikacije. Pri nekaterih kontrolnih vzorcih so nihanja kar velika, vendar vsa znotraj dovoljeni mej. Glede na namen analize (raziskava vpliva genetskih polimorfizmov) je točnost analizne metode dovolj dobra.

#### 4.4.3 Ponovljivost

Preglednica XXXIV prikazuje znotrajdnevno, preglednica XXXV pa meddnevno ponovljivost metode za analite z upoštevanjem internega standarda 2. Znotrajdnevna ponovljivost je podana kot RSD oz. CV odzivov alikvotov istih QC-vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih znotraj enega dneva. Meddneva ponovljivost pa je podana kot RSD oz. CV odzivov istih QC-vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih v treh različnih dneh. Iz istih razlogov kot pri točnosti smo tudi ponovljivost pri hal-g in M1 določali smo na dveh nivojih.

Preglednica XXXIV. Prikaz znotrajdnevne ponovljivosti analizne metode za vse analite z upoštevanjem IS2

	RSD (QC l) [%]	RSD (QC m) [%]	RSD (QC h) [%]
hal	3,91	2,23	3,49
M2	2,35	2,41	2,34
hal-g	10,6	7,71	/
M1	4,82	3,39	/

Preglednica XXXV. Prikaz meddnevne ponovljivosti analizne metode za analite z upoštevanjem IS2

	RSD (QC l) [%]	RSD (QC m) [%]	RSD (QC h) [%]
Hal	8,75	3,19	2,85
M2	5,82	1,12	2,56
Hal-g	2,72	12,9	/
M1	18,7	8,53	/

Ponovljivost analizne metode je bila za vse analite in za vse nivoje znotraj dovoljenih mej, razen pri M1 je prišlo pri meddnevni ponovljivosti do večjega odstopanja, kot ga dovoljujejo smernice FDA (maksimalno 15 %), vendar je spodnji kontrolni vzorec na limiti kvantifikacije, za katerega je dovoljeno odstopanje do 20 %, zato kljub večjemu odstopu še vedno ustreza zahtevam smernic FDA.

#### 4.4.4 Uporabno območje metode

Območje za haloperidol obsega celotno referenčno in terapevtsko območje, kar je bistvenega pomena, saj smo metodo razvili z namenom analize realnih vzorcev bolnikov. Pri metabolitu 1 in metabolitu 2 je zgornja meja območja ustreznata, saj pri nobenem od bolnikov vrednosti teh dveh metabolitov niso presegle zgornje meje. Pri nekaterih bolnikih smo dobili vrednosti metabolitov nižje od spodnje meje določljivosti. Pri haloperidol glukuronidu pa je pri približno 20 % bolnikov koncentracija glukuronidiranega metabolita nad zgornjo mejo. Že pred začetkom razvoja smo vedeli, da je glukuronid haloperidola eden najpomembnejših metabolitov haloperidola, vendar zaradi lastne biosinteze standarda haloperidol glukuronida z dokaj nizkim izkoristkom nismo mogli doseči širšega območja kvantifikacije.

Preglednica XXXVI prikazuje območja analizne metode za vse analite z upoštevanjem internega standarda 2.

Preglednica XXXVI. Območja analizne metode za vse štiri analite, pri upoštevanju IS2 ( $^{13}\text{C}_6$  haloperidol).

analit	območje [ $\mu\text{g/L}$ ]
hal	0,1 – 50,0
M2	0,1 – 50,0
hal-g	0,5 – 25,0
M1	0,6 – 10,0

#### 4.4.5 Spodnja meja kvantifikacije

Pri vseh metabolitih smo za naš namen študije dosegli zadovoljivo nizko spodnjo mejo kvantifikacije, čeprav so bili pri nekaterih bolnikih odzivi metabolitov tudi pod njo. Preglednica XXXVII. prikazuje spodnjo mejo kvantifikacije za vse analite, pri upoštevanju internega standarda 2.

Preglednica XXXVII. Spodnja meja kvantifikacije [LLOQ] za vse analite in primerjava z dosedanjimi LLOQ razvitih metod (44, 47, 49)

analit	LLOQ [ $\mu\text{g/L}$ ] pri naši metodi	Dosedanje najnižje LLOQ [ $\mu\text{g/L}$ ]
hal	0,1	0,1 (44)
M2	0,1	0,25 (47)
hal-g	0,5	/
M1	0,6	12,5 (49)

Dosedanje razvite analizne metode so dosegle prav tako limito kvantifikacije 0,1  $\mu\text{g/L}$ , vendar le za haloperidol in ne v sočasni kvantifikaciji z ostalimi metaboliti.

#### 4.4.6 Selektivnost / specifičnost

##### 4.4.6.1 Absolutni učinek matrice

Dokazali smo, da je pri uporabljeni ionsko-izmenjevalni koloni MCX absolutni učinek matrice najmanjši in zanemarljiv. Primerjali smo odzive analitov v realni matrici z odzivi v topilu. Rezultati so predstavljeni v poglavju 4.3.3.

##### 4.4.6.2 Relativni učinek matrice

Pri detekciji z LC–MS/MS, ki je zelo občutljiva metoda detekcije, je bistvenega pomena, da dokažemo odsotnost značilnega vpliva matrice na odzive. Prisotnost vpliva matrice lahko po eni strani vpliva na zmanjšanje ali zvečanje odziva našega analita in nam tako da napačne rezultate, po drugi strani pa lahko tudi povzroči onečiščenje ionskega izvora ter kapilare in ionske optike znotraj masnega spektrometra, kar nam lahko povzroči veliko finančno breme, saj so masni spektrometri zelo drage aparature.

Odsotnost pomembnega relativnega učinka matrice smo dokazali pri vseh analitih, razen pri metabolitu 1. Primerjali smo naklone umeritvenih premic v petih različnih plazmah, torej plazmah pridobljenih od petih različnih dajalcev. Nakloni se niso razlikovali za več kot 5 % (61), razen pri metabolitu 1, kjer je koeficient variacije 8,76 %. V preglednici

XXXVIII so predstavljeni nakloni umeritvenih premic za haloperidol v petih različnih plazmah. V preglednici XXXIX pa lahko vidimo koeficient variacije naklona umeritvenih premic v petih različnih plazmah za posamezen analit.

Preglednica XXXVIII. Nakloni uteženih umeritvenih premic za haloperidol v petih različnih plazmah

plazma	naklon (k)
A	0,136
D	0,136
E	0,139
F	0,144
G	0,140
povprečje	0,139
<b>CV [%]</b>	<b>2,55</b>

Preglednica XXXIX. Koeficient variacije (CV) naklona umeritvenih premic (k) v različnih plazmah za vse analite

analit	CV [%]
hal	2,55
M2	2,49
hal-g	5,15
M1	8,76

#### 4.4.7 Izkoristek ekstrakcije

Kot merilo za uspešnost ekstrakcije smo izračunali izkoristek ekstrakcije. Primerjali smo odzive naknadno obogatenih vzorcev z odzivi predhodno obogatenih vzorcev. Pri haloperidolu smo dosegli zelo dober izkoristek ekstrakcije – presegel je 90 %. K tako dobri uspešnosti ekstrakcije je pripomoglo tudi redčenje vzorcev s 4 %-fosforo kislino. Le-to smo izvedli z namenom sprostitve haloperidola in ostalih analitov iz plazemskih proteinov, saj se haloperidol v veliki meri (med 70 – 90 %) veže na plazemske proteine (4, 16). Rezultati so podani v poglavju 4.3.3. V preglednici XL pa so prikazani izkoristki ekstrakcije za vse preiskovane analite, ki so bili prav tako dobri. Le pri metabolitu 1 je bil izkoristek ekstrakcije nekoliko slabši (67,0 %).

Preglednica XL. Izkoristki ekstrakcije za posamezne analite s podano relativno standardno deviacijo

	izkoristek [%]
hal	90,7 ± 16,1
M2	95,8 ± 15,8
hal-g	90,7 ± 15,3
M1	67,0 ± 16,0

#### 4.4.8 Stabilnost

##### 4.4.8.1 Stabilnost pri sobni temperaturi

###### Stabilnost osnovnih raztopin

S pomočjo UV detektorja smo določili stabilnost osnovnih raztopin. Stabilnost pri sobni temperaturi smo določili osnovnim raztopinam (v 10 %-metanolu v vodi) pri naslednjih koncentracijah: 40, 4000 in 10000 µg/L. V preglednici XLI je prikazan odstotek spremembe odziva po šestih urah na sobni temperaturi glede na čas  $t_0$ .

Preglednica XLI. Stabilnost pri sobni temperaturi - sprememba odzivov haloperidola, metabolita 1 in metabolita 2 osnovnih raztopin pri različnih koncentracijah po 6 h

	40 µg/L	4000 µg/L	10000 µg/L
	sprememba odziva glede na $t_0$ [%]		
hal	BLQ	-0,47	0,31
M2	BLQ	1,77	0,03
M1	BLQ	-1,32	-3,85

Iz preglednice XLI lahko vidimo, da so vsi preiskovani analiti stabilni pri analiziranih koncentracijah. Pri 40 µg/L so bili odzivi na UV-detektorju prenizki za kvantifikacijo.

###### Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin smo določali na dveh nivojih: na nižjem nivoju pri koncentraciji 0,3 µg/L in na višjem nivoju pri koncentraciji 15,2 µg/L.

Stabilnost pri sobni temperaturi smo določali v dveh paralelah, samo obogatene plazemske raztopine in obogatene plazemske raztopine razredčene s 4 %-fosforno kislino v razmerju 1:1. V preglednici XLII je prikazan odstotek spremembe odziva po šestih urah na sobni temperaturi glede na čas  $t_0$ .

Preglednica XLII. Obogatenih plazemskih raztopin – sprememba odzivov vseh analitov na dveh nivojih koncentracije po 6 h na sobni temperaturi; BLQ – pod spodnjo mejo kvantifikacije (angl. below the limit of quantification)

	sprememba odziva glede na $t_0$ [%]; n=3			
	nižji nivo		višji nivo	
	t = 6 h	t = 6 h fosforna	t = 6 h	t = 6 h fosforna
hal	12,76	9,06	7,53	10,07
M2	0,75	9,48	4,94	5,65
hal-g	BLQ	BLQ	1,66	3,34
M1	-33,32	-20,27	-43,90	-50,34

Iz preglednice XLII lahko vidimo, da so bili na sobni temperaturi stabilni vsi analiti, razen metabolita 1, ki je odstopal za več kot 15 %. Z gotovostjo lahko trdimo, da je metabolit 1 nestabilen v obogatenih plazemskih raztopinah na sobni temperaturi, ne glede na prisotnost fosforne kisline. Torej so nizke vrednosti metabolita 1 pri realnih vzorcih najverjetneje tudi posledica nestabilnosti analita v plazmi pri sobni temperaturi.

#### 4.4.8.2 Stabilnost med zamrzovanjem in odtajevanjem

##### Stabilnost osnovnih raztopin

Analiza stabilnosti osnovnih raztopin je potekala na UV-detektorju. Rezultati so prikazani v preglednici XLIII.

Preglednica XLIII. Sprememba odziva za haloperidol, metabolit 1 in metabolit 2 v osnovnih raztopinah pri različnih koncentracijah med tremi cikli zmrzovanja in odtajanja glede na  $t_0$

	sprememba odziva glede na $t_0$ [%]		
	40 µg/L	4000 µg/L	10000 µg/L
hal	0,19	-1,31	0,45
M2	BLQ	1,77	1,08
M1	BLQ	39,47	-3,07

Iz preglednice XLIII je razvidno, da so haloperidol, metabolit 1 in metabolit 2 v osnovnih raztopinah stabilni tudi med zamrzovanjem in odtajanjem. Pri nižjih koncentracijah zaradi prenizkih odzivov nismo mogli kvantificirati kromatografskih vrhov (analizo smo izvajali s HPLC-UV).

#### *Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin*

Analiza stabilnosti je potekala na HPLC-MS/MS detektorju. Preglednica XLIV prikazuje % odstopanja odziva posameznega analita v obogatenih plazemskih raztopinah po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja glede na odziv pri  $t = 0$ .

Preglednica XLIV. Sprememba odzivov za haloperidol, metabolit 1, metabolit 2 in haloperidol glukuronid v obogatenih plazemskih raztopinah med tremi cikli zamrzovanja in odtajanja glede na  $t_0$

analit	sprememba odziva glede na $t_0$ [%]; n=3	
	nižji nivo	višji nivo
hal	-93,79	-26,48
M2	1,62	2,88
hal-g	BLQ	5,09
M1	18,72	8,36

Iz preglednice XLIV lahko vidimo, da je haloperidol nestabilen med cikli zamrzovanja in odtajanja, saj je pri nižji koncentraciji odziv padel za več kot 90 %. Pri višji koncentraciji pa je odziv haloperidola padel za približno 25 %. Nestabilnost haloperidola med cikli zamrzovanja in odtajanja ne vpliva na rezultate realnih vzorcev bolnikov, saj po enkratnem odtajanju nismo opazili značilnega zmanjševanja koncentracije, poleg tega je glavnina realnih vzorcev vsebovala značilno višje koncentracije od 0,3 µg/L. Zakaj pride do nestabilnosti pri haloperidolu, ne vemo. Z razpadanjem haloperidola ne narašča nobeden izmed določanih metabolitov. Zato bi za odgovor, ali pride do kemijskega razpada, morali narediti dodatne analize, ki bi nam dale strukture razpadnih produktov (TOF ali QTOF analiza). Na podlagi slednjih bi lahko sklepali, ali je prišlo do kemijskega razpada ali pa je vzrok nestabilnosti drugje. Predvidevamo, da je vzrok najverjetneje v vezavi haloperidola na stene ali oborjene proteine in ga zato ne uspemo ekstrahirati.

#### **4.4.8.3 Postpreparativna stabilnost**

Dokazali smo, da so vsi analiti stabilni vsaj 24 ur v avtomatskem vzorčevalniku, pri 4 °C. Iz preglednice XLV je razvidno, da so vsi analiti stabilni vsaj 24 ur pri 4 °C, saj so se odzivi spremenili za manj kot 15 %. Pri haloperidol glukuronidu so bili odzivi pri kontrolnem vzorcu nizke koncentracije prenizki za kvalitativno določitev vrednosti.

Preglednica XLV. Odstotek spremembe odziva za posamezen analit po 24 urah v avtomatskem vzorčevalniku glede na odziv pri času t = 0

	sprememba odziva po 24 urah [%]	
	nižji nivo	višji nivo
hal	-1,74	1,33
M2	0,92	10,67
hal-g	BLQ	13,61
M1	-11,31	5,31

#### **4.5 Aplikacija metode na realne vzorce**

Z metodo, ki smo jo razvili, smo analizirali dva niza realnih vzorcev: Vzorce iz doktorske disertacije (51) in klinične študije z naslovom: »Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami«. Rezultati so predstavljeni v preglednicah XLVI in XLVII. Vrednosti haloperidol glukuronida, ki so obarvane vijolično, so nad zgornjo mejo kvantifikacije, zato jih podajamo le kot oceno; za njihov izračun je bila uporabljena ekstrapolirana umeritvena premica iz validiranega območja 0,5-25 µg/L. Analiti, katerih vrednost je bila pod spodnjo mejo kvantifikacije, pa so označeni z oznako BLQ.

Preglednica XLVI. Vrednosti analitov vzorcev iz doktorske disertacije (51). Obarvane vrednosti analita so nad zgornjo mejo območja; BLQ – vrednosti analitov so pod LLOQ;

VZOREC	HAL [µg/L]	M2 [µg/L]	HAL-G [µg/L]	M1 [µg/L]
A 7	4,69	1,00	25,26	BLQ
A 8	7,03	7,14	38,70	2,40
A 13	3,03	0,69	8,71	BLQ
A 19	39,30	12,13	69,82	1,71
A 20	6,96	2,15	48,87	1,31
A 21	1,94	0,53	10,00	BLQ

A 22	19,59	18,69	72,42	2,41
A 24	12,70	2,43	36,54	0,80
A 25	17,93	3,19	51,87	1,93
A 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
A 45	11,13	3,54	26,66	BLQ
A 48	14,51	2,59	16,95	1,06
A 58	8,66	2,87	10,47	BLQ
A 68	21,86	2,30	38,65	1,67
A 70	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
B 7	4,13	1,12	10,42	BLQ
B 8	5,96	9,95	15,12	1,99
B 13	2,13	0,81	4,78	BLQ
B 19	30,00	9,82	32,67	1,33
B 20	5,08	3,01	21,10	1,34
B 21	2,07	0,66	9,53	BLQ
B 22	27,28	22,44	85,09	2,68
B 24	20,66	5,21	64,74	1,03
B 25	12,70	4,10	41,06	2,00
B 26	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
B 45	21,61	9,49	58,92	1,17
B 48	12,21	5,91	45,28	3,51
B 58	7,03	4,04	10,16	0,81
B 68	15,53	7,45	58,15	5,33
B 70	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

Preglednica XLVII. Vrednosti analitov iz klinične študije »Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami« (67). Obarvane vrednosti analita so nad zgornjo mejo območja; BLQ – vrednosti analitov so pod LLOQ;

VZOREC	HAL [µg/L]	M2 [µg/L]	HAL-G [µg/L]	M1 [µg/L]
1	1,30	0,27	2,67	BLQ
2	2,08	3,70	9,33	BLQ

3	1,92	0,49	3,53	BLQ
4	0,53	BLQ	1,70	BLQ
5	8,46	5,41	22,35	1,06
6	2,47	0,49	1,78	BLQ
7	5,20	0,69	12,95	BLQ
8	8,35	1,49	9,27	BLQ
9	16,95	3,22	40,43	0,66
10	3,68	5,81	6,55	1,83
11	7,57	2,04	25,03	1,62
12	18,46	9,26	75,18	1,90
13	12,33	2,34	48,47	1,36
14	0,68	BLQ	2,35	BLQ
15	3,01	1,00	4,97	1,46
16	1,24	0,29	6,96	BLQ
17	1,30	0,32	4,56	1,12
18	1,23	2,01	13,09	BLQ
19	2,20	3,23	6,80	0,81
20	34,91	30,24	48,98	5,98
21	0,91	BLQ	1,37	BLQ
22	10,25	1,42	15,74	1,55
31	34,25	13,99	149,22	5,24
32	2,70	0,70	5,01	BLQ
33	2,26	0,37	2,74	BLQ
34	0,51	0,99	1,46	BLQ
35	0,84	BLQ	1,22	BLQ
36	2,55	0,44	5,76	BLQ
38	0,77	BLQ	3,43	BLQ
40	0,21	BLQ	1,59	BLQ
41	0,81	BLQ	1,61	BLQ
42	0,95	2,34	6,83	BLQ
43	1,32	0,38	6,60	BLQ
44	1,11	0,27	5,05	BLQ

45	40,56	46,12	42,44	4,40
46	2,30	0,78	16,04	1,58
47	1,22	0,25	3,25	BLQ
48	1,85	0,34	4,10	BLQ
50	5,13	0,99	27,75	1,45
51	1,66	0,25	3,77	BLQ
52	2,86	0,81	8,85	BLQ
53	0,76	BLQ	5,70	BLQ
56	36,84	30,29	67,81	6,76
57	1,24	0,31	2,40	BLQ
58	14,57	23,10	18,04	0,63
59	0,93	0,22	2,28	BLQ
61	1,33	4,37	6,24	BLQ
62	3,00	0,46	14,18	0,90
64	1,01	0,41	5,01	1,48
65	1,10	0,35	4,08	BLQ
66	1,92	0,78	2,43	BLQ
71	0,57	BLQ	1,14	BLQ
2P	2,95	7,35	20,33	2,36
3P	1,80	0,42	3,11	BLQ
5P	18,35	12,11	34,76	1,66
6P	4,41	0,92	2,99	BLQ
7P	6,97	0,92	14,14	BLQ
8P	5,67	1,51	5,97	BLQ
9P	7,73	1,15	41,09	0,97
10P	1,35	0,26	0,95	BLQ
12P	19,06	3,87	87,43	1,16
13P	2,75	0,48	6,94	BLQ
14P	0,63	0,13	1,91	BLQ
15P	3,79	0,72	3,66	BLQ
16P	0,78	BLQ	2,03	BLQ

17P	1,14	BLQ	2,16	BLQ
19P	2,31	4,54	10,31	1,22
20P	34,55	11,76	32,41	2,80
21P	0,86	BLQ	1,12	BLQ
22P	5,97	0,87	7,95	0,70
34P	0,48	0,85	0,60	BLQ
35P	0,87	BLQ	1,13	BLQ
36P	3,15	0,41	5,40	BLQ
40P	0,57	BLQ	15,38	BLQ
42P	0,73	BLQ	8,49	BLQ
43P	1,26	0,24	9,21	BLQ
46P	2,00	0,34	9,10	BLQ
47P	1,51	0,27	4,77	BLQ
50P	4,56	0,86	16,50	BLQ
51P	1,33	0,21	2,62	BLQ
52P	2,54	0,89	6,46	BLQ
53P	0,70	0,23	5,44	1,02
59P	0,77	BLQ	1,62	BLQ
64P	1,09	0,27	4,00	BLQ
65P	1,16	BLQ	2,38	BLQ
66P	1,13	0,33	1,15	BLQ
A	11,25	0,60	1,76	1,33
B	26,83	0,31	4,51	0,97

Po smernicah FDA je mogoče validirano metodo aplicirati na daljšo analizo realnih vzorcev oz. v rutinsko analizo, če vsaj 67 % QC-jev, analiziranih med sekvenco realnih vzorcev, odstopa za manj kot 15 % od referenčne vrednosti (53). Naši rezultati so ustrezali tej zahtevi (75 %).

## 5. SKLEPI

V diplomski nalogi smo razvili in validirali novo analizno UHPLC metodo z masno detekcijo za sočasno kvantifikacijo haloperidola in njegovih najpomembnejših metabolitov v plazmi: reducirani haloperidol (M2), haloperidol glukuronid in 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin (M1). Pri M1 nam je validacija uspelo le delno zaradi slabe plazemske stabilnosti in prisotnosti nekoliko večjega učinka matrice. Dobro ločitev haloperidola in metabolitov smo dosegli na koloni z obrnjeno fazo Kinetex 100x3mm C18. Čas ene analize je trajal 6,5 min skupaj z reekvilibracijo kolone.

Preizkusili smo več možnih načinov ekstrakcije: z obarjanjem proteinov, s hibridno ekstrakcijo in z ionsko-izmenjevalno ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Za najboljšo metodo priprave vzorcev se je izkazala kationsko-izmenjevalna ekstrakcija na trdnem nosilcu, saj smo z njo dobili visoke in ponovljive izkoristke vseh analitov (67-90 %) in hkrati dosegli zelo dobro očiščenje vzorcev, kar se je izkazalo z zelo nizkim absolutnim učinkom matrice. Metoda je točna, ponovljiva, selektivna in linearna v območju 0,1 – 50,0 µg/L za haloperidol in M2, v območju 0,5 – 25,0 µg/L za haloperidol glukuronid ter 0,6 – 10,0 µg/L za M1.

Pri študiji postpreparativne stabilnosti smo ugotovili, da so vsi analiti stabilni vsaj 24 ur, če se nahajajo v avtomatskem vzorčevalniku, pri 4 °C. Osnovne raztopine vseh metabolitov so stabilne tako na sobni temperaturi, kot tudi med cikli odtajevanja in zamrzovanja. Pri analizi stabilnosti obogatenih plazemskih raztopin pa smo ugotovili, da je M1 nestabilen pri sobni temperaturi v plazmi, kar ima lahko za posledico zelo nizke izmerjene plazemske koncentracije M1 v realnih vzorcih. Predvsem pa nas je presenetila do sedaj še neobjavljena ugotovitev, da je haloperidol nestabilen med cikli zamrzovanja in odtajanja (odziv pade pri višji koncentraciji za približno 25 %). Slednja ugotovitev ne vpliva na rezultate realnih vzorcev bolnikov, saj po enkratnem odtajanju nismo opazili značilnega zmanjševanja koncentracije.

Poudariti je treba, da smo uspeli dokazati odsotnost značilnega relativnega učinka matrice pri vseh analitih, kar je bistvenega pomena za točnost rezultatov pri kvantifikaciji z masnim spektrometrom. Izjema je bil le M1, pri katerem je variabilnost naklonov namesto dovoljenih 5 % znašala 8,67 %. Kljub temu pa je bila metoda še vedno ustrezna za glavne

namene obej kliničnih študij, kjer je bil cilj spremljati predvsem haloperidol in aktivni metabolit M2 ter haloperidol glukuronid. M1 pa je bil pri večini vzorcev tako ali tako pod limito kvantifikacije (0,6 µg/L).

## 6. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Pharmacology, ed. 4, Elsevier, Philadelphia, 1999: 374.
2. Williams DA, Lemke TL: Foye's principles of Medicinal Chemistry, ed. 5, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 2002: 408-33.
3. Javna Agencija RS za Zdravila in Medicinske Pripomočke: Baza Podatkov o Zdravilih. <http://www.zdravila.net>. Dostopano: 10.10.-2011.
4. Kudo S, Ishizaki T: Pharmacokinetics of Haloperidol: An Update. Clinical pharmacokinetics 1999; 37: 435-56.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Pharmacology, ed. 4, Elsevier, Philadelphia, 1999: 539-49.
6. Wolf ME, Roth RH: Autoreceptor Regulation of Dopamine Synthesis. Annals of the New York Academy of Sciences 1990; 604: 323-43.
7. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology. sixth ed. Elsevier, Philadelphia, 2007: 545 - 56.
8. Mavroidis ML, Kanter DR, Hirschowitz J, Garver DL: Clinical response and plasma haloperidol levels in schizophrenia. Psychopharmacology 1983; 81: 354-6.
9. Hollister LE, Kim DY: Intensive treatment with haloperidol of treatment-resistant chronic schizophrenic patients. American Journal of Psychiatry 1982; 139: 1466-8.
10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology. Elsevier, Amsterdam, 2007: 392.
11. Prommer E: Role of Haloperidol in Palliative Medicine: An Update. The American Journal of Hospice and Palliative Care 2011.
12. Evans G: A handbook of bioanalysis and drug metabolism, CRC Press, LLC, 2004: 208
13. Shipkova M, Wieland E: Glucuronidation in therapeutic drug monitoring. Clinica Chimica Acta 2005; 358: 2-23.
14. Fang J, McKay G, Song J, Remillard A, Li X, Midha K: In vitro characterization of the metabolism of haloperidol using recombinant cytochrome p450 enzymes and human liver microsomes. Drug Metab Dispos 2001; 29: 1638-43.

15. Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC: Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. ed 5, The McGraw-Hill, 2005
16. Higashi Y, Kitahara M, Fujii Y: Simultaneous analysis of haloperidol, its three metabolites and two other butyrophenone-type neuroleptics by high performance liquid chromatography with dual ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography* 2006; 20: 166-72.
17. Janssen PAJ Bever V: Psychotherapeutic Drugs. Marcel Decker, New York, 1977: 839-921.
18. Ilett KF, Mackie AE, Jellett LB, Madsen BW, Somers K, Hughes IE: Pharmacokinetics of Haloperidol-C-14 in Man. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1978; 5: 267-8.
19. Forsman A, Folsch G, Larsson M, Ohman R: Metabolism of Haloperidol in Man. *Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental* 1977; 21: 606-17.
20. Forsman A, Mårtensson E, Nyberg G, Öhman R: A gas chromatographic method for determining haloperidol. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1974; 286: 113-24.
21. Oida T, Terauchi Y, Yoshida K, Kagemoto A, Sekine Y: Use of Antisera in the Isolation of Human Specific Conjugates of Haloperidol. *Xenobiotica* 1989; 19: 781-93.
22. Pan LP, Wijnant P, De Vriendt C, Rosseel MT, Belpaire FM: Characterization of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the in vitro N-dealkylation of haloperidol. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 44: 557-64.
23. Inaba T, Kovacs J: Haloperidol reductase in human and guinea pig livers. *Drug Metabolism and Disposition* 1989; 17: 330-3.
24. Someya T, Shibasaki M, Noguchi T, Takahashi S, Inaba T: Haloperidol Metabolism in Psychiatric-Patients - Importance of Glucuronidation and Carbonyl Reduction. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 1992; 12: 169-74.
25. Fang J, Gorrod JW: High-performance liquid chromatographic method for the detection and quantitation of haloperidol and seven of its metabolites in microsomal preparations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1993; 614: 267-73.
26. Eyles WD, McGrath JJ, Stedman TJ, Pond SM: Chirality of reduced haloperidol in humans. *European Neuropsychopharmacology* 1998; 8: 127-9.

27. Pan L, Belpaire FM: In vitro study on the involvement of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 in the metabolism of haloperidol and reduced haloperidol. European Journal of Clinical Pharmacology 1999; 55: 599-604.
28. Llerena A, Alm C, Dahl ML, Ekqvist B, Bertilsson L: Haloperidol disposition is dependent on debrisoquine hydroxylation phenotype. Therapeutic drug monitoring 1992; 14: 92-7.
29. Jürgen B, Kirchheimer J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Müller-Oerlinghausen B, Roots I: The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2002; 72: 438–52.
30. Someya T, Shimoda K, Suzuki Y, Sato S, Kawashima Y, Hirokane G, Morita S, Yokono A, Takahashi S: Effect of CYP2D6 genotypes on the metabolism of haloperidol in a Japanese psychiatric population. Neuropsychopharmacology 2003; 28: 1501-5.
31. Shim JC, Ahn J-M, Jung D-U, Kong B-G, Kang J-W, Liu K-H, Shin J-G: The Effect of CYP2D6/3A5 Genotypes on Plasma Concentrations of Haloperidol after Adjunctive Treatment of Aripiprazole. Korean Journal of Biological Psychiatry 2011; 18: 95-100.
32. Lin JH, Lu AYH: Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. Clinical pharmacokinetics 1998; 35: 361-90.
33. Subramanyam B, Rollema H, Woolf T, Castagnoli Jr N: Identification of a potentially neurotoxic pyridinium metabolite of haloperidol in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 1990; 166: 238-44.
34. Subramanyam B, Pond SM, Eyles DW, Whiteford HA, Fouda HG, Castagnoli Jr N: Identification of potentially neurotoxic pyridinium metabolite in the urine of schizophrenic patients treated with haloperidol. Biochemical and Biophysical Research Communications 1991; 181: 573-8.
35. Ulrich S, Sandmann U, Genz A: Serum concentrations of haloperidol pyridinium metabolites and the relationship with tardive dyskinesia and parkinsonism: a cross-section study in psychiatric patients. Pharmacopsychiatry 2005; 38: 171-7.
36. Avent KM, DeVoss JJ, Gillam EMJ: Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Haloperidol and Reduced Haloperidol to Pyridinium Metabolites. Chemical Research in Toxicology 2006; 19: 914-20.

37. Kato Y, Nakajima M, Oda S, Fukami T, Yokoi T: Human UDP-glucuronosyltransferase Isoforms Involved in Haloperidol Glucuronidation and Quantitative Estimation of their Contribution. *Drug Metabolism and Disposition* 2012; 40: 240-8.
38. Morita S, Roh H-K, Shimoda K, Someya T, Shibasaki M, Hirokane G, Svensson J-O, Bertilsson L: A comparison of haloperidol plasma levels among Japanese, Korean and Swedish psychiatric patients. *Clinical Neuropsychopharmacology and Therapeutics* 2010; 1: 24-31.
39. Titier K, Bouchet S, Péhourcq F, Moore N, Molimard M: High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Journal of Chromatography B* 2003; 788: 179-85.
40. Yasui-Furukori N, Inoue Y, Chiba M, Tateishi T: Simultaneous determination of haloperidol and bromperidol and their reduced metabolites by liquid-liquid extraction and automated column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2004; 805: 175-80.
41. Zhang G, Terry AV, Bartlett MG: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; 21: 920-8.
42. Kumazawa T, Saeki K, Yanagisawa I, Uchigasaki S, Hasegawa C, Seno H, Suzuki O, Sato K: Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 394: 1161-70.
43. Fujii T, Hatanaka K, Sato G, Yasui Y, Arimoto H, Mitsutsuka Y: Selective determination of haloperidol in human serum: surface ionization mass spectrometry and gas chromatography with surface ionization detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996; 687: 395-403.
44. Hempenius J, Steenvoorden RJM, Lagerwerf FM, Wieling J, Jonkman JHG: "High throughput" solid-phase extraction technology and turbo ionspray LC-MS-MS applied to the determination of haloperidol in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999; 20: 889-98.

45. Jain T, Bhandari A, Ram V, Sharma S, Chaudhary RK, et al: High-performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for Quantification of Haloperidol Levels in Schizophrenic Patients During Routine Clinical Practice. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* 2011; 3: 008-12.
46. Kishikawa N, Hamachi C, Imamura Y, Ohba Y, Nakashima K, Tagawa Y, Kuroda N: Determination of haloperidol and reduced haloperidol in human serum by liquid chromatography after fluorescence labeling based on the Suzuki coupling reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; 386: 719-24.
47. Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Dupuy JL, Pénicaut B, Lachâtre G: Determination of haloperidol and its reduced metabolite in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997; 688: 275-80.
48. Arinobu T, Hattori H, Iwai M, Ishii A, Kumazawa T, Suzuki O, Seno H: Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of haloperidol and its metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B* 2002; 776: 107-13.
49. Aboul-Enein HY, Ali I, Hoenen H: Rapid determination of haloperidol and its metabolites in human plasma by HPLC using monolithic silica column and solid-phase extraction. *Biomedical Chromatography* 2006; 20: 760-4.
50. Polanc D: Razvoj in validacija analitike HPLC za ugotavljanje plazemskih koncentracij haloperidola in njegovih metabolitov. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005.
51. Locatelli I, Grabnar I: Načrtovanje režimov odmerjanja varfarina, risperidona in haloperidola z metodami klinične farmakokinetike: Clinical pharmacokinetics of warfarin, risperidone, and haloperidole: implications for dosing regimen design: doktorska disertacija. I. Locatelli, 2008,
52. Waters Oasis: Oasis Sample Extraction Products.  
<http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209>. Dostopano: 20.9.-2011.
53. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation U. S. Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001.
54. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y: Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009; 877: 2198-207.

55. Paul JT: Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 328-34.
56. Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA: Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 44: 342-55.
57. Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ: Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 382: 934-46.
58. Buhrman DL, Price PI, Rudewicz PJ: Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1996; 7: 1099-105.
59. Heller DN: Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007; 21: 644-52.
60. Niessen WMA, Manini P, Andreoli R: Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 2006; 25: 881-99.
61. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003; 75: 3019-30.
62. Narayanan R, LeDuc B, Williams DA: Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Science* 2004; 74: 2527-39.
63. Trontelj J, Bogataj M, Marc J, Mrhar A: Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; 855: 220-7.
64. Trdan T, Roskar R, Trontelj J, Ravnikar M, Mrhar A: Determination of raloxifene and its glucuronides in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2011; 879: 2323-31.

65. Silvestro L, Gheorghe M, Iordachescu A, Ciuca V, Tudoroni A, Rizea Savu S, Tarcomnicu I: Development and validation of an HPLC–MS/MS method to quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite, and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 401: 1023-34.
66. Ulrich S, Wurthmann C, Brosz M, Meyer FP: The relationship between serum concentration and therapeutic effect of haloperidol in patients with acute schizophrenia. *Clinical pharmacokinetics* 1998; 34: 227-63.
67. Klinična študija: Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami. Marija Boškovič, 2011.