

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Boštjan Piltaver

**DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ
LAMOTRIGINA IN NJEGOVIH METABOLITOV Z
VALIDIRANO METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE
VISOKE LOČLJIVOSTI**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Boštjan Piltaver

**DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ
LAMOTRIGINA IN NJEGOVIH METABOLITOV Z
VALIDIRANO METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE
VISOKE LOČLJIVOSTI**

**DETERMINATION OF LAMOTRIGINE AND ITS
METABOLITES IN HUMAN PLASMA BY VALIDATED
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
METHOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

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

ZAHVALA

Za mentorstvo in strokovno pomoč se iskreno zahvaljujem doc. dr. Tomažu Vovku in vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo, ki so mi z nasveti pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre mojim domačim ter sošolcem in prijateljem za podporo in pomoč tekom celotnega študija.

IZJAVA

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

Boštjan Piltaver

Ljubljana, 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos

Vsebina

1.	Uvod.....	1
1.1.	Epilepsija	1
1.2.	Sodobno zdravljenje epilepsije	2
1.2.1.	Ojačanje učinka GABE.....	2
1.2.2.	Inhibicija natrijevih kanalov	2
1.2.3.	Inhibicija kalcijevih kanalov.....	3
1.3.	Lamotrigin	3
1.4.	Metode za določanje lamotrigina in njegovih metabolitov v bioloških vzorcih.....	5
1.5.	Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (TDM).....	8
1.5.1.	TDM lamotrigina	9
2.	Namen dela	10
3.	Materiali in metode	11
3.1.	Materiali.....	11
3.1.1.	Biološki material.....	11
3.1.2.	Standardi	11
3.1.3.	Reagenti in topila	11
3.1.4.	Naprave in pribor	12
3.2.	Metode	13
3.2.1.	Biosinteza glukuronidov lamotrigina.....	14
3.2.2.	Priprava osnovnih raztopin za razvoj metode.....	18
3.2.3.	Priprava pufrov	18
3.2.4.	Priprava plazemskih vzorcev za razvoj metode.....	19
3.2.5.	Izbira internega standarda.....	19
3.2.6.	Razvoj kromatografije	20
3.2.7.	Kvantifikacija lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu	21
3.3.	Validacija metode	23
3.3.1.	Priprava standardnih vodnih raztopin in standardnih plazemskih vzorcev za validacijo	23

3.3.2.	Linearnost	26
3.3.3.	Točnost.....	27
3.3.4.	Ponovljivost	27
3.3.5.	Območje linearnosti	27
3.3.6.	Meja določljivosti (LOQ)	27
3.3.7.	Postpreparativna stabilnost	28
3.3.8.	Uspešnost ekstrakcije.....	28
3.3.9.	Validacija redčenja	29
3.4.	Aplikacija metode na realne plazemske vzorce	30
4.	Rezultati	31
4.1.	Izbira internega standarda	31
4.2.	Razvoj kromatografije	31
4.3.	Kvantifikacija lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu	32
4.4.	Končna optimizirana metoda	33
4.4.1.	Priprava plazemskega vzorca.....	33
4.4.2.	Kromatografija.....	33
4.5.	Validacija metode	36
4.5.1.	Linearnost	36
4.5.2.	Točnost.....	41
4.5.3.	Ponovljivost	45
4.5.4.	Meja določljivosti (LOQ)	47
4.5.5.	Postpreparativna stabilnost	48
4.5.6.	Uspešnost ekstrakcije.....	48
4.5.7.	Validacija redčenja	49
4.6.	Aplikacija metode na realne plazemske vzorce	50
5.	Razprava	51
5.1.	Razvoj kromatografije	51
5.2.	Validacija metode	53
5.2.1.	Linearnost	53
5.2.2.	Točnost.....	53
5.2.3.	Ponovljivost	54

5.2.4.	Meja določljivosti (LOQ)	54
5.2.5.	Postpreparativna stabilnost	55
5.2.6.	Uspešnost ekstrakcije.....	55
5.2.7.	Validacija redčenja	55
5.3.	Aplikacija metode na realne plazemske vzorce	56
5.4.	Preučevanje vpliva strukture analitov na absorbanco	56
6.	Sklepi	57
7.	Literatura.....	58

Kazalo preglednic

Preglednica I: Razvrstitev epileptičnih napadov po ILAE (4).....	1
Preglednica II: Postopek sušenja plazemskih vzorcev.....	19
Preglednica III: Preizkušeni fosfatni pufri.....	21
Preglednica IV: Priprava raztopin za umeritveno premico za lamotrigin-2-N-glukuronid	22
Preglednica V: Priprava osnovnih raztopin in njihovih redčenj	23
Preglednica VI: Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico	24
Preglednica VII: Priprava kontrolnih vzorcev	25
Preglednica VIII: Končne koncentracije analitov v plazemskih vzorcih.....	25
Preglednica IX: Priprava standardov za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije.....	28
Preglednica X: Priprava Qc standardov za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije.....	29
Preglednica XI: Začetne in končne koncentracije analitov za validacijo redčenja.....	29
Preglednica XII: Odzivi vodnih standardov in izračun koncentracije lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu.....	32
Preglednica XIII: Retencijski časi preiskovanih analitov in internega standarda	34
Preglednica XIV: Odzivi lamotrigina in IS v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico	37
Preglednica XV: Enačbe umeritvenih premic in vrednosti determinacijskih koeficientov za lamotrigin.....	38
Preglednica XVI: Točnosti odzivov lamotrigina, izračunane iz umeritvene premice	38
Preglednica XVII: Odzivi lamotrigin-2-N-glukuronida in IS v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico.....	39
Preglednica XVIII: Enačbe umeritvenih premic in vrednosti determinacijskih koeficientov za lamotrigin-2-N-glukuronid	40
Preglednica XIX: Točnosti odzivov lamotrigin-2-N-glukuronida, izračunane iz umeritvene premice.....	40
Preglednica XX: Odzivi in točnost metode za lamotrigin brez upoštevanja IS.....	41
Preglednica XXI: Odzivi in točnost metode za lamotrigin z upoštevanjem IS	42
Preglednica XXII: Odzivi in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid brez upoštevanja IS	43

Preglednica XXIII: Odzivi in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid z upoštevanjem IS	44
Preglednica XXIV: Rezultati za znotrajdnevno ponovljivost.....	45
Preglednica XXV: Rezultati za meddnevno ponovljivost	46
Preglednica XXVI: Meje določljivosti	47
Preglednica XXVII: Postpreparativna stabilnost vzorcev	48
Preglednica XXVIII: Uspešnost ekstrakcije	48
Preglednica XXIX: Validacija redčenja.....	49
Preglednica XXX: Realna plazemska vzorca	50

Povzetek

V diplomski nalogi smo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti razvili hitro in enostavno metodo za analizo protiepileptične učinkovine lamotrigina in njegovih glavnih neaktivnih metabolitov lamotrigin-2-N-glukuronida in lamotrigin-5-N-glukuronida v plazemskih vzorcih. Analite smo detektirali z diodnim nizom (DAD), saj vsi trije v svoji strukturi vsebujejo kromofore. Ustrezno ločbo analitov smo dosegli s kolono Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150) in izokratsko mobilno fazo, ki je bila sestavljena iz 76 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 2,5 in 24 % metanola. Kot interni standard smo uporabili kloramfenikol. Z DAD detektorjem smo izmerili najvišje odzive pri valovni dolžini 220 nm. Pretok mobilne faze je bil konstanten pri 1,6 mL/min, temperaturo kolone smo termostatirali na 50 °C, v HPLC sistem pa smo injicirali 10 µL vzorca.

Proteine iz plazemskih vzorcev smo oborili z metanolom, izkoristek ekstrakcije je bil nad 85 % in ponovljiv (najvišji koeficient variance je znašal 9,67 pri lamotriginu). Metoda je bila za lamotrigin linearna v območju med 0,1 in 20 µg/mL, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa v območju med 0,25 in 15 µg/mL. Meja določljivosti za lamotrigin je bila pri koncentraciji 0,1 µg/mL, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa pri 0,25 µg/mL. Pri preučevanju postpreparativne stabilnosti vzorcev smo ugotovili, da so le-ti stabilni najmanj 12 h, ob pogoju, da jih hranimo v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 4 °C. Metoda je izkazala tudi ustrezno točnost in ponovljivost. Za lamotrigin je najvišji CV znašal 13,3 %, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa 19,8 %.

Metoda je primerna za analizo plazemskih vzorcev bolnikov z epilepsijo, ki prejemajo lamotrigin.

Abstract

A rapid and simple high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with diode array detection (DAD) has been developed for the analysis of the antiepileptic agent lamotrigine and its main inactive metabolites lamotrigine-2-N-glucuronide and lamotrigine-5-N-glucuronide in plasma samples. The analytes were separated on a Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150) column in isocratic elution, using a mobile phase composed of a 25 mM, pH 2.5 phosphate buffer and methanol (76:24 v/v). Chloramphenicol was used as the internal standard. The highest analyte responses were achieved with the DAD detector set at 220 nm. The flow rate was set at 1.6 mL/min, the column was heated to 50 °C and the samples were injected into the HPLC system by means of a 10 µL loop.

The plasma samples were treated with deproteinization by methanol with the extraction yields above 85 % and precise (the coefficient of variation values never exceeded 9.67 %). Good linearity was obtained in the 0.1 - 20 µg/mL range for lamotrigine and in the 0.25 - 15 µg/mL range for lamotrigine-2-N-glucuronide. The lower limits of quantification at 0.1 µg/mL and 0.25 µg/mL were reached for lamotrigine and lamotrigine-2-N-glucuronide respectively. Plasma samples were stable for at least 12 hours when stored in an autosampler at 4 °C. The analytical method was successfully validated in terms of accuracy as well as precision. The coefficient of variation values were lower than 13,3 % and 19,8 % for lamotrigine and lamotrigine-2-N-glucuronide respectively.

The method has proven to be suitable for the analysis of plasma samples from epileptic patients treated with lamotrigine.

Seznam okrajšav

ILAE – Mednarodna Liga proti epilepsiji (International League Against Epilepsy)

PEZ – protiepileptično zdravilo

GABA – γ -aminomaslena kislina

UGT – uridin 5'-difosfat-glukuronozil transferaza

FPIA – polarizacijska imunofluorescenčna metoda

CMIA – kemiluminiscentna imunološka metoda z uporabo mikrodelcev

QMS – kvantitativni mikrosferični sistem

LC – tekočinska kromatografija

MS – masni spektrometer

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

SPME – trdno-fazna mikroekstrakcija

GC – plinska kromatografija

MLC – micelarna tekočinska kromatografija

RF-HPLC – reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

SDS – natrijev dodecilsulfat

ESI – ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju

FID – plamensko ionizacijski detektor

MECC – micelarna elektrokinetična kapilarna kromatografija

DBS – vzorci posušene krvi (dried blood spots)

TDM – terapevtsko spremljanje koncentracij (Therapeutic Drug Monitoring)

ECD – detektor za zajetje elektronov

UV – ultravijolično

DAD – detektor z diodnim nizom (diode array detection)

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

EDTA – etilendiamin tetraacetna kislina

TOC – celokupni organski ogljik (total organic carbon)

DMSO – dimetil sulfoksid

UDPGA – uridin 5'-difosfoglukuronska kislina

TEA – trietilamin

OR – osnovna raztopina

MF – mobilna faza

LOQ – meja določljivosti

Qc – kontrolni vzorec

IS – interni standard

LLOQ – spodnja meja določljivosti

SD – standardni odmik

CV – koeficient variance

AVG – povprečna vrednost

1. Uvod

1.1. Epilepsija

Izraz epilepsija zajema skupino nevroloških motenj, ki se izražajo v obliki epileptičnih napadov. Ti se pojavijo ob nenormalni aktivnosti nevronov v možganih in predstavljajo znake in simptome bolezni. Epilepsija prizadene 0,5 – 1 % populacije. Vzrok nastanka pogosto ni določljiv, lahko pa se razvije kot posledica možganskih okvar, kot so travma, kap, infekcija ali rast tumorja. Diagnoza epilepsije je pogojena z dolgotrajno epileptično možgansko aktivnostjo, en sam epileptični napad še ne pomeni bolezni (1, 2).

Organizacija Mednarodna liga proti epilepsiji (ILAE) razvršča epileptične napade po izvoru na dve glavni skupini, in sicer na generalizirane napade in fokalne (žariščne) napade. Generalizirani napadi izvirajo iz motnje v določenemu delu možganov, ki se hitro razširi in zajame obe možganski hemisferi. Pogosto pride do motnje ali izgube zavesti. Žariščni napadi so navadno omejeni in običajno zajemajo samo eno možgansko hemisfero. Simptomi so odvisni od predela možganov, ki jih motnja zajame. Kažejo se v obliki mišičnih kontrakcij, nenavadnih čutnih zaznavah in spremembah razpoloženja in obnašanja (1, 3, 4).

Preglednica I: Razvrstitev epileptičnih napadov po ILAE (4)

- Generalizirani epileptični napadi:
 - tonični – klonični napadi,
 - absence:
 - tipične,
 - atipične,
 - s posebnimi lastnostmi:
 - mioklonične absence,
 - mioklonija vek,
 - mioklonični napadi:
 - mioklonični,
 - mioklonični atipični,
 - mioklonični tipični,
 - klonični napadi,
 - tonični napadi,
 - atonični napadi.
- Fokalni (žariščni) napadi, ki se opredelijo na podlagi specifičnih deskriptorjev, kot so npr. stanje zavesti in drugi.

1.2. Sodobno zdravljenje epilepsije

Osnovni cilj zdravljenja je preprečevanje epileptičnih napadov z enim samim (monoterapija) protiepileptičnim zdravilom (PEZ) ali z racionalno kombinacijo PEZ z različnim načinom delovanja, v enem ali dveh dnevni odmerkih, brez neželenih učinkov zdravila in ohranjeno kakovostjo življenja. Odločitev o izbiri zdravljenja naj bo individualna, upoštevati moramo starost bolnika, rodno obdobje pri ženskah in sočasno jemanje drugih zdravil (5).

PEZ učinkujejo po treh glavnih mehanizmih:

- povečujejo učinek γ -aminomaslene kisline (GABA),
- inhibirajo natrijeve kanale,
- inhibirajo kalcijeve kanale.

Večina jih deluje na več tarč hkrati in največkrat ni znano, katera pot najbolj doprinese k protiepileptičnemu učinku.

1.2.1. Ojačanje učinka GABA

Nekatere spojine (fenobarbital in benzodiazepini) povečajo aktivacijo GABA_A receptorjev, vigabatrin ireverzibilno inhibira encim GABA transaminazo v astrocitih, ki je odgovoren za inaktivacijo GABA, tiagabin pa preprečuje ponovni privzem GABA v celicah glije. Tako se poveča njena ekstracelularna koncentracija in s tem inhibitorni učinek.

1.2.2. Inhibicija natrijevih kanalov

Veliko PEZ vpliva na vzdražnost celične membrane preko napetostno odvisnih natrijevih kanalov, ki sodelujejo pri tvorbi akcijskega potenciala. Ob depolarizaciji nevrona se poveča število natrijevih kanalov v neaktivirani obliki. Takrat se nanje vežejo PEZ in jim preprečujejo vrnitev v osnovno stanje. Tako se zniža število kanalov, ki so sposobni tvorbe akcijskih potencialov.

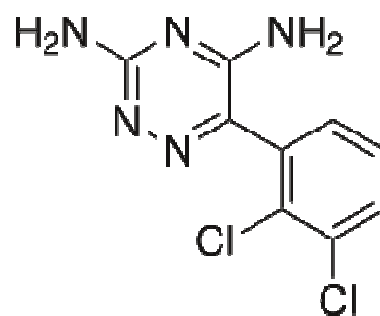
1.2.3. Inhibicija kalcijevih kanalov

Spojine, ki so učinkovite proti absencam (valproat, klonazepam, etosuksimid), delujejo zaviralno na T-tip napetostno odvisnih kalcijevih kanalov. Ti so pomembni pri določanju ritmične aktivnosti nevronov talamusa, ki sodelujejo ob napadih (1).

Med predstavnike 1. generacije PEZ spadajo fenitoin, karbamazepin, valproat, etosuksimid in fenobarbital. Uporaba le-teh se opušta, saj so v zadnjem času razvili več novih PEZ, ki imajo manj neželenih učinkov in tvorijo manj interakcij z drugimi zdravili. V 2. generacijo PEZ tako uvrščamo vigabatrin, gabapentin, lamotrigin, felbamat, tiagabin, topiramat, levetiracetam in zonisamid (1).

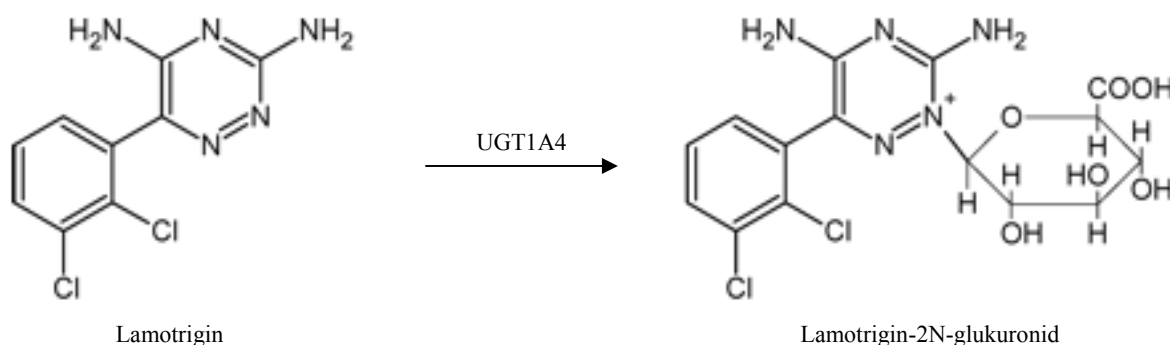
1.3. Lamotrigin

Lamotrigin, [3,5-diamino-6-(2,3-diklorofenil)-1,2,4-triazin], je novejša protiepileptična učinkovina z molekulsko maso 256.091 g/mol. Uporablja se v monoterapiji žariščnih epileptičnih napadov s sekundarno generalizacijo ali brez nje, lahko pa se uporablja tudi kot dodatno zdravilo. Njegovo delovanje temelji na stabilizaciji presinaptične membrane preko zaviralnega učinka na napetostno odvisne natrijeve kanale ter inhibiciji sproščanja glutamata in aspartata (6, 9).



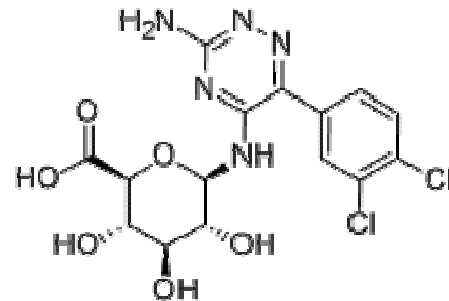
Slika 1: Lamotrigin

Lamotrigin je lipofilna šibka baza in se po peroralni aplikaciji dobro absorbira. Metabolizira se v jetih z glukuronidacijo z uridin 5'-difosfat-glukuronozil transferazo (UGT1A4), ki se nahaja v endoplazemskih retikulumih. Aktivni del encima je usmerjen v lumen.



Slika 2: Sinteza lamotrigin-2-N-glukuronida

Glavni metabolit predstavlja neaktivni lamotrigin-2-N-glukuronid, nastajajo pa tudi drugi, npr. lamotrigin-5-N-glukuronid, 2-N-metil-lamotrigin in lamotrigin-2-N-oksidi, vendar ti nastopajo v zelo nizkih koncentracijah ($< 0,6\%$ od začetnega odmerka). Dnevni odmerek učinkovine je med 25 in 400 mg, odvisno od sočasno uporabljenih zdravil. Lahko pa naraste tudi do 700 mg, če ni sočasno apliciran tudi natrijev valproat. Terapevtsko območje se giblje med 1 in 15 $\mu\text{g/ml}$, odvisno od posameznika (6, 7, 10).



Slika 3: Lamotrigin-5-N-glukuronid

Absorpcija je hitra in linearno odvisna od odmerka, najvišje plazemske koncentracije doseže v 3 urah po peroralni administraciji. Na serumske proteine se veže 56 % spojine. Razpolovni čas lamotrigina pri monoterapiji se giblje med 22,8 in 37,4 h. Antiepileptiki, ki spodbujajo jetrne encime (fenitoin, fenobarbital, karbamazepin), znižajo razpolovni čas lamotrigina na 13,5–15 h. Sočasna uporaba valprojske kisline zniža obseg metabolizma lamotrigina, posledično pa se njegov razpolovni čas poveča na 48,3–59 h. Spojina ne vpliva na plazemske koncentracije sočasno uporabljenih protiepileptičnih zdravil, poveča se edino koncentracija karbamazepin-10,11-epoksida, ki je glavni metabolit karbamazepina. Ob hkratnem jemanju nekaterih oralnih kontraceptivov, ki spodbujajo delovanje UGT, se plazemske koncentracije lamotrigina znižajo (7, 8, 9).

Lamotrigin se čedalje več uporablja tudi pri nosečnicah z epilepsijo, čeprav je malo znanega o farmakokinetičnih karakteristikah spojine med nosečnostjo. Skozi placento prehaja hitro in neovirano, zato lahko sklepamo, da materina terapija vpliva tudi na plod. Plazemske koncentracije novorojenca so 48 h po porodu enake materinim ob porodu. Proces glukuronidacije pri novorojencih še ni optimalno razvit, zato je tudi eliminacija lamotrigina upočasnjena. Očistek lamotrigina se med nosečnostjo zviša za 330 % in več, kar naj bi bilo predvsem posledica povečane metabolične aktivnosti v jetrih. Po porodu se stanje hitro zopet normalizira. Zato je smiselno spremljanje koncentracij pred, med in po nosečnosti, da je nivo tveganja za plod čim nižji in preprečevanje napadov uspešnejše (6, 11, 12).

Stranski učinki lamotrigina se največkrat izražajo v obliki omotičnosti, ataksije, somnolence, glavobolov, slabosti, bruhanju, zamegljenem vidu in kožnih izpuščajih. Pojavnost slednjih lahko značilno poveča sočasna uporaba valproata (7).

1.4. Metode za določanje lamotrigina in njegovih metabolitov v bioloških vzorcih

Ob enakih odmerkih prihaja med posameznimi pacienti do velikih razlik v plazemskih koncentracijah lamotrigina. Najpogostejši vzrok je sočasna uporaba ostalih protiepileptičnih zdravil in farmakokinetične interakcije, ki se tvorijo med njimi. Pojavljajo se vedno nove študije, ki preučujejo povezavo med koncentracijo in učinkom spojine ter vpliv ostalih sočasno uporabljenih zdravil na farmakokinetiko lamotrigina. Za to so potrebne občutljive in specifične metode, ki hkrati omogočajo tudi kvantitativno ovrednotenje analitov (13).

Imunološke metode so hitre, enostavne, specifične in občutljive, vendar ne omogočajo analiz več substanc hkrati, z reagenti pa lahko reagirajo tudi metaboliti. Produkt nastaja *in vitro* po reakciji med tarčno spojino in proti njej usmerjenim specifičnim protitelesom. Kvantifikacija je možna na več načinov, npr. z merjenjem fluorescence, če je protitelo označeno s fluorokromom. Poznamo polarizacijsko imunofluorescenčno metodo (FPIA), kemiluminiscentno imunološko metodo z uporabo mikrodlecev (CMIA), imunoturbidimetrično metodo ali kvantitativni mikrosferični sistem (QMS) in druge.

Najpogosteje uporabljena separacijska metoda je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Slabosti metode so zahtevna priprava vzorcev, relativno veliki volumni vzorcev in nizka uspešnost ekstrakcije (recovery) (6, 14, 15, 23).

Martinavarro-Dominguez in sodelavci so uporabili metodo micelarne tekočinske kromatografije (MLC), ki spada med RF-HPLC metode. Plazemske vzorce so injicirali direktno, brez predhodne obdelave. Mobilna faza je bila sestavljena iz surfaktanta (npr. natrijev dodecilsulfat – SDS) v koncentraciji nad kritično micelarno koncentracijo. Pomembna prednost MLC je zmožnost določanja analitov v fizioloških vzorcih brez predhodne ločbe proteinov, ki so prisotni v vzorcih. SDS miceli kompetitivno vežejo proteine in tako sprostijo na proteine vezane spojine. V primerjavi z drugimi so micelarne mobilne faze manj gorljive,

cenejše, biorazgradljive, niso toksične in lahko raztapljajo tako hidrofozne kot hidrofilne analite (19).

Soons in sodelavci pa so razvili metodo za določevanje lamotrigina v vzorcih posušene krvi (dried blood spots – DBS). Analizirali so običajne vzorce plazme (200 μ L) in manjše vzorce (10 μ L) ter primerjali njihove rezultate. Za DBS so uporabili papir Schleicher and Schuell (RC 55, 0,45 μ m). Lamotrigin so ekstrahirali z diklorometanom pri pH 10,4 in dodali 3% 2-propanola za optimizacijo ekstrakcije. Vzorce so nato posušili in rekonstituirali v mobilni fazi ter jih nato analizirali na HPLC sistemu. Ugotovili so, da zmanjšanje volumna vzorca za faktor 20 še zmeraj daje sprejemljivo reproducibilnost. Koncentracije lamotrigina, ki so bile določene iz DBS, so dobro korelirale s plazemskimi. Metode z DBS so v primerjavi z ostalimi zelo malo uporabljane, čeprav prinašajo določene prednosti. Vzorci so zelo majhnega volumna, zato jih pacienti lahko pridobijo kar sami in jih nato pošljejo na analizo (22).

Kombinirane metode tekočinske kromatografije (LC) z zaporedno vezanim masnim spektrometrom (MS) omogočajo hkratno določanje več spojin, vključno z metaboliti, vendar širšo uporabo v kliničnih laboratorijih omejujejo predvsem visoka cena instrumenta in tehnološke zahteve. Te metode so zelo specifične, občutljive in selektivne, prav tako ni potrebna predhodna derivatizacija.

Beck in sodelavci so razvili metodo za določevanje lamotrigina in njegovih metabolitov – lamotrigin-2-N-glukuronida, 2-N-metil lamotrigina in lamotrigin-2-N-oksida – s pomočjo ESI (ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju) in LC/MS. Proteine so oborili z acetonitrilom, kromatografsko ločbo so dosegli z gradientno elucijo na RF-sistemu, določevali pa so protonirane molekulske ione. Dosegli so mejo določljivosti 0,05 μ mol/L. Z metodo so analizirali 55 kliničnih vzorcev, ki so bili odvzeti pri pacientih, ki so se zdravili z lamotriginom. V vseh vzorcih so določili lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid, medtem ko 2-N-metil lamotrigina in lamotrigin-2-N-oksida v večini vzorcev niso zaznali (18).

Queiroz in sodelavci so uporabili metodo trdno-fazne mikroekstrakcije (SPME) s plinsko kromatografijo (GC) za določevanje lamotrigina in še nekaterih PEZ v plazmi. SPME je nova tehnika priprave vzorca in vzorčenja, ki uporablja silikonska vlakna, ki so prekrita s primerno

stacionarno fazo. Prednosti metode so eliminacija topil in majhni volumni vzorca, visoka učinkovitost in občutljivost, hitrost in možnost avtomatizacije (17).

Wyszomirska in sodelavci so s pomočjo plinske kromatografije in denzitometrije določevali lamotrigin v vzorcih mleka doječih žensk. Ekstrakcijo so izvedli z metilen kloridom iz bazične raztopine. Vzorce so nato posušili in suhi ostanek raztopili v kloroformu. Analite so detektirali s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Dosegli so mejo zaznavnosti 0,2 ng pri GC in 0,2 µg pri denzitometriji. GC je bolj občutljiva metoda, po drugi strani pa je metoda denzitometrije dosti cenejša in hitrejša in je uporabna zlasti za hitre analize večjega števila vzorcev (20).

Gupta in sodelavci so razvili metodo za določevanje nekaterih protiepileptičnih zdravil (vključno z lamotriginom) v plazmi in urinu s pomočjo ion-selektivnih membranskih elektrod. Metoda je preprosta in cenovno ugodna. Osnovo elektrode predstavlja polivinil kloridna membrana, na katero so nanесли komplekse ionskih parov učinkovina – tetrafenil borat ali učinkovina – fosfovolframova kislina. Detekcija temelji na meritvi Nernstovega potenciala, meja zaznavnosti pa doseže vrednost 10^{-7} M. Membrane so stabilne do 4 tedne, selektivnost pa je v veliki meri odvisna od uporabljenega plastifikatorja. V primerjavi s standardnimi postopki se je metoda z ion-selektivnimi elektrodami izkazala za občutljivo, zanesljivo in točno, brez zahtevne priprave vzorcev (16).

Lanças in sodelavci so s pomočjo micelarne elektrokinetične kapilarne kromatografije (MECC) razvili metodo za hkratno določevanje nekaterih PEZ v plazmi. Ločitev spojin so dosegli s spreminjanjem različnih parametrov, kot so koncentracija SDS, sestava pufra, pH, napetost, temperatura in notranji premer kapilare. Metodo so nato primerjali še s HPLC in GC. Rezultati so bili primerljivi, vseeno pa so z uporabo HPLC in GC dosegli nižje meje zaznavnosti in določljivosti ter boljšo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Prednosti MECC pa sta predvsem majhna poraba organskih topil ter dobra ločljivost (21).

1.5. Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (TDM)

TDM (Therapeutic Drug Monitoring) omogoča natančno spremljanje uporabe in delovanja zdravila z namenom določiti individualno odmerjanje zdravila, prilagojeno vsakemu pacientu posebej. Z uporabo TDM se je učinkovitost zdravljenja epilepsije povečala tako pri terapiji s starejšimi kot novejšimi PEZ.

Uporabnost TDM pride še posebej do izraza v naslednjih primerih:

- po uvedbi zdravljenja za določitev individualne terapevtske koncentracije,
- po spremembi odmerka zdravila, še posebej če gre za nelinearno farmakokinetiko,
- po neuspešni terapiji za ovrednotenje vzrokov (stranski učinki, interakcije z drugimi zdravili, sprememba farmakokinetičnih lastnosti zaradi fizioloških ali patoloških stanj, kot so nosečnost in starost, jetrna insuficienca, ledvična insuficienca, bolezni gastrointestinalnega trakta, ki vplivajo na absorpcijo...),
- kadar je ugotovljen odnos med koncentracijo zdravila in terapevtskim ali toksičnim učinkom,
- kadar učinkovina izkazuje ozko terapevtsko referenčno območje,
- kadar naj bi učinkovalo le zdravilo in ne njegovi metaboliti, razen če te tudi merimo,
- kadar naj bi bila koncentracija nevezanega zdravila v krvi enaka koncentraciji v možganih,
- kadar naj bi zdravilo delovalo reverzibilno brez razvoja tolerance (24, 27).

Koncentracije PEZ se najpogosteje določajo v plazmi ali serumu, lahko pa tudi v polni krvi, cerebrospinalni tekočini, solzah, slini in tkivih. S TDM spremljamo tudi koncentracije metabolitov. Metoda je uporabnejša pri zdravilih, ki izkazujejo dobro korelacijo med njihovo koncentracijo in učinkom. Terapevtske koncentracije se tako določijo za vsakega pacienta posebej in so definirane v območjih, v katerih učinkovina preprečuje pojav epileptičnih napadov brez izrazitih neželenih učinkov. Referenčne koncentracije pa so definirane kot koncentracije, v katerih je zdravljenje optimalno za večino bolnikov. Določene so s spodnjo mejo, pod katero je terapevtski učinek malo verjeten, in zgornjo mejo, nad katero so zelo verjetni toksični učinki (25, 26).

Najpogostejše uporabljane metode za TDM so imunološke metode, plinska kromatografija ter HPLC z različnimi detektorji (UV, ECD, FID, MS). Iz vidika stroškovne učinkovitosti pa je pomembno, da se TDM ne uporablja ob vsaki priložnosti, ampak samo takrat, ko je to klinično pomembno (25).

Glavne prednosti TDM se kažejo v večji učinkovitosti zdravljenja epilepsije, hitrejši določitvi optimalne individualne koncentracije zdravila, manjši pojavnosti in hitrejši zaznavi stranskih učinkov zaradi predoziranja ter hitrejšem odkrivanju nezdružljivosti z drugimi zdravili (26).

1.5.1. TDM lamotrigina

Terapevtsko območje lamotrigina ni točno določeno zaradi velikih intraindividualnih razlik. Vseeno pa so ocenili srednjo koncentracijo, pri kateri se pojavnost mesečnih napadov zmanjša za najmanj 50 %. Ta naj bi bila 7,9 mg/L. Predlagali so tudi srednjo koncentracijo, pri kateri se pojavijo od odmerka odvisni neželeni učinki, in sicer 16,0 mg/L.

Zelo pomembna je souporaba ostalih PEZ, ki zavirajo ali spodbujajo jetrne encime. Pri mnogih pacientih so dosegli najboljše rezultate zdravljenja šele ob prekinitvi zdravljenja z PEZ, ki inducirajo jetrne encime. Koncentracija lamotrigina se je povečala. Nasprotno je potrebno ob uvedbi terapije z valproatom odmerke lamotrigina znižati. Glavna kriterija za določitev odmerka pa sta vseeno pojavnost napadov in neželeni učinki (28).

Zaradi velikih interindividualnih odstopanj v razmerju med odmerkom in koncentracijo, zaradi velikih vplivov sočasno uporabljenih zdravil in zaradi različnih fizioloških (nosečnost) ali patoloških stanj (jetrna insuficienca), ki vplivajo na farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti lamotrigina, uporaba TDM poveča učinkovitost in varnost zdravljenja. Še boljše klinično uporabnost TDM v največji meri omejuje pomanjkanje kakovostnih raziskav in podatkov glede korelacije med plazemskimi koncentracijami zdravila in učinkom. V nekaterih primerih pa jo omejujejo tudi pomanjkljivo poznavanje farmakokinetike in posledično tudi slabša interpretacija dobljenih rezultatov (25, 28).

2. Namen dela

V diplomski nalogi bomo razvili analizno metodo za hkratno določanje plazemskih koncentracij protiepileptične učinkovine lamotrigina in njegovega glavnega metabolita – lamotrigin-2-N-glukuronida. Z metodo bomo od ostalih komponent v plazmi ustrezno ločili tudi vrh lamotrigin-5-N-glukuronida. Pri razvoju metode si bomo pomagali z že objavljenimi metodami.

Pred razvojem metode bomo biosintetizirali lamotriginova metabolita s pomočjo človeških jetrnih mikrosomov.

Za izhodišče bomo uporabili metodo po Saracinovi, ki je objavljena v članku z naslovom »Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma« (7). Lamotrigin absorbira svetlobo v UV območju, zato bomo spojine detektirali z UV detektorjem oziroma z diodnim nizom (DAD – diode array detection).

Metodo bomo najprej razvili na vodnih vzorcih. Izbrali bomo ustrezno kolono, interni standard ter določili optimalno sestavo mobilne faze. Ta nam mora zagotavljati dobro resolucijo naših spojin ter ustrezno kratke analitske čase. Metodo bomo nato prenesli na biološke vzorce, ki jih bomo pred analizo na HPLC sistemu ustrezno očistili. Analite bomo ekstrahirali iz plazme z metanolom, nato jih bomo centrifugirali in supernatante posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku. Nato jih bomo rekonstituirali v mobilni fazi in kvantificirali s HPLC sistemom. Metodo bomo ustrezno prilagodili in optimizirali na podlagi sprememb zaradi primesi v bioloških vzorcih.

Na koncu bomo metodo validirali po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA – Food and Drug Administration). Določili bomo točnost, natančnost (znotrajdnevno in meddnevno), območje linearnosti, mejo določljivosti, postpreparativno stabilnost in uspešnost ekstrakcije (recovery). Metodo bomo tudi aplicirali na vzorce bolnikov z epilepsijo, ki prejemajo lamotrigin.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Biološki material

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

3.1.2. Standardi

Lamotrigin, $C_9H_7Cl_2N_5$; $M = 256.091$ g/mol (Sequoia Research Products Ltd., Pangbourne, Združeno kraljestvo).

Lamotrigin-2-N-glukuronid, $C_{15}H_{16}Cl_2N_5O_6$; $M = 432.22$ g/mol (Sussex Research, Ottawa, Kanada).

Kloramfenikol, $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$; $M = 323.132$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Guanabenz acetat, $C_8H_8Cl_2N_4 \cdot CH_3CO_2H$; $M = 291.14$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Metformin, $C_4H_{11}N_5$; $M = 129.16$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

3.1.3. Reagenti in topila

Metanol, CH_3OH , Chromasol V[®]; $M = 32,04$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Acetonitril, C_2H_3N , Chromasol V[®]; $M = 41,05$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Mravljična kislina, $HCOOH$; $M = 46,03$ g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Puferske raztopine pH = 2, pH = 3, pH = 4, pH = 6, pH = 7 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija).

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

Ultračista voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10 (Millipore Corp., Billerica, MA); specifična upornost 18,2 M Ω cm, total organic carbon (TOC) 5.

Kalijev dihidrogen fosfat pro analysi, KH_2PO_4 ; $M = 136,09 \text{ g/mol}$ (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Trietilamin, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$; $M = 101,19 \text{ g/mol}$ (Merck, Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Nemčija).

3.1.4. Naprave in pribor

HLADILNIK (LTH, Škofja Loka, Slovenija).

ZAMRZOVALNIK $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gorenje, Velenje, Slovenija).

ZAMRZOVALNIK $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ MDF-U50V (Sanyo Electric Biomedical, Japonska).

TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica).

TEHTNICA H 54 AR (Mettler, Greifensee, Švica).

PH METER MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija).

TURBOVAP[®] LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA).

LIOFILIZATOR LIO 2000 (Kambič, Semič, Slovenija).

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

MEŠALNIK VIBROMIX 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

ULTRAZVOČNA KADIČKA SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija).

POLAVTOMATSKE PIPETE $2\text{-}20 \text{ }\mu\text{l}$, $20\text{-}200 \text{ }\mu\text{l}$ in $200\text{-}1000 \text{ }\mu\text{l}$ (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija).

PLASTIČNE EPRUVETE oziroma MIKROCENTRIFUGIRKE $1,5 \text{ ml}$ (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in $2,0 \text{ mL}$ (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija).

CELULOZNO ACETATNI FILTER $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija).

STEKLENI INVENTAR: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, viala, inserti za viala, presesalna buča, lij za presesalno bučo.

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

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

HPLC kolone:

- Gemini C6 Phenyl 110, 150 x 4,6 mm 3 μ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike),
- Chromolith Performance RP-8, 100 x 4,6 mm (Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija),
- Zorbax Eclipse XDB-C8, 4,6 x 150 (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, Združene države Amerike).
- Onyx Monolithic Semi-PREP C18, 100 x 10 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike).

HPLC predkolone:

- Gemini C18 5 μ m (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike).

LC-MS/MS SISTEM Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA).

Kolona Kinetex C18, 50 x 2.1 mm, 2.6 μ m (Phenomenex, Chesire, Velika Britanija).

3.2. Metode

Pri razvoju metode smo se soočali s številnimi parametri, s katerimi smo vplivali na končne rezultate naših analitov. Metode smo tako lahko optimirali na nivoju priprave vzorca (ekstrakcija, sušenje) in kromatografije (sestava mobilne faze – pufri z različnimi vrednostmi pH, različna razmerja med vodno in organsko fazo, izokratske in gradientne mobilne faze, različne stacionarne faze). Med razvijanjem HPLC metod smo preizkusili več različnih kolon in med njimi izbrali optimalno.

3.2.1. Biosinteza glukuronidov lamotrigina

Reagenti:

A: 25 mM uridin 5'-difosfoglukuronska kislina (UDPGA),

B: 250 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl₂, 0,125 mg/mL alameticin.

Sestava končnega inkubata:

- 8 mL zmes (571,4 µL človeških jetrnih mikrosomov, 5,71 mL reagenta B, 1,714 mL vode); to zmes smo za 15 min postavili na led, da je alameticin (sestavni del reagenta B) na mikrosomih naredil pore za prehod lamotrigina v celice. Z nižjo temperaturo smo tudi povečali stabilnost mikrosomov.
- 16,1 mL vode + 150 µL 100 mM lamotrigina v DMSO,
- 5,88 mL A.

Začetna koncentracija lamotrigina v inkubatu je bila 0,5 mM. Inkubat smo nato postavili na stresalnik in mu dodajali po 150 µL 100 mM lamotrigina v DMSO po 2, 4, 6 in 8 urah do končne koncentracije lamotrigina 2,5 mM. Po 24 h smo reakcijo ustavili z dodatkom 7,5 mL ledeno hladnega acetonitrila. To zmes smo nato pustili v zamrzovalniku 24 h pri temperaturi -20 °C, nato pa smo jo centrifugirali 20 min pri 16000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo analizirali na LC-MS/MS za potrditev prisotnosti glukuronida, nato smo ga očistili na preparativni HPLC.

Za čiščenje smo uporabili sledečo metodo:

- kolona: Onyx Monolithic Semi-PREP C18 100 x 10 mm,
- predkolona: Monolithic C18,
- gradientna mobilna faza, sestavljena iz vode in metanola:

t (min)	Delež metanola (%)	Pretok (mL/min)
0	10	4
5,4	50	4
5,5	80	5
6,8	80	5
6,9	10	5

- volumen injiciranja: 800 μ L,
- nastavitev valovne dolžine detektorja: 220 nm,
- čas analize: 7,5 min.

Glukuronid se je eluiral ob času 4,3 min, zato smo zbirali frakcijo med 3,3 in 4,7 min. Zbrani frakciji smo nato z rotacijskim uparjevalnikom odstranili organski del topila. Sledila je liofilizacija vodnega vzorca. Vzorec smo sušili 12 h pri temperaturi -20 °C in tlaku 0,001 mbar. Uporabili smo liofilizator LIO 2000. Suhi liofilizat smo nato raztopili v 2 mL raztopine metanola in vode v volumskem razmerju 60:40 ter ga analizirali na LC-MS/MS sistemu. Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 (50 x 2.1 mm, velikost delcev 5 μ m). MF je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline in acetonitrila. Obe topili smo pred analizo razplinjevali v ultrazvočni kadički.

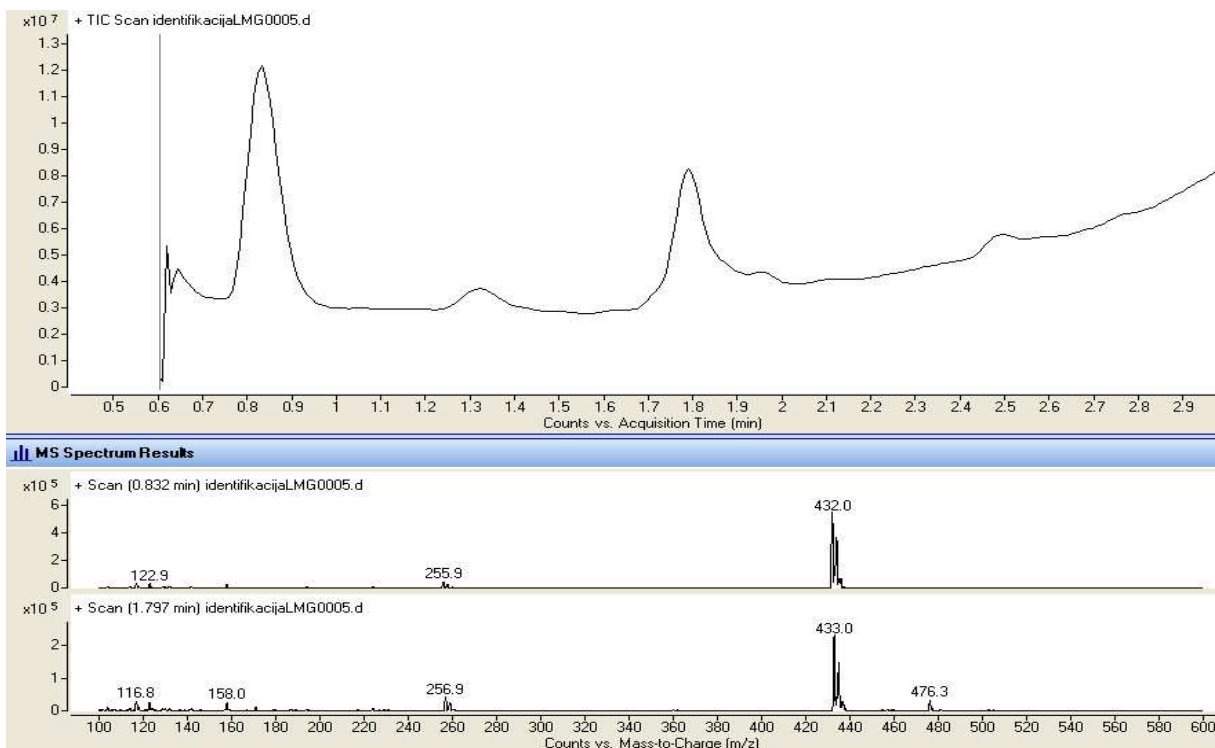
Uporabili smo sledečo metodo:

- gradientna mobilna faza:

t (min)	Delež acetonitrila (%)
0	30
2	50
2,05	30

- volumen injiciranja: 5 μ L,
- pretok mobilne faze: 0,5 mL/min.

Kot masni analizator smo uporabili sistem Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju oziroma elektrorazprševalno ionizacijo – ESI. Slika 4 prikazuje masni spekter liofilizata.



Slika 4: Masni spekter liofilizata za potrditev prisotnosti glukuronida.

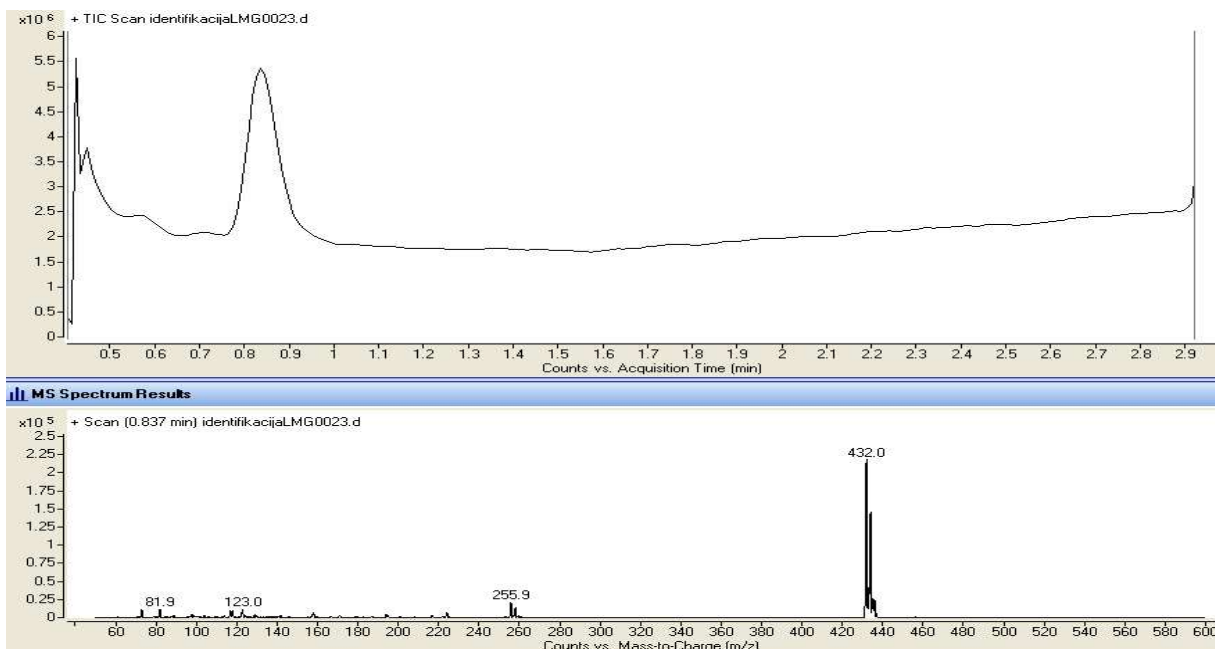
Dobili smo odziva z molekulskima masama 432 in 433, ki ustrezata lamotrigin-2-N-glukuronidu in lamotrigin-5-N-glukuronidu. Tvorila sta se torej dva različna glukuronida.

Glukuronida smo ločili na analitski koloni Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150, eluirala pa sta se ob časih 3,9 in 6,0 min. Zbirali smo frakciji med 3,5 in 4,3 min ter med 5,6 in 6,4 min.

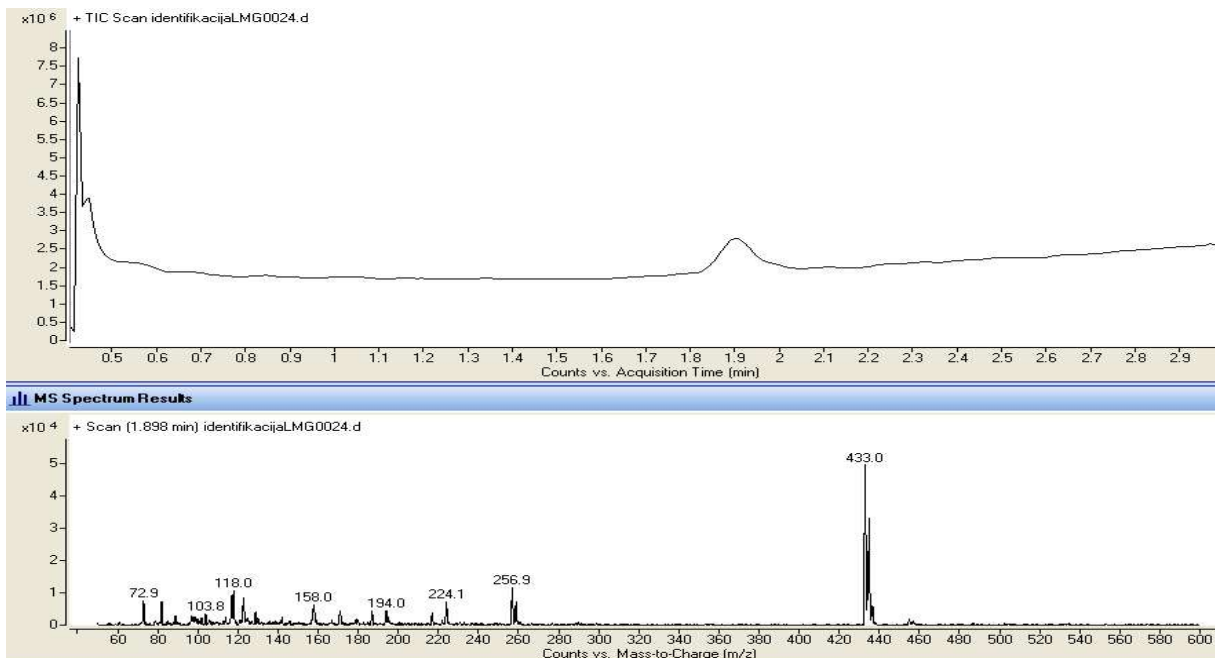
Uporabili smo naslednjo metodo:

- izokratska mobilna faza:
 - 75 % vodni del: 25 mM fosfatni pufer, pH = 3,5,
 - 25 % organski del: metanol,
- volumen injiciranja: 10 µL,
- pretok mobilne faze: 1,0 mL/min,
- nastavitev valovne dolžine detektorja: 220 nm,
- čas analize: 7,0 min.

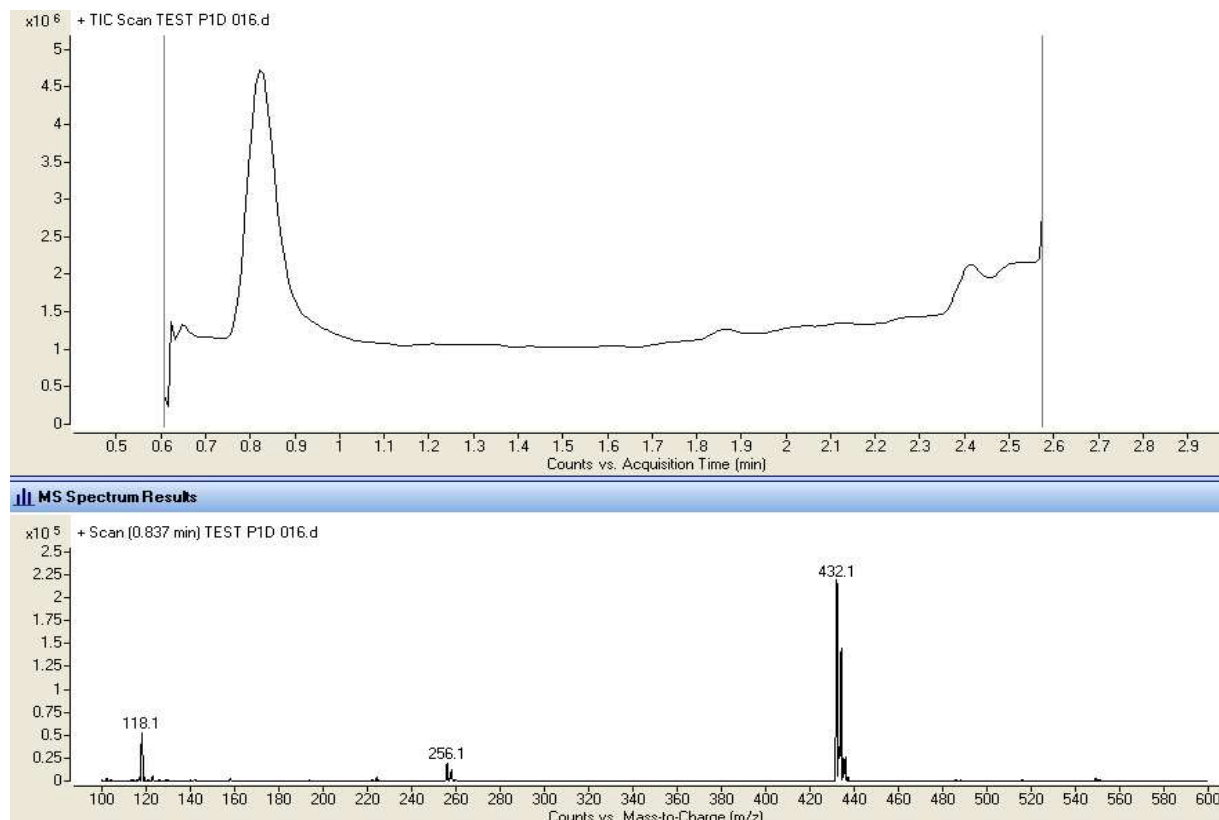
Posamezni frakciji smo zbrali v viali in ju shranili v hladilniku pri 4 °C. Ločena glukuronida smo nato analizirali na LC-MS/MS sistemu. Sliki 5 in 6 prikazujeta masna spektra lamotrigin-2-N in 5-N-glukuronida iz liofilizata. Slika 7 prikazuje masni spekter standarda za lamotrigin-2-N-glukuronid.



Slika 5: Masni spekter lamotrigin-2-N-glukuronida iz liofilizata (vrh pri 432,0).



Slika 6: Masni spekter lamotrigin-5-N-glukuronida iz liofilizata (vrh pri 433,0).



Slika 7: Masni spekter standarda lamotrigin-2-N-glukuronida (vrh pri 432,1).

3.2.2. Priprava osnovnih raztopin za razvoj metode

Osnovno raztopino lamotrigina smo pripravili v 2 mL mikrocentrifugirki. Približno 1 mg učinkovine smo najprej zatehtali v mikrocentrifugirki in jo raztopili v ustreznem volumnu metanola do končne koncentracije 1 mg/mL. Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Osnovno raztopino glukuronida smo pripravili tako, da smo suhi liofilizat, ki smo ga biosintetizirali, raztopili v 2 mL zmesi metanola in vode v volumskem razmerju 60:40. Raztopino smo hranili v zamrzovalniku pri -80 °C. Osnovne raztopine internih standardov smo pripravili tako, da smo posamezne spojine zatehtali v 2 mL mikrocentrifugirke in jih raztopili v ustreznih topilih do končnih koncentracij 1 mg/mL. Hranili smo jih v hladilniku pri 4 °C.

3.2.3. Priprava pufrov

Uporabljali smo fosfatne pufre pri pH 3,5, 6,0, 7,0, 2,5 in 3,0. Preizkusili smo tudi pufre z dodatkom 0,17 % trietilamina pri pH 3,5, 6,0 in 7,0.

Za pripravo 25 mM fosfatnih pufrov pri vrednostih pH 3,5, 3,0 in 2,5 smo na tehtič zatehtali 1,627 g KH_2PO_4 . To maso smo nato kvantitativno prenesli v 500 mL merilno bučko in jo z vodo dopolnili do oznake. Nato smo vsebino bučke prelili v čašo in s pomočjo pH metra, ki smo ga predhodno umerili s standardnimi puferskimi raztopinami, našo raztopino titrirali z ortofosforno kislino do zelenega pH. Za pripravo pufrov s pH 6,0 in 7,0 smo zatehtali 1,627 g KH_2PO_4 , ga raztopili z vodo v 500 mL bučki do oznake in dodali 0,17 % TEA (850 μL). Nato smo pH meter umerili med 6,0 in 7,0 in z ortofosforno kislino nakisali pufer do pH 7,0 oziroma 6,0.

3.2.4. Priprava plazemskih vzorcev za razvoj metode

Plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 165 μL plazme dodali 20 μL razredčene osnovne raztopine lamotrigina, 15 μL razredčene osnovne raztopine liofilizata glukuronida ter 20 μL razredčene osnovne raztopine internega standarda. Raztopino smo nato mešali 15 s na mešalu na ekscenter. Nato smo odvzeli alikvot 200 μL in mu dodali 600 μL ohlajenega metanola ter ponovno mešali na mešalu na ekscenter 1 minuto. Vzorce smo nato pustili v zamrzovalniku na -70°C . Preizkusili smo različne čase obarjanja, in sicer po 0, 1, 3, 6 in 24 urah. Nato smo vzorce centrifugirali pri 16000 obratih/min na temperaturi 5°C . Preizkusili smo tudi vpliv centrifugiranja s časi centrifugiranja 10, 15 in 20 min. Nato smo odvzeli 600 μL supernatanta ter ga posušili v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Postopek sušenja prikazuje preglednica II. Suhi ostanek smo nato rekonstituirali v 100 μL mobilne faze.

Preglednica II: Postopek sušenja plazemskih vzorcev

Čas sušenja	Tlak N_2	
10 min	1,5 psi	10,3 kPa
10 min	2,5 psi	17,2 kPa
10 min	3,5 psi	24,1 kPa
15 min	4,5 psi	31,0 kPa

3.2.5. Izbira internega standarda

Izbirali smo med naslednjimi internimi standardi:

- guanabenz acetat,
- metformin,
- kloramfenikol,
- nortriptilin,
- melatonin,
- citalopram,
- BW725C78 (3,5-diamino-6-(2-metoksifenil)-1,2,4-triazin).

Interni standard smo izbirali po naslednjih kriterijih:

- dobra ločba z vrhovi naših analitov in komponentami plazme,
- ustrezen retencijski čas, ki bi čim manj oziroma sploh ne bi vplival na analizni čas,
- dostopnost.

Tu smo uporabili gradientno metodo, mobilno fazo pa smo imeli na začetku sestavljeno iz 75 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,5 in 25 % metanola. Odstotek organske faze smo v času 4,1 min povečali na 45 % in ga vrnili na začetno vrednost v času 7,6 min. Pretok mobilne faze je znašal 1,0 mL/min, temperatura termostata kolone je bila 30 °C, analizni čas pa je znašal 11 min.

3.2.6. Razvoj kromatografije

Izbira kolone

Pri razvoju metode smo preizkusili tri različne kolone:

- Gemini C6 Phenyl 110 150 x 4,6 mm 3 μ ,
- Chromolith Performance RP-8 100 x 4,6 mm,
- Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150.

Pri izbiri kolone smo upoštevali njen vpliv na dolžine analiznih časov ter na resolucijo vrhov preiskovanih analitov, internega standarda in komponent v plazmi.

Razvoj optimalne mobilne faze

Kot vodni del mobilne faze smo uporabili fosfatni pufer pri različnih vrednostih pH in dveh puferskih močeh. Preizkusili smo tudi različne pufre z dodatkom 0,17 % TEA. Lastnosti preizkušenih pufrov prikazuje preglednica III.

Preglednica III: Preizkušeni fosfatni pufri

Moč pufra	pH pufra	Dodatek 0,17 % TEA
25 mM	3,5; 3,0; 2,5	ne
25 mM	3,5	da
0,45 mM	3,5; 6,0; 7,0	da

Kot organski del smo v vseh primerih uporabili metanol. Spreminjali smo razmerje med organsko in vodno fazo ter preizkusili različne izokratske (deleža vodne in organske faze sta ves čas analize enaka) in gradientne mobilne faze (v določenem času spremenimo delež organske faze). Izokratske metode smo preizkusili v 20–40 % območju organske faze, gradientne pa v območju 21–48 % ob različnih časih.

Izbira pretoka mobilne faze

Preizkusili smo pretoke mobilne faze 1,0; 1,2; 1,4 in 1,6 mL/min.

Izbira optimalne temperature termostata kolone

Preizkusili smo temperature kolone 30, 40, 45 in 50 °C.

Izbira optimalnih nastavitev DAD detektorja

S pomočjo DAD detektorja smo hkrati snemali spektre pri valovnih dolžinah 220, 240, 250, 260 in 270 nm.

3.2.7. Kvantifikacija lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu

Koncentracijo lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu smo določili s pomočjo umeritvene premice, ki smo jo izračunali iz odzivov standardnih vodnih raztopin lamotrigin-2-N-glukuronida različnih koncentracij. Koncentracije standardnih vodnih raztopin lamotrigin-2-N-glukuronida in njihovo pripravo prikazuje preglednica IV.

Osnovno raztopino lamotrigin-2-N-glukuronida (OR) s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo 1,4 mg standarda raztopili v 1,4 mL raztopine metanola in vode v volumskem razmerju 60:40. Nato smo iz te raztopine pripravili dve redčitvi (R1 in R2), ki smo ju uporabili za pripravo standardnih vodnih raztopin.

Preglednica IV: Priprava raztopin za umeritveno premico za lamotrigin-2-N-glukuronid

Priprava redčenih raztopin R1 in R2		
Raztopina	Koncentracija (µg/mL)	Sestava vol/vol (µL)
R1	50	12,5 OR + 237,5 MF
R2	5	25 R1 + 225 MF
Standardne raztopine lamotrigin-2-N-glukuronida za umeritveno premico		
Koncentracija (µg/mL)	Volumen R1/R2 (µL)	Volumen MF (µL)
0	0	100
0,1	10 R2	490
0,25	10 R2	190
0,5	20 R2	180
1	20 R2	80
2,5	50 R2	50
5	20 R1	180
10	20 R1	80
15	30 R1	70
20	40 R1	60
40	80 R1	20

Nato smo analizirali še vzorec liofilizata, ki smo ga 10-krat razredčili z mobilno fazo. Iz enačbe premice smo nato izračunali koncentracijo lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu.

3.3. Validacija metode

V predkliničnih in kliničnih študijah učinkovin in njihovih metabolitov so selektivne in občutljive metode za kvantitativno ovrednotenje ključnega pomena. Validacija bioanaliznih metod je dokumentiran postopek dokazovanja, ki z veliko stopnjo zaupanja zagotavlja, da metoda daje točne in ponovljive rezultate. Z validacijo potrjujemo zanesljivost in ustreznost metode v danih pogojih.

Osnovni parametri validacijskega postopka so točnost, natančnost (ponovljivost), selektivnost, občutljivost, reproducibilnost in robustnost metode. Mi smo ovrednotili naslednje parametre: točnost, ponovljivost, linearnost, mejo določljivosti (LOQ), postpreparativno stabilnost in uspešnost ekstrakcije (recovery).

Validacijo smo izvedli na podlagi FDA standardov za validacijo bioanaliznih metod (29).

3.3.1. Priprava standardnih vodnih raztopin in standardnih plazemskih vzorcev za validacijo

V mikrocentrifugirkah smo najprej pripravili osnovne raztopine (OR) lamotrigina, liofilizata glukuronidov ter internega standarda. Vsako raztopino smo nato še ustrezno redčili (R1, R2, R3 raztopine). Za postopek validacije smo iz redčenih osnovnih raztopin pripravili standardne plazemske vzorce z 9 različnimi koncentracijami in slepi vzorec. Te smo uporabili kot kalibratorje za umeritveno premico. Pripravili smo še 3 kontrolne vzorce (Qc) v nizkem (QcL – trikratna vrednost LOQ), srednjem (QcM) in visokem (QcH) koncentracijskem območju. Za vsako koncentracijo Qc smo pripravili in analizirali 5 paralel, skupno torej 15 vzorcev za kontrolo kakovosti. Preglednica V prikazuje pripravo osnovnih raztopin in njihovih redčitev, preglednica VI pripravo standardnih raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno premico, preglednica VII pa pripravo Qc.

Preglednica V: Priprava osnovnih raztopin in njihovih redčenj

Lamotrigin (OR = 1 mg/mL)			
Raztopina	Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
R1	250	75 OR	225

R2	25	25 R1	225
R3	5	50 R2	200
Liofilizat (OR = 173 µg/mL)			
R1	55	63,6 OR	136,4
R2	5,5	20 R1	180
Interni standard (kloramfenikol, OR = 1 mg/mL)			
R1	100	110 OR	990

Preglednica VI: Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico

Lamotrigin (OR = 1 mg/mL)		
Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
0,825	9,9 R3	50,1
2,063	24,75 R3	35,25
4,125	9,9 R2	50,1
8,25	19,8 R2	40,2
20,625	49,5 R2	10,5
41,25	9,9 R1	50,1
82,5	19,8 R1	40,2
123,75	29,7 R1	30,3
165	39,6 R1	20,4
Liofilizat (OR = 173 µg/mL)		
Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
1,1	12 R2	48
2,75	30 R2	30
5,5	20 R1	180
11	12 R1	48
27,5	30 R1	30

55	19,1 OR	40,9
110	57,2 OR	32,8
137,5	71,5 OR	18,5
165	286,1 OR	13,9

Preglednica VII: Priprava kontrolnih vzorcev

Lamotrigin (OR = 1 mg/mL)			
Standard	Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
QcL	2,475	59,4 R3	60,6
QcM	41,25	19,8 R1	100,2
QcH	148,5	71,28 R1	48,72
Liofilizat (OR = 173 µg/mL)			
QcL	3,3	54 R3	36
QcM	55	28,6 OR	61,4
QcH	132	68,7 OR	21,3

Plazemske vzorce smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.4. Preglednica VIII prikazuje končne koncentracije naših analitov v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico in plazemskih vzorcih za kontrolo kakovosti.

Preglednica VIII: Končne koncentracije analitov v plazemskih vzorcih

Vzorec	Koncentracija lamotrigina (µg/mL)	Koncentracija liofilizata (µg/mL)
C ₀	0	0
C ₁	0,1	0,1
C ₂	0,25	0,25
C ₃	0,5	0,5
C ₄	1	1

C ₅	2,5	2,5
C ₆	5	5
C ₇	10	10
C ₈	15	12,5
C ₉	20	15
QcL	0,3	0,3
QcM	5	5
QcH	18	12

Validacija je trajala 3 dni. Pufer, standardne raztopine in plazemske vzorce smo pripravljali vsak dan sveže. Osnovne raztopine smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.3.2. Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega območja zagotavlja odzive instrumenta, ki so neposredno ali preko definirane matematične funkcije sorazmerni s koncentracijami preiskovanih analitov v danem vzorcu. Ovrednotimo jo s statistično obdelavo odzivov standardnih vzorcev po metodi najmanjše vsote kvadratov odstopanj. Dobljena premica ima enačbo $y = k \cdot x + n$, pri čemer predstavljajo vrednosti na ordinati analitske odzive (površine kromatografskih vrhov analitov ali razmerja med površinami kromatografskih vrhov analitov in IS), vrednosti na abscisi koncentracije analitov, n odsek na ordinati in k naklon premice. Korelacijo med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom ovrednotimo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (r) oz. determinacijskim koeficientom (r^2).

Po FDA priporočilih moramo za določitev umeritvene premice in linearnosti poleg slepega vzorca uporabiti še 6–8 standardov, ki naj bi pokrivali celotno pričakovano koncentracijsko območje, vključno s spodnjo mejo določljivosti (LLOQ). Dovoljena odstopanja znašajo 15 oziroma 20 % pri LLOQ od nominalne vrednosti. Da metoda ustreza merilom FDA, mora

danim zahtevam ustrezati vsaj 75 % vzorcev, oziroma najmanj štiri od šestih, ne upoštevajoč slepi vzorec (29, 30).

3.3.3. Točnost

Točnost analizne metode je definirana kot ujemanje rezultatov, ki jih daje metoda, s pravimi vrednostmi oziroma sprejetimi referenčnimi vrednostmi. Določamo jo s kontrolnimi vzorci (Q_c) pri vsaj treh različnih koncentracijah, ki zajemajo celotno območje metode. Pri vsaki koncentraciji Q_c (Q_{cL} , Q_{cM} , Q_{cH}) moramo določiti vsaj pet meritev. Iz njihovih odzivov nato s pomočjo umeritvene premice določimo dejanske koncentracije in izračunamo povprečje petih meritev. Dobljeno vrednost primerjamo z referenčno. Razlika ne sme biti večja od 15 % oziroma 20 % pri LLOQ (29, 30).

3.3.4. Ponovljivost

Ponovljivost je sposobnost metode, da daje vedno enake rezultate za serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. Ponovljivost predstavlja natančnost znotraj metode, določujemo pa jo s kontrolnimi vzorci pri vsaj treh različnih koncentracijah, ki zajemajo celotno območje metode. Pri vsaki koncentraciji Q_c (Q_{cL} , Q_{cM} , Q_{cH}) moramo določiti vsaj pet meritev. Ponavadi jo ovrednotimo s standardnim odklikom (SD) in koeficientom variance (CV) (%). Ta znotraj petih ponovitev ne sme odstopati za več kot 15 % oziroma 20 % pri meji določljivosti. Določili smo znotrajdnevno ponovljivost in meddnevno ponovljivost za tri dni (29, 30).

3.3.5. Območje linearnosti

Območje linearnosti analizne metode predstavlja interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, ponovljivost in linearnost. Odstopanje pri najvišji koncentraciji analita ne sme biti večje od 15 %, pri najnižji koncentraciji pa ne večje od 20 % (29, 30).

3.3.6. Meja določljivosti (LOQ)

Spodnja meja določljivosti (LLOQ) je definirana kot najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z dano metodo še lahko ustrezno ovrednotimo z ustrezno točnostjo in natančnostjo pod

predpisanimi pogoji. Po FDA smernicah LLOQ predstavlja najnižja točka umeritvene premice, kadar ta izpolnjuje naslednje pogoje:

- odziv analita pri najnižji točki je vsaj 5-krat večji od odziva pri analizi slepega vzorca,
- ponovljivost analita pri najnižji koncentraciji ne sme odstopati za več kot 20 %, točnost pa mora biti med 80 in 120 % (29, 30).

3.3.7. Postpreparativna stabilnost

Drugi dan validacije smo Qc določili še postpreparativno stabilnost. Pri vsaki koncentraciji smo analizirali 3 vzorce, ki smo jih pustili v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Iste vzorce smo analizirali še po 12 h in 24 h. Nato smo primerjali odzive analitov v istih vzorcih ob različnih časih analize (0, 12 in 24 h).

3.3.8. Uspešnost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije (recovery) smo ugotavljali iz razmerja odzivov ekstrahiranega plazemskega vzorca in standardnega vodnega vzorca v enakih koncentracijah. Plazemske vzorce smo pripravili v koncentracijah Qc po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.4. Zmes standardnih vodnih vzorcev v ustreznih koncentracijah smo pripravili iz redčenih osnovnih raztopin naših analitov. Zmes 55 µL smo pripravili iz 20 µL standardne raztopine lamotrigina, 15 µL standardne raztopine liofilizata in 20 µL standardne raztopine internega standarda. Pripravo standardnih vodnih vzorcev prikazujeta preglednici IX in X. Pri vsaki koncentraciji smo analizirali 3 paralele, s čimer smo določili tudi ponovljivost. Odziv standardnih vodnih vzorcev je predstavljal 100 %.

Preglednica IX: Priprava standardov za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije

Lamotrigin (OR = 1 mg/mL)			
Raztopina	Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
R1	250	75 OR	225
R2	25	25 R1	225
R3	5	50 R2	200
Liofilizat (OR = 173 µg/mL)			

R1	110	57,2 OR	32,8
R2	5,5	20 R1	380
Kloramfenikol (OR = 1 mg/mL)			
R1	100	25 OR	225
R2	37,4	93,5 R1	156,5

Preglednica X: Priprava Qc standardov za ugotavljanje uspešnosti ekstrakcije

Lamotrigin (OR = 1 mg/mL)			
Vzorec	Koncentracija (µg/mL)	Volumen OR (µL)	Volumen MF (µL)
QcL	0,93	18,6 R3	81,4
QcM	15,47	61,9 R2	38,1
QcH	55,7	22,3 R1	77,7
Liofilizat (OR = 173 µg/mL)			
QcL	1,24	27,1 R2	92,9
QcM	20,6	22,5 R1	97,5
QcH	49,5	27 R1	33

3.3.9. Validacija redčenja

Tretji dan validacijskega postopka smo izvedli še kontrolo redčenja za 4 vzorce umeritvene premice z najvišjimi koncentracijami analitov. Vzorce smo razredčili z mobilno fazo v razmerju 1:1. Pri vsaki koncentraciji smo analizirali 3 paralele. Nato smo iz povprečnih odzivov redčenih vzorcev s pomočjo umeritvene premice določili točnost za posamezni analit. Preglednica XI prikazuje začetne in končne koncentracije analitov v vzorcih pred in po redčenju.

Preglednica XI: Začetne in končne koncentracije analitov za validacijo redčenja

Raztopina	Koncentracija lamotrigina (µg/mL)		Koncentracija lamotrigin-2-N-glukuronida (µg/mL)	
	Začetna	Končna	Začetna	Končna

R1	20	10	15	7,5
R2	15	7,5	12,5	6,25
R3	10	5	10	5
R4	5	2,5	5	2,5

3.4. Aplikacija metode na realne plazemske vzorce

Po validaciji smo z metodo analizirali še dva vzorca krvi bolnika z epilepsijo, ki se zdravi z lamotriginom. Vzorca sta vsebovala različna antikoagulantna (heparin oziroma EDTA). Pripravili smo ju tako, da smo 165 μL bolnikove plazme dodali 35 μL vode in 20 μL raztopine internega standarda s koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$. Nato smo sledili postopku, ki je opisan v poglavju 4.4.1.

4. Rezultati

4.1. Izbira internega standarda

Interni standard smo izbrali na podlagi njihove dostopnosti, dobre separacije od ostalih preiskovanih analitov in čim krajšega retencijskega časa, da nam ne bi po nepotrebem podaljševal analiznih časov. Tu smo uporabili gradientno metodo, ki je opisana v poglavju 3.2.5. Iz nabora internih standardov smo izbrali 3 spojine za analizo, in sicer metformin, kloramfenikol ter guanabenz acetat. Prvi se je eluiral skupaj z biomatriksom iz plazme ob času 2,5 min. Dobro separacijo sta dosegla guanabenz acetat in kloramfenikol. Prvi se je eluiral ob času 9,4 min, drugi pa ob času 9,6 min. Oba sta se eluirala za preiskovanimi spojinami, prav tako ni bilo prisotnih koelucij s komponentami plazme. Na koncu smo izbrali kloramfenikol zaradi nekoliko krajšega retencijskega časa.

4.2. Razvoj kromatografije

Izbira kolone

Za optimalno kolono se je izkazala kolona Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 (Agilent technologies, ZDA). Z njo smo dosegli najboljšo ločbo kromatografskih vrhov preiskovanih analitov od komponent plazme. V primerjavi z drugima preizkušenima kolonama so bili optimalni tako retencijski časi preiskovanih analitov kot tudi celoten čas analize.

Razvoj optimalne mobilne faze

Preizkusili smo veliko različnih izokratskih in gradientnih mobilnih faz, ki so opisane v poglavju 3.2.6. Začeli smo z izokratskimi, nadaljevali pa z gradientnimi mobilnimi fazami, predvsem zaradi daljših retencijskih časov lamotrigina in internega standarda. Na koncu se je za optimalno vseeno izkazala naslednja izokratska metoda:

- vodni del v 76 %: 25 mM fosfatni pufer, pH = 2,5,
- organski del v 24 %: metanol.

Izbira pretoka mobilne faze

Za optimalnega smo izbrali pretok 1,6 mL/min, saj smo s tem pretokom dosegli ustrezno ločbo kromatografskih vrhov preiskovanih analitov od komponent plazme in relativno kratek čas analize 10,5 min.

Izbira optimalne temperature termostata kolone

Za optimalno temperaturo termostata kolone smo izbrali 50 °C, saj smo pri tej temperaturi dosegli ustrezno ločbo kromatografskih vrhov preiskovanih analitov od komponent plazme in relativno kratek čas analize 10,5 min.

4.3. Kvantifikacija lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu

Umeritveno premico za lamotrigin-2-N-glukuronid smo izračunali iz odzivov 10 vzorcev vodnih standardov z naraščajočimi koncentracijami in slepega vzorca. Postopek priprave standardov je opisan v poglavju 3.2.7. Dobljena premica ima enačbo $y = 28,722 x + 0,4377$. Iz odziva vzorca liofilizata, ki je znašal 497,3 enote, smo izračunali koncentracijo lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu. Pri tem smo upoštevali 10-kratno redčitev vzorca liofilizata. Preglednica XII prikazuje odzive vzorcev vodnih standardov in liofilizata ter izračun koncentracije lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu.

Preglednica XII: Odzivi vodnih standardov in izračun koncentracije lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu

Vzorec	Koncentracija (µg/mL)	Odziv (površina pod vrhom)
St1	0,1	3,1
St2	0,25	7
St3	0,5	14,6
St4	1	28,5
St5	2,5	71,1
St6	5	135,1
St7	10	297,1
St8	15	439,5
St9	20	572,4

St10	40	1146,3
Liofilizat (redčitev 1/10)		497,3
Izračun koncentracije lamotrigin-2-N-glukuronida v liofilizatu		
$y = 28,722 x + 0,4377; r^2 = 0,9998 \rightarrow x = (497,3 - 0,4377) / 28,722 \times 10 = 173 \mu\text{g/mL}$		

4.4. Končna optimizirana metoda

4.4.1. Priprava plazemskega vzorca

165 μL plazme dodamo 20 μL razredčene osnovne raztopine lamotrigina, 15 μL razredčene osnovne raztopine liofilizata glukuronida ter 20 μL razredčene osnovne raztopine internega standarda s koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$. Raztopino nato mešamo 15 s na mešalu na ekscenter. Odvzamemo alikvot 200 μL in mu dodamo 600 μL ohlajenega metanola ter ponovno mešamo na mešalu na ekscenter 1 minuto. Vzorce nato centrifugiramo 10 min pri 16000 g na temperaturi 5 °C. 600 μL supernatanta posušimo v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Suhi ostanek nato rekonstituiramo v 100 μL mobilne faze. Končni produkt mešamo na mešalu na ekscenter 15 s in polnimo v inserte za vial. Vzorec je pripravljen za analizo na HPLC-ju.

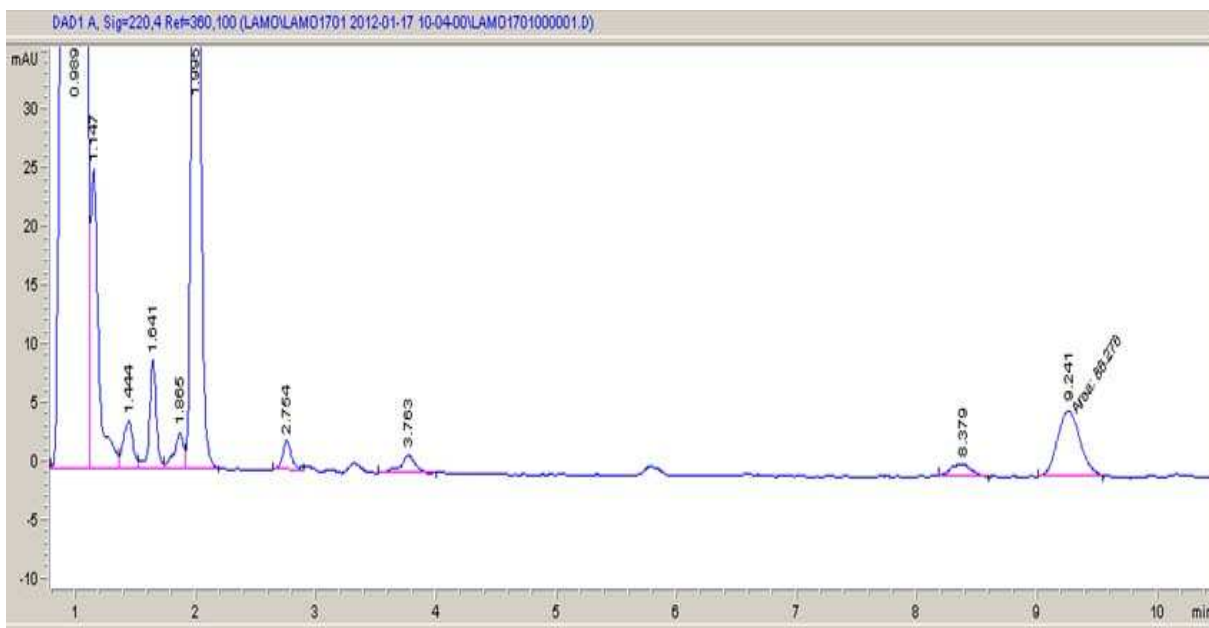
4.4.2. Kromatografija

- Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 (Agilent technologies, ZDA),
- izokratska mobilna faza:
 - 76 % vodni del: 25 mM fosfatni pufer, pH = 2,5,
 - 24 % organski del: metanol,
- volumen injiciranja: 10 μL ,
- pretok mobilne faze: 1,6 mL/min,
- temperatura termostata kolone: 50 °C,
- nastavitve DAD detektorja: 220 nm,
- interni standard: kloramfenikol,
- čas analize: 10,5 min.

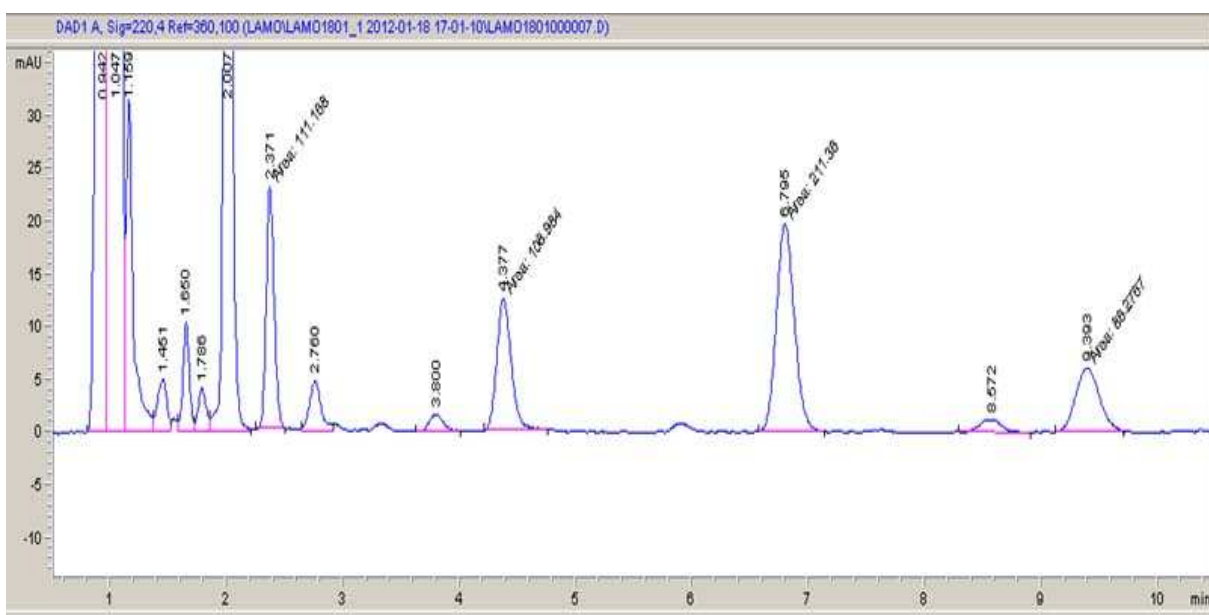
S končno optimizirano metodo smo uspešno ločili kromatografske vrhove naših analitov od vrhov komponent plazme v relativno kratkem analiznem času 10,5 min. Retencijski časi posameznih spojin so prikazani v preglednici XIII. Sliki 8 in 9 prikazujeta kromatograma slepega plazemskega vzorca in plazemskega vzorca z lamotriginom in glukuronidom v koncentraciji 5 µg/mL.

Preglednica XIII: Retencijski časi preiskovanih analitov in internega standarda

Spojina	Retencijski čas (min)
Lamotrigin-2-N-glukuronid	2,37
Lamotrigin-5-N-glukuronid	4,38
Lamotrigin	6,8
Kloramfenikol (IS)	9,39



Slika 8: Kromatogram slepega plazemskega vzorca, vrh pri času 9,24 pripada IS.



Slika 9: Kromatogram plazemskega vzorca s preiskovanimi analiti: vrh pri času 2,37 pripada lamotrigin-2-N-glukuronidu, vrh pri 4,38 lamotrigin-5-N-glukuronidu, vrh pri 6,8 lamotriginu in vrh pri 9,39 internemu standardu.

4.5. Validacija metode

Metodo smo validirali 3 dni po postopkih, ki so opisani v poglavju 3.3. Kontrolne vzorce in vzorce za umeritveno premico smo pripravljali dnevno sveže. Rezultati so prikazani z in brez upoštevanja internega standarda.

4.5.1. Linearnost

Za določitev linearnosti smo vsak dan validacijskega postopka izračunali umeritveno premico za posamezni analit. Iz enačbe premice smo iz odzivov analitov izračunali teoretične vrednosti koncentracij in jih primerjali z dejanskimi. Rezultate smo podali z in brez upoštevanja internega standarda.

Lamotrigin

Preglednica XIV prikazuje odzive lamotrigina in internega standarda za standardne plazemske vzorce, ki smo jih uporabili za umeritveno premico za posamezni dan validacijskega postopka. Pri določanju umeritvene premice nismo upoštevali odebeljenih vrednosti.

Preglednica XIV: Odzivi lamotrigina in IS v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	lamotrigin	IS	lamotrigin	IS	lamotrigin	IS
0	0	94,4	0	98	0	83,9
0,1	6,1	94,8	7,8	91,6	5,6	65,1
0,25	12,6	94,4	15,1	96,1	14	88
0,5	25,7	98,8	23,4	92,3	21,5	76,5
1	45,1	95,2	48,1	92,2	45,7	82,6
2,5	120	95,6	115,6	95	110,2	87,9
5	224,8	98	210,5	92,7	214,4	85,2
10	432	90,4	454,7	92,6	408,7	73,4
15	762,4	98,4	683	92,2	658,1	81,6
20	1013,4	94,8	891,9	92,9	819,5	79,9

Preglednica XV prikazuje enačbe umeritvenih premic za lamotrigin z in brez upoštevanja internega standarda ter vrednosti determinacijskih koeficientov (r^2).

Preglednica XV: Enačbe umeritvenih premic in vrednosti determinacijskih koeficientov za lamotrigin

Validacijski dan	Brez upoštevanja IS	Z upoštevanjem IS
1.	$y = 43,3x + 3,65$ $r^2 = 0,9992$	$y = 0,474x + 0,0113$ $r^2 = 0,9994$
2.	$y = 44,8x + 3,11$ $r^2 = 0,9998$	$y = 0,484x + 0,0305$ $r^2 = 0,9997$
3.	$y = 41,7x + 3,18$ $r^2 = 0,9983$	$y = 0,524x + 0,0276$ $r^2 = 0,9983$

Preglednica XVI prikazuje točnost umeritvene premice za lamotrigin z in brez upoštevanja internega standarda.

Preglednica XVI: Točnosti odzivov lamotrigina, izračunane iz umeritvene premice

c (µg/mL)	Točnost (v %)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	Brez IS	Z IS	Brez IS	Z IS	Brez IS	Z IS
0	-	-	-	-	-	-
0,1	56,5	111,9	104,6	113,0	58,0	111,6
0,25	82,7	103,1	107,0	104,7	103,8	100,5
0,5	101,9	105,0	90,5	92,2	87,9	96,8
1	95,8	97,6	100,4	101,5	102,0	100,4
2,5	107,6	105,0	100,4	98,1	102,7	93,7
5	102,2	96,3	-	-	101,3	95,0
10	99,0	100,6	100,8	100,9	97,3	105,8
15	-	-	101,1	101,6	104,7	102,3
20	-	-	99,2	98,9	97,9	97,7

Lamotrigin-2-N-glukuronid

Preglednica XVII prikazuje odzive lamotrigin-2-N-glukuronida in internega standarda za standardne plazemske vzorce, ki smo jih uporabili za umeritveno premico za posamezni dan validacijskega postopka. Pri določanju umeritvene premice nismo upoštevali odebeljenih vrednosti.

Preglednica XVII: Odzivi lamotrigin-2-N-glukuronida in IS v standardnih plazemskih vzorcih za umeritveno premico

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	Lamo-2-N-glukuronid	IS	Lamo-2-N-glukuronid	IS	Lamo-2-N-glukuronid	IS
0	0	94,4	0	98	0	83,9
0,1	2,5	94,8	2,5	91,6	2,4	65,1
0,25	5,6	94,4	7,3	96,1	6,7	88
0,5	13,5	98,8	12,5	92,3	13	76,5
1	21,3	95,2	23,1	92,2	25,7	82,6
2,5	61,9	95,6	61,1	95	61,9	87,9
5	117,9	98	113,6	92,7	114,8	85,2
10	208	90,4	240,9	92,6	230,8	73,4
12,5	301,3	98,4	289,3	92,2	302,1	81,6
15	367,6	94,8	329,6	92,9	342,2	79,9

Preglednica XVIII prikazuje enačbe umeritvenih premic za lamotrigin-2-N-glukuronid z in brez upoštevanja internega standarda ter vrednosti determinacijskih koeficientov (r^2).

Preglednica XVIII: Enačbe umeritvenih premic in vrednosti determinacijskih koeficientov za lamotrigin-2-N-glukuronid

Validacijski dan	Brez upoštevanja IS	Z upoštevanjem IS
1.	$y = 24,4x - 1,06$ $r^2 = 0,9998$	$y = 0,254x - 0,0154$ $r^2 = 0,9987$
2.	$y = 22,6x + 2,30$ $r^2 = 0,9976$	$y = 0,244x + 0,0222$ $r^2 = 0,9973$
3.	$y = 23,2x + 1,27$ $r^2 = 0,9988$	$y = 0,293x + 0,0031$ $r^2 = 0,997$

Preglednica XIX prikazuje točnost umeritvene premice za lamotrigin-2-N-glukuronid z in brez upoštevanja internega standarda.

Preglednica XIX: Točnosti odzivov lamotrigin-2-N-glukuronida, izračunane iz umeritvene premice

c (µg/mL)	Točnost (v %)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	Brez IS	Z IS	Brez IS	Z IS	Brez IS	Z IS
0	-	-	-	-	-	-
0,1	-	-	-	-	48,8	115,0
0,25	104,3	112,8	88,4	88,0	93,7	99,5
0,5	111,2	111,9	90,2	92,7	101,1	113,7
1	91,7	94,3	92,0	93,5	105,3	105,0
2,5	103,3	104,6	104,1	101,7	104,5	95,6
5	97,6	96,1	98,5	98,5	97,9	91,6
10	-	-	105,6	105,6	98,9	107,1
12,5	99,2	97,1	101,6	102,1	103,7	100,9
15	100,8	102,3	96,5	96,2	98,0	97,3

4.5.2. Točnost

Točnost metode za posamezni analit smo določali s pomočjo Qc po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Rezultate smo podali z in brez upoštevanja internega standarda.

Lamotrigin

Preglednica XX prikazuje odzive in točnost metode za lamotrigin v Qc brez upoštevanja IS.

Preglednica XX: Odzivi in točnost metode za lamotrigin brez upoštevanja IS

	QcL (0,3 µg/mL)			QcM (5 µg/mL)			QcH (18 µg/mL)		
	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
	Odziv (površina pod vrhom)								
1.	15,2	15,8	14,6	228,5	213,0	217,2	877,9	785,8	807,1
2.	15,7	16,1	14,5	228,7	211,6	206,8	912,9	816,9	876,9
3.	15,4	15,5	15,1	224,1	203,1	172,4	857,6	827,1	920,5
4.	15,8	15,9	15,8	232,6	224,9	229,9	983,4	814,7	835,5
5.	15,6	16,0	13,9	204,3	231,9	243,4	906,6	881,2	917,2
AVG	15,5	15,9	14,8	223,6	216,9	213,9	907,7	825,1	871,4
	Točnost (%)								
1.	89,0	94,4	91,3	104,0	93,7	102,7	112,3	97,0	107,1
2.	92,8	96,6	90,5	104,0	93,1	97,7	116,8	100,9	116,4
3.	90,5	92,1	95,3	101,9	89,3	81,2	109,7	102,2	122,2
4.	93,6	95,1	100,9	105,9	99,0	108,8	125,8	100,6	110,9
5.	92,1	95,9	85,7	92,8	102,1	115,2	116,0	108,9	121,8
AVG	91,6	94,8	92,7	101,7	95,4	101,1	116,1	101,9	115,7

Točnost metode ne ustreza smernicam samo za QcH za prvi in tretji dan, saj povprečni vrednosti odstopata nekaj več kot 15 %.

Preglednica XXI prikazuje odzive in točnost metode za lamotrigin v Qc z upoštevanjem IS.

Preglednica XXI: Odzivi in točnost metode za lamotrigin z upoštevanjem IS

	QcL (0,3 µg/mL)			QcM (5 µg/mL)			QcH (18 µg/mL)		
	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
	Razmerje odzivov analita in IS								
1.	0,163	0,171	0,183	2,41	2,39	2,26	9,18	9,23	9,18
2.	0,167	0,177	0,174	2,38	2,45	2,34	9,75	8,88	10,0
3.	0,169	0,171	0,190	2,38	2,43	1,86	9,08	9,37	9,94
4.	0,163	0,172	0,184	2,42	2,37	2,56	9,46	9,30	9,68
5.	0,170	0,178	0,162	2,34	2,43	2,65	9,73	9,64	10,2
AVG	0,166	0,174	0,178	2,39	2,42	2,34	9,44	9,28	9,80
	Točnost (%)								
1.	106,8	96,7	98,8	101,3	97,6	85,3	107,5	105,7	97,1
2.	109,5	101,0	93,0	100,1	100,2	88,5	114,2	101,6	105,8
3.	110,8	96,5	103,2	100,2	99,3	70,0	106,4	107,2	105,2
4.	106,4	97,2	99,7	101,8	96,9	96,6	110,7	106,4	102,4
5.	111,3	101,6	85,3	98,4	99,0	100,3	113,9	110,4	108,1
AVG	109,0	98,6	96,0	100,3	98,6	88,1	110,6	106,3	103,7

Točnost metode za lamotrigin z upoštevanjem IS ustreza smernicam za vse dni validacijskega postopka.

Lamotrigin-2-N-glukuronid

Preglednica XXII prikazuje odzive in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid v Qc brez upoštevanja IS.

Preglednica XXII: Odzivi in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid brez upoštevanja IS

	QcL (0,3 µg/mL)			QcM (5 µg/mL)			QcH (12 µg/mL)		
	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
	Odziv (površina pod vrhom)								
1.	5,6	7,9	7,4	122,0	120,1	128,9	280,0	276,6	301,3
2.	5,9	7,7	7,8	125,5	124,0	128,5	295,5	291,9	319,3
3.	5,8	7,9	7,4	122,4	112,5	129,3	269,2	293,2	313,3
4.	6,2	7,6	8,1	129,1	123,9	129,4	301,9	282,8	314,8
5.	5,6	7,6	7,8	114,2	122,2	127,1	292,3	288,8	297,3
AVG	5,8	7,7	7,7	122,6	120,5	128,6	287,8	286,7	309,2
	Točnost (%)								
1.	91,0	82,5	88,1	100,9	104,2	110,0	96,0	101,1	107,8
2.	95,1	79,6	93,9	103,8	107,7	109,7	101,3	106,8	114,2
3.	93,8	82,5	88,1	101,2	97,5	110,4	92,3	107,3	112,1
4.	99,2	78,1	98,2	106,7	107,6	110,5	103,5	103,4	112,6
5.	91,0	78,1	93,9	94,5	106,1	108,5	100,2	105,6	106,3
AVG	94,0	80,2	92,4	101,4	104,6	109,8	98,7	104,8	110,6

Točnost metode ne ustreza smernicam samo za QcL drugega dne, saj povprečna vrednost odstopa več kot 15 %.

Preglednica XXIII prikazuje odzive in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid v Qc z upoštevanjem IS.

Preglednica XXIII: Odzivi in točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid z upoštevanjem IS

	QcL (0,3 µg/mL)			QcM (5 µg/mL)			QcH (12 µg/mL)		
	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
	Razmerje odzivov analita in IS								
1.	0,0601	0,0854	0,0926	1,29	1,35	1,34	2,93	3,25	3,43
2.	0,0628	0,0847	0,0934	1,31	1,44	1,46	3,16	3,17	3,64
3.	0,0636	0,0869	0,0930	1,30	1,35	1,39	2,85	3,32	3,38
4.	0,0638	0,0820	0,0944	1,34	1,31	1,44	2,90	3,23	3,65
5.	0,0609	0,0845	0,0907	1,31	1,28	1,39	3,14	3,16	3,31
AVG	0,0622	0,0847	0,0928	1,31	1,34	1,40	3,00	3,23	3,48
	Točnost (%)								
1.	99,2	86,3	101,7	102,7	108,6	91,2	96,8	110,1	97,3
2.	102,7	85,3	102,6	104,3	116,0	99,1	104,3	107,5	103,3
3.	103,8	88,3	102,1	103,9	108,5	94,9	94,2	112,5	96,0
4.	104,0	81,6	103,7	107,3	105,3	97,9	95,9	109,4	103,5
5.	100,2	85,1	99,5	104,5	102,9	94,3	103,6	107,1	94,0
AVG	102,0	85,3	101,9	104,5	108,3	95,5	98,9	109,3	98,8

Točnost metode za lamotrigin-2-N-glukuronid zadostuje pogojem za vse dni validacijskega postopka.

4.5.3. Ponovljivost

Ponovljivost metode za posamezni analit smo določali s pomočjo Qc po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4. Rezultate smo podali z in brez upoštevanja internega standarda.

Znotrajdnevna ponovljivost

S pomočjo odzivov petih paralel Qc pri treh različnih koncentracijah (QcL, QcM, QcH) smo določili povprečni odziv (AVG), standardni odmik (SD) in koeficient variance (CV). Rezultate smo podali z in brez upoštevanja internega standarda. Preglednica XXIV prikazuje rezultate za znotrajdnevno ponovljivost.

Preglednica XXIV: Rezultati za znotrajdnevno ponovljivost

Lamotrigin (brez IS)									
	QcL			QcM			QcH		
Validacijski dan	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
AVG	15,5	15,9	14,8	224	217	214	908	825	871
SD	0,24	0,23	0,71	11,2	11,4	27,0	47,9	34,9	49,9
CV (%)	1,55	1,45	4,82	5,02	5,27	12,6	5,27	4,23	5,73
Lamotrigin-2-N-glukuronid (brez IS)									
Validacijski dan	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
AVG	5,82	7,74	7,70	123	121	129	288	287	309
SD	0,25	0,15	0,30	5,51	4,77	0,93	13,1	6,91	9,41
CV (%)	4,28	1,96	3,90	4,50	3,95	0,72	4,55	2,41	3,04
Lamotrigin (z IS)									
	QcL			QcM			QcH		
Validacijski dan	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
AVG	0,17	0,17	0,18	2,39	2,42	2,34	9,44	9,28	9,80
SD	0,00	0,00	0,01	0,03	0,03	0,31	0,31	0,27	0,40
CV (%)	1,95	2,10	6,16	1,29	1,34	13,3	3,24	2,95	4,04

Lamotrigin-2-N-glukuronid (z IS)									
Validacijski dan	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
AVG	0,06	0,08	0,09	1,31	1,34	1,40	3,00	3,23	3,48
SD	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,05	0,14	0,06	0,15
CV (%)	2,67	2,11	1,47	1,62	4,49	3,26	4,71	2,01	4,42

Rezultati ustrezajo smernicam za vse 3 dni validacijskega postopka z in brez upoštevanja internega standarda.

Meddnevna ponovljivost

S pomočjo odzivov Qc vseh treh dni validacijskega postopka smo določili povprečno vrednost (AVG), standardni odmik (SD) in koeficient variance (CV). Rezultate smo podali z in brez upoštevanja internega standarda. Preglednica XXV prikazuje rezultate za meddnevno ponovljivost.

Preglednica XXV: Rezultati za meddnevno ponovljivost

Lamotrigin (brez IS)			
	QcL	QcM	QcH
AVG	15,4	218	868
SD	0,55	4,97	41,4
CV (%)	3,60	2,28	4,77
Lamotrigin-2-N-glukuronid (brez IS)			
	QcL	QcM	QcH
AVG	7,09	124	295
SD	1,10	4,20	12,7
CV (%)	15,5	3,39	4,31
Lamotrigin (z IS)			
	QcL	QcM	QcH

AVG	0,17	2,38	9,51
SD	0,01	0,04	0,27
CV (%)	3,54	1,72	2,80
Lamotrigin-2-N-glukuronid (z IS)			
	QcL	QcM	QcH
AVG	0,08	1,35	3,23
SD	0,02	0,05	0,24
CV (%)	19,8	3,50	7,53

4.5.4. Meja določljivosti (LOQ)

Za mejo določljivosti za posamezni analit smo določili najnižjo točko umeritvene premice, ki zadošča kriterijem, ki so opisani v poglavju 3.3.6. Preglednica XXVI prikazuje LOQ vrednosti z in brez upoštevanja internega standarda.

Preglednica XXVI: Meje določljivosti

Spojina	LOQ (µg/mL)	
	Brez upoštevanja IS	Z upoštevanjem IS
Lamotrigin	0,25	0,1
Lamotrigin-2-N-glukuronid	0,25	0,25

4.5.5. Postpreparativna stabilnost

Postpreparativno stabilnost smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.7. Uporabili smo Qc, pri vsaki koncentraciji 3 paralele. Povprečno vrednost odzivov ob času t smo primerjali s povprečno vrednostjo odzivov pri času 0. Relativne spremembe odzivov v odvisnosti od časa prikazuje preglednica XXVII.

Preglednica XXVII: Postpreparativna stabilnost vzorcev

	Relativna sprememba odziva v odvisnosti od časa (%)					
Čas (h)	12			24		
Koncentracija	QcL	QcM	QcH	QcL	QcM	QcH
Lamotrigin	-0,63	+9,18	+5,16	+18,11	+34,88	+29,50
Lamotrigin-2-N-glukuronid	-1,29	+0,78	-0,53	+0,43	+2,80	+1,62

Vzorci so stabilni najmanj 12 h.

4.5.6. Uspešnost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije (recovery) smo določili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.8. Odzivi standardnega vzorca so predstavljali 100 %. Rezultate prikazuje preglednica XXVIII.

Preglednica XXVIII: Uspešnost ekstrakcije

Povprečni odzivi plazemskih vzorcev			
Koncentracija	Lamotrigin	Lamotrigin-2-N-glukuronid	IS
QcL	14,78	7,70	82,96
QcM	213,94	128,64	91,72
QcH	871,44	309,20	88,86
Povprečni odzivi standardnih vzorcev			
Koncentracija	Lamotrigin	Lamotrigin-2-N-glukuronid	IS
QcL	14,33	8,83	113,67

QcM	250,47	141,60	116,30
QcH	880,17	342,90	113,63
Uspešnost ekstrakcije (recovery)			
Koncentracija	Lamotrigin	Lamotrigin-2-N-glukuronid	IS
QcL	103,1	87,2	73,0
QcM	85,4	90,9	78,9
QcH	99,0	90,2	78,2
CV (%)	9,67	2,19	4,20

4.5.7. Validacija redčenja

Vzorci za analizo smo redčili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.9. Vzorce smo razredčili tako, da smo 15 µL osnovne raztopine preiskovanih analitov v ustreznih koncentracijah dodali 15 µL mobilne faze. S pomočjo umeritvene premice tretjega dne validacije smo iz povprečnih odzivov določili točnost odzivov za posamezni analit. Preglednica XXIX prikazuje rezultate pri posameznih koncentracijah analitov.

Preglednica XXIX: Validacija redčenja

Lamotrigin					
Vzorec	Začetna koncentracija (µg/mL)	Končna koncentracija (µg/mL)	AVG	CV (%)	Točnost (%)
R1	20	10	423,80	3,99	97,0
R2	15	7,5	322,57	1,40	119,1
R3	10	5	206,97	8,77	89,3
R4	5	2,5	109,07	0,70	87,6
Lamotrigin-2-N-glukuronid					
Vzorec	Začetna koncentracija (µg/mL)	Končna koncentracija (µg/mL)	AVG	CV (%)	Točnost (%)
R1	15	7,5	181,30	5,27	99,0

R2	12,5	6,25	150,83	1,23	119,5
R3	10	5	118,63	10,38	91,8
R4	5	2,5	58,17	0,44	84,2

4.6. Aplikacija metode na realne plazemske vzorce

Z metodo smo analizirali še dva plazemska vzorca bolnika z epilepsijo, ki se zdravi z lamotriginom. Prvi vzorec je kot antikoagulant vseboval heparin, drugi pa EDTA. Vzorca smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.4. Preglednica XXX prikazuje odzive za lamotrigin, lamotrigin-2-N-glukuronid in IS ter izračunane koncentracije za lamotrigin in lamotrigin-2-N-glukuronid v realnih vzorcih iz enačbe umeritvene premice tretjega dne validacije z upoštevanjem internega standarda.

Preglednica XXX: Realna plazemska vzorca

Vzorec	Odzivi			Izračunane koncentracije (µg/mL)	
	Lamotrigin	Lamotrigin-2-N-glukuronid	IS	Lamotrigin	Lamotrigin-2-N-glukuronid
Realni (heparin)	263,1	48,2	110,9	4,48	1,47
Realni (EDTA)	287,5	52,4	119,5	4,53	1,48

5. Razprava

V okviru raziskovalnega dela na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko poteka klinična raziskava z naslovom »Napovedni dejavniki za variabilnost farmakokinetike lamotrigina pri bolnikih z epilepsijo«. Cilj raziskave je razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela, ki bo omogočal optimizacijo odmerjanja lamotrigina med nosečnostjo, za kar pa je potrebna ustrezna analizna metoda.

V diplomski nalogi smo razvili hitro in enostavno metodo za določanje plazemskih koncentracij lamotrigina in njegovega glavnega neaktivnega metabolita lamotrigin-2-N-glukuronida. Z metodo smo uspešno ločili tudi lamotrigin-5-N-glukuronid, ki pa ga kvantitativno nismo ovrednotili zaradi pomanjkanja ustreznega standarda. V literaturi je objavljenih veliko metod za določanje lamotrigina in ostalih protiepileptičnih učinkovin. Zelo malo pa je metod za sočasno določanje lamotrigina in njegovih metabolitov. Metoda je izkazala zadovoljive validacijske rezultate in je kot taka ustrezna za uporabo.

5.1. Razvoj kromatografije

Po preučitvi obstoječe literature smo kot izhodišče za naše raziskovalno delo izbrali metodo, ki so jo razvili Saracino in sodelavci (7). Ti so določevali lamotrigin, lamotrigin-2-N-glukuronid in 2-N-metil-lamotrigin. Kot vodni del mobilne faze so uporabili 0,45 mM fosfatni pufer s pH 3,5, ki je vseboval 0,17 % trietilamina. Vodni del je predstavljal 76 % v/v deleža mobilne faze, za preostali organski del so uporabili metanol. Analizni čas je znašal 10 min.

Metodo smo začeli razvijati na vodnih vzorcih, da smo ocenili retencijske čase analitov pri uporabi različnih kolon. S tem smo se tudi izognili motečim vrhovom ostalih komponent iz plazme. Uporabljali smo izokratske metode z različnimi sestavami mobilne faze. S povečanjem deleža vodne faze smo povečali tudi retencijske čase naših analitov in obratno. S kolono Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 smo dosegli ustrezno ločbo vseh analitov. Mobilno fazo smo imeli sestavljeno iz 25 % metanola in 75 % 25 mM fosfatnega pufera s pH 3,5. Temperaturo termostata kolone smo nastavili na 30 °C, pretok mobilne faze pa je znašal 1,0 mL/min.

Metodo smo nato prenesli na plazemske vzorce. Pri teh pogojih smo uspešno ločili le lamotrigin, ki se je eluiral ob času 16,6 min. Ločbo glukuronidov smo poizkusili popraviti z uporabo trietilamina, vendar neuspešno. Nato smo poizkušali še s spreminjanjem sestave mobilne faze. Retencijo glukuronidov smo želeli povečati s postopnim zmanjševanjem organskega dela mobilne faze. Ker tudi pri 20 % deležu metanola v mobilni fazi nismo dosegli želenih rezultatov, hkrati pa smo tudi povečali retencijski čas lamotrigina, smo poizkusili s spremembo pH fosfatnega pufra. Ugotovili smo, da se z nižanjem pH povečujejo retencijski časi naših analitov. Pri pH 3 smo uspešno ločili lamotrigin-5-N-glukuronid, pri pH 2,5 pa tudi lamotrigin-2-N-glukuronid. Nižje se nismo spuščali, saj naša kolona ni stabilna pri pH vrednostih pod 2.

Iz nabora internih standardov smo na podlagi njihovih lastnosti in dostopnosti izbrali 3 spojine za analizo, in sicer metformin, kloramfenikol ter guanabenz acetat. Prvi se je eluiral skupaj z biomatriksom iz plazme, ostala dva pa celo za lamotriginom. Zaradi krajšega retencijskega časa smo izbrali kloramfenikol.

Z uvedbo gradienta v sestavi mobilne faze smo želeli približati vrhova lamotrigina in IS h krajšim retencijskim časom. Oba glukuronida sta se eluirala v času 4 min, zato smo po tem času lahko povečali delež metanola v mobilni fazi. Uporaba gradientnih metod nam je sicer skrajšala retencijske čase za lamotrigin in IS, vendar pa se je zaradi večjega deleža metanola poslabšala ločba. Preizkusili smo različne sestave mobilne faze z deležem metanola v območju 21–48 %. Čas analize smo skrajšali tudi s povečanjem pretoka mobilne faze iz 1,0 na 1,2 oziroma 1,4 mL/min, kar na ločbo analitskih vrhov ni imelo vpliva, povečal pa se je tlak na koloni. Višji tlaki lahko povzročijo poškodbe na koloni, zato smo tlak znižali s postopnim povišanjem temperature termostata kolone iz začetnih 30 na 40 oziroma 45 °C. Na ločbo in analizni čas smo tako vplivali s številnimi spremenljivkami: s sestavo mobilne faze pred začetkom gradienta, s sestavo mobilne faze med gradientom, s pretokom mobilne faze in temperaturo kolone. Optimalno ločbo kromatografskih vrhov naših analitov smo dosegli z gradientno metodo, pri kateri smo ob času 2,3 min delež organske faze povečali z začetnih 23 na 29 %. Ob času 10 min smo delež metanola znova znižali na 23 %.

Zaradi relativno majhne razlike v gradientu smo znova poizkusili z izokratskimi metodami, saj so te dokaj enostavnejše za uporabo, poleg tega pa se izognemo tudi spremembi bazne linije. Ta se namreč med gradientno metodo rahlo poviša. Ustrezno resolucijo smo dosegli ob razmerju deležev vodnega in organskega dela mobilne faze 76:24. Z dvigom pretoka na 1,6 mL/min in temperature na 50 °C smo čas analize skrajšali na 10,5 min. Retencijski čas za lamotrigin-2-N-glukuronid je znašal 2,37 min, za lamotrigin pa 6,8 min. Z metodo, ki so jo razvili Saracino in sodelavci, sta se spojini eluirali ob časih 2,4 in 6,1. Metodi sta torej primerljivi.

Analizni čas metode bi lahko še skrajšali z uporabo internega standarda, ki bi se eluiral pred lamotriginom.

5.2. Validacija metode

Metodo smo validirali na podlagi smernic FDA za validacijo bioanaliznih metod. Izvedli smo postopke za ugotavljanje linearnosti, točnosti in ponovljivosti. Določili smo tudi mejo določljivosti (LOQ), postpreparativno stabilnost za 12 in 24 h in uspešnost ekstrakcije (recovery). Z validacijo smo potrdili zanesljivost in ustreznost metode v danih pogojih.

5.2.1. Linearnost

Metoda je linearna v območju 0,1–20 µg/mL za lamotrigin, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa v območju 0,25–15 µg/mL. Metoda pokriva celotno plazemsko referenčno območje za lamotrigin, ki se giblje med 1 in 15 µg/mL. Metoda, ki so jo razvili Saracino in sodelavci, je bila linearna v območju 0,1–15 µg/mL za oba analita. Naša metoda ima torej višjo zgornjo mejo za lamotrigin, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa linearnosti pri koncentraciji 0,1 µg/mL nismo uspeli potrditi.

Vrednosti determinacijskih koeficientov (r^2) so bile vse dni enake ali višje od 0,997 za obe spojini.

5.2.2. Točnost

Točnost metode je za vse tri dni validacijskega postopka ob upoštevanju internega standarda ustrezna tako za lamotrigin kot za lamotrigin-2-N-glukuronid. Točnost za lamotrigin v vseh

treh dneh ne odstopa za več kot 11,9 %, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa ne več kot za 14,9 %, kar pa še vedno ustreza smernicam. Če internega standarda ne upoštevamo, metoda ni točna za lamotrigin za QcH prvega in tretjega dne, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa za QcL drugega dne.

Uporaba internega standarda torej zmanjšuje vpliv napak na končni rezultat, npr. napak inštrumenta, ali napak, ki jih naredimo med pripravo vzorca.

5.2.3. Ponovljivost

Določili smo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Znotrajdnevna ponovljivost ustreza smernicam, saj najvišji CV znaša 13,3 %. Pri meddnevni ponovljivosti najvišji CV znaša 19,8 % za lamotrigin-2-N-glukuronid pri QcL. Nekoliko višje odstopanje izvira iz rezultatov prvega dne validacije, saj so odzivi za lamotrigin-2-N-glukuronid pri QcL iz tega dneva v primerjavi z rezultati preostalih dni v povprečju nižji za 24,7 %. Koncentracija QcL (0,3 µg/mL) je zelo blizu meji določljivosti, po smernicah FDA pa je tu dovoljeno odstopanje do 20 %.

5.2.4. Meja določljivosti (LOQ)

Meji določljivosti, ki smo jo določili ob upoštevanju internega standarda, sta za lamotrigin 0,1 µg/mL, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa 0,25 µg/mL. LOQ smo določili po kriterijih, ki so opisani v poglavju 3.3.6. Nižjo mejo določljivosti bi mogoče lahko dosegli s povišanjem ojačitve fotopomnoževalke na detektorju za lamotrigin-2-N-glukuronid. Metoda, ki so jo razvili Saracino in sodelavci, je dosegla mejo določljivosti 0,1 za obe spojini, pri čemer velja omeniti, da so v HPLC sistem injicirali enkrat večjo količino vzorca, torej 20 µL.

LOQ za lamotrigin, ki smo jo določili z našo metodo, je primerljiva s številnimi že objavljenimi metodami (6, 7, 11, 12, 31, 32), kjer so dosegli LOQ med 0,1 in 0,4 µg/mL. Matar in sodelavci so razvili metodo, ki je za lamotrigin dosegla LOQ 0,05 µg/mL. Kot ekstrakcijski medij so uporabili 5 % izopropanol v kloroformu, s čimer so dosegli lepše kromatograme z manjšim šumom (15). V literaturi nismo zasledili nobenih občutljivejših metod z detekcijo v UV območju.

5.2.5. Postpreparativna stabilnost

Vzorci so stabilni najmanj 12 h, če jih hranimo v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Noben odziv se ni spremenil za več kot 9,18 %, ne glede na koncentracijo naših analitov. Odzivi po 24 h za lamotrigin-2-N-glukuronid narastejo za največ 2,8 %, medtem ko so odzivi za lamotrigin bistveno višji (do 34,88 %). Vzrok za takšno odstopanje bi lahko bila nestabilnost glukuronida, ki razpade na glukuronsko kislino in lamotrigin. Posledično se poveča tudi odziv lamotrigina. Dvig odzivov bi lahko bil tudi posledica hlapenja topila, ki ga sestavljata metanol in voda.

5.2.6. Uspešnost ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije je za lamotrigin med 85 in 103 %, za lamotrigin-2-N-glukuronid med 87 in 91 %, in za interni standard med 73 in 79 %.

Pri ekstrakciji plazemskih vzorcev zelo težko dosežemo 100 % izkoristek, zato je toliko bolj pomembna ponovljivost ekstrakcije. Izkoristki so za vse tri analite ponovljivi, saj najvišji CV znaša 9,67 % za lamotrigin.

Ustrezna ponovljivost pri ekstrakciji je pomemben element priprave vzorca, saj ima velik vpliv na ponovljivost in točnost celotne metode.

5.2.7. Validacija redčenja

Ob majhnih količinah razpoložljivih vzorcev lahko z redčenjem le-teh uspešno pridobimo na volumnu vzorcev. Uporabili smo vzorce, s katerimi smo določili umeritveni premici za tretji dan. Štiri vzorce pri najvišjih koncentracijah smo redčili z mobilno fazo v razmerju 1:1 in jih nato analizirali v treh paralelah, s čimer smo določili tudi ponovljivost postopka redčenja. Odzivom redčenih vzorcev smo nato določili točnost iz umeritvenih premic za tretji dan validacije. Odzivi redčenih vzorcev so ponovljivi, saj noben CV ne presega 10,4 %, njihova točnost pa je med 84,2 % in 119,5 %.

5.3. Aplikacija metode na realne plazemske vzorce

Analizirali smo dva plazemska vzorca bolnika z epilepsijo, ki se zdravi z lamotriginom. Vzorca sta vsebovala različna antikoagulantna, in sicer heparin in EDTA. V obeh vzorcih smo izračunali enaki koncentraciji tako za lamotrigin kot za lamotrigin-2-N-glukuronid. Iz rezultatov lahko sklepamo, da vrsta antikoagulantna ne vpliva na plazemske koncentracije naših analitov.

5.4. Preučevanje vpliva strukture analitov na absorbanco

Spojine, ki jih želimo detektirati v UV območju, morajo v svoji strukturi vsebovati ustrezne kromofore. Vsi naši analiti imajo v svoji strukturi aromatski obroč, ki dobro absorbira v UV območju. Glukuronska kislina glukuronida ni kromofor, zato smo preučili njen vpliv na absorbanco. Uporabili smo podatke tretjega dne validacije. Odzive Qc za lamotrigin-2-N-glukuronid smo preračunali na odzive za lamotrigin ob predpostavki, da gre za enake masne koncentracije. Odzive za glukuronid smo pomnožili z razmerjem molekulskih mas lamotrigin-2-N-glukuronida in lamotrigina. Dobljenim vrednostim smo nato s pomočjo umeritvene premice za lamotrigin določili točnost. Za QcL smo dobili povprečno vrednost 82,2 %, za QcM 89,4 % in za QcH 93,1 %. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da bi iz umeritvene premice lamotrigina ob upoštevanju razmerja molekulskih mas lahko ocenili tudi plazemske koncentracije lamotrigin-5-N-glukuronida.

6. Sklepi

V diplomski nalogi smo razvili hitro in enostavno HPLC metodo za lamotrigin in njegova glavna metabolita, lamotrigin-2-N-glukuronid in lamotrigin-5-N-glukuronid. Metoda je primerna za rutinsko uporabo v laboratorijih, saj je preprosta in tudi cenovno ugodna. Vsi trije analiti vsebujejo dobre kromofore, zato jih lahko detektiramo v UV območju. Uporabili smo DAD detektor, najvišje odzive pa smo izmerili pri valovni dolžini 220 nm. Uporabili smo izokratsko mobilno fazo, sestavljeno iz 76 % vodnega dela (25 mM fosfatni pufer s pH = 2,5) in 24 % organskega dela (metanol). Preiskovane spojine in interni standard smo uspešno ločili s kolono Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6 x 150 (Agilent technologies, ZDA). Pretok mobilne faze je znašal 1,6 mL/min, temperatura termostata na koloni pa 50 °C. Celotna analiza je potekla v 10,5 min.

Metodo smo validirali na podlagi FDA standardov za validacijo bioanaliznih metod. Metoda je točna in za lamotrigin linearna v območju med 0,1 in 20 µg/mL, za lamotrigin-2-N-glukuronid pa v območju med 0,25 in 15 µg/mL. Meji določljivosti smo določili 0,1 µg/mL za lamotrigin in 0,25 µg/mL za lamotrigin-2-N-glukuronid. Pri preučevanju postpreparativne stabilnosti vzorcev smo ugotovili, da so le-ti stabilni najmanj 12 h v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Metoda je izkazala ustrezno znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost za lamotrigin. CV ni nikoli presegel 13,3 % oziroma 3,54 %. Za lamotrigin-2-N-glukuronid je najvišji CV za znotrajdnevno ponovljivost znašal 4,71 %, za meddnevno ponovljivost pa 19,8 %. Zadnja vrednost je pripadala QcL iz prvega dne validacije, katerih koncentracija (0,3 µg/mL) je bila blizu meji določljivosti. Po smernicah FDA je pri meji določljivosti dovoljeno odstopanje do 20 %.

Metoda je primerna za terapevtsko spremljanje koncentracij lamotrigina. Terapevtsko območje učinkovine se giblje med 1 in 15 µg/mL. Naša metoda je linearna v območju med 0,1 in 20 µg/mL in tako v celoti pokrije terapevtsko območje.

7. Literatura

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, Sixth Edition, Churchill Livingstone, Elsevier, 2007: 575-87.
2. Engel J: Epilepsy: Global Issues for the Practicing Neurologist, Demos Medical Publishing, New York, N.Y., 2005: 1-3.
3. Shorvon S, Perucca E, Engel J: The Treatment of Epilepsy, Third Edition, Blackwell Publishing Ltd., 2009: 1-15.
4. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al.: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51: 676-685.
5. Čebular B, Zgonc V: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravstveni vestnik* 2006; 75: 379-88.
6. Cheng CL, Chou CH, Yoa – Pu Hu O: Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 2005; 817: 199-206.
7. Saracino MA, Bugamelli F, Conti M, Amore M, Raggi MA: Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma, *Journal of Separation Science* 2007; 30: 2249-2255.
8. Rambeck B, Wolf P: Lamotrigine clinical pharmacokinetics, *Clinical Pharmacokinetics* 1993 Dec; 25(6): 433-43.
9. Angelis-Stoforidis P, Morgan DJ, O'Brien TJ, Vajda FJE: Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1999; 727: 113-118.
10. Argikar UA, Remmel RP: Variation in glucuronidation of lamotrigine in human liver microsomes, *Xenobiotica*, 2009; 39(5): 355-363.

11. Tomson T, Ehman I, Vitols S: Lamotrigine in Pregnancy and Lactation: A Case Report, *Epilepsia* 1997; 38(9): 1039-1041.
12. Franco V, Mazzucchelli I, Gatti G, Specchio LM, La Neve A, Papantonio A, Özkaynakçi AE, Perucca E: Changes in Lamotrigine Pharmacokinetics during Pregnancy and the Puerperium, *Therapeutic Drug Monitoring* 2008; 30: 544-547.
13. Bartoli A, Marchiselli R, Gatti G: A Rapid and Specific Assay for the Determination of Lamotrigine in Human Plasma by Normal-Phase HPLC, *Therapeutic Drug Monitoring*, Feb 1997; 19(1): 100-107.
14. Heideloff C, Bunch DR, Wang S: A Novel HPLC Method for Quantification of 10 Antiepileptic Drugs or Metabolites in Serum/Plasma Using a Monolithic Column, *Therapeutic Drug Monitoring* 2010; 32: 102-106.
15. Matar KM, Nicholls PJ, Bawazir SA, Al-Hassan MI, Tekle A: A rapid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 17: 525-531.
16. Gupta VK, Singh AK, Gupta B: Development of membrane electrodes for selective determination of some antiepileptic drugs in pharmaceuticals, plasma and urine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2007); 389: 2019-2028.
17. Queiroz MEC, Silva SM, Carvalho D, Lanças FM: Determination of Lamotrigine Simultaneously with Carbamazepine, Carbamazepine Epoxide, Phenytoin, Phenobarbital, and Primidone in Human Plasma by SPME–GC–TSD, *Journal of Chromatographic Science* Apr 2002; 40: 219-223.
18. Beck O, Öhman I, Nordgren H: Determination of Lamotrigine and its Metabolites in Human Plasma by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Therapeutic Drug Monitoring*, Oct 2006; 5: 603-607.
19. Martinavarro-Dominguez A, Capella-Piero ME, Gil-Agusti M, Marcos-Tomas JV, Esteve-Romero J: Therapeutic Drug Monitoring of Anticonvulsant Drugs by Micellar HPLC with Direct Injection of Serum Samples, *Clinical Chemistry* 48:10 (2002); 1696-1702.

20. Wyszomirska E, Czerwinska K: Identification and Assay of Lamotrigine in Human Milk with Gas Chromatography and Densitometry, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, Vol. 56 (1999); 2: 101-105.
21. Lanças FM, Sozza MA, Queiroz MEC: Simultaneous Plasma Lamotrigine Analysis with Carbamazepine, Carbamazepine 10,11 Epoxide, Primidone, Phenytoin, Phenobarbital, and PEMA by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC), *Journal of Analytical Toxicology*, Jul/Aug 2003; 27: 304-308.
22. Soons JWPH, van Bree ML, Coumou JH, Hulsman JARJ: Lamotrigine in dried blood spots by HPLC, *Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde* 2006; 31: 238-239.
23. Ouyang A, Arabshahi L, Roberts M, Wall M: Immunoassays for Lamotrigine, United States Patent Application Publication, Aug 19, 2010.
24. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al.: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, *ILAE Commission on Therapeutic Strategies, Epilepsia* 2008; 49: 1239-76.
25. Kang J, Park YS, Kim SH, Kim SH, Jun MY: Modern Methods for Analysis of Antiepileptic Drugs in the Biological Fluids for Pharmacokinetics, Bioequivalence and Therapeutic Drug Monitoring, *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, Apr 2011; 15: 67-81.
26. Eadie MJ: Therapeutic drug monitoring - antiepileptic drugs. *The British Journal of Clinical Pharmacology* 2001; 52: 11S-20S.
27. Johannessen SI, Landmark CJ: Value of therapeutic drug monitoring in epilepsy, *Expert Review of Neurotherapeutics* 2008; 8 (6): 929-39.
28. Morris RG, Black AB, Harris AL, Batty AB, Sallustio BC: Lamotrigine and therapeutic drug monitoring: retrospective survey following the introduction of a routine service, *British Journal of Clinical Pharmacology* 1998; 46: 547-551.

29. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for drug evaluation and research, Rockville, MD, May 2001.
30. ICH Topic Q 2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Step 5: Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency, London, 2006.
31. Morgan EP, Fisher DS, Evers R, Flanagan RJ: A rapid and simple assay for lamotrigine in serum/plasma by HPLC, and comparison with an immunoassay, Biomedical Chromatography 2010; 24: 1-4.
32. Franceschi L, Furlanut M: A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients, Pharmacological Research 2005; 51: 297-302.